

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06828

研究課題名(和文) 基質応答現象に基づく海底下微生物機能性遺伝子の探索と同定

研究課題名(英文) Exploration and identification of functional genes from subseafloor microorganisms based on substrate response phenomena

研究代表者

若松 泰介 (WAKAMATSU, Taisuke)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・准教授

研究者番号：60597938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：まず、evoglow遺伝子をレポーター遺伝子とする2つの海底下微生物メタゲノム由来SIGEXライブラリーを調製した。次に、嫌気/好気両条件下でハロゲン化合物を含む芳香族化合物群で応答性解析を行い、両条件下間で誘導割合に有意な差がある事とハロゲン化合物に高い応答を示す事を明らかにした。また、好気条件下でのMnCl₂、NiCl₂、CoCl₂を用いた解析から、これらにもライブラリーは高い応答性を示した。更に、嫌気条件下でのみ3-クロロ安息香酸に応答する4つのクローンを単離した。また、好気条件下で2,4-ジクロロフェノール、MnCl₂、NiCl₂等に応答する可能性がある408のクローンを単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

evoglowをレポーター遺伝子とすることで好気/嫌気両条件下でSIGEX応答解析が可能になった。得られた基質応答DNA断片はほぼ(機能)未知遺伝子群のみから構成されており、バイオインフォマティクスなど他の方法では取得不可能であった。本研究成果により海底下生命圏のみならず他の生命圏にも存在する機能未知遺伝子のSIGEX法を用いた探索や同定の普及に大きく繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：First, two metagenomic SIGEX libraries were constructed using evoglow gene as a reporter gene for subseafloor sediments. Next, SIGEX screening using five aromatic compounds (benzoate, 3-chlorobenzoate, 3-hydroxybenzoate, phenol, and 2,4-dichlorophenol) under aerobic and anaerobic conditions revealed significant differences in the inducible clone ratios under these conditions. 3-Chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenol led to a higher induction ratio than that for the other non-chlorinated aromatic compounds under both aerobic and anaerobic conditions. After the further screening of induced clones, four clones induced by 3-chlorobenzoate only under anaerobic conditions were isolated and characterized. Furthermore, 408 clones were isolated that may respond to 2,4-dichlorophenol, MnCl₂, or NiCl₂ under aerobic conditions.

研究分野：生化学

キーワード：遺伝子 DNA 海底下微生物 基質応答 ハロゲン化合物 金属イオン

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場により塩基配列情報は充実し、例えば40万種を超える微生物のゲノム配列がNCBIデータベースに登録されている¹。しかし、遺伝子のアノテーションは一般的には、それから産生されるタンパク質のアミノ酸配列の既知配列との類似性に基づいて行われるため、その約40%は機能が全くの未知、あるいは推定上である²。遺伝子を限界まで削ぎ落とした人工生命体である *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn3.0 でさえ、431 遺伝子中の149 (32%) は機能未知である³。更に、難培養性微生物や未培養系統微生物群が多く含まれる環境サンプルの場合だと、機能同定不可遺伝子の割合は50%を超える⁴。つまり、タンパク質アミノ酸配列の既知配列との類似性を出発点として遺伝子機能を同定する手法には限界がある。また、リボスイッチや非翻訳型RNA等として機能し得る機能未知塩基配列群も膨大な配列情報の中に含まれている。実際に、近年では僅か63bpの塩基配列がDNAレベル/トランス型で遺伝子発現を調節する事も明らかとなっており⁵、塩基配列と生命との関係には多くの謎が残されている。特に、地球最大規模の生命圏で生存する海底下微生物の大半は未培養系統である事に加え、35%を超える遺伝子は他の生命圏には無い未知配列であり^{6,7}、海底下微生物がどのような機能性遺伝子を持ち、どのような環境適応戦略をとっているかは不明である。

¹<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/>; ²Baric *et al.* (2016) *mBio*, 7, e01245-16; ³Hutchison III *et al.* (2016) *Science*, 351, aad6253; ⁴Bernard *et al.* (2018) *Genome Biol. Evol.*, 10, 705-715; ⁵Owen *et al.* (2021) *Cell Host Microbe*, 29, 1620-1633; ⁶Gaboyer *et al.* (2015) *FEMS Microbiol. Ecol.*, 91, 1-13; ⁷Biddle *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 10583-10588

2. 研究の目的

本研究では海底下微生物機能性遺伝子の大量特定のため、現場環境条件から導き出される基質誘導をアクセスの扉とする機能性遺伝子発現解析 (Substrate Induced Gene Expression method, SIGEX 法⁸ (図1)) を用いることにした。本法は、一般的な遺伝子発現は異化酵素の基質により誘導され、転写因子遺伝子は異化酵素遺伝子の近傍に存在することに基づいて2005年に開発された機能発現型メタゲノム法である。本法はまず環境サンプル由来のメタゲノム断片とレポーター遺伝子を用いて、大腸菌を宿主とするSIGEXライブラリーを調製する。そして現場環境に存在すると考える基質の添加により遺伝子発現誘導を行う。ライブラリー中の挿入DNA断片がこの誘導に応答すればレポーター遺伝子が共

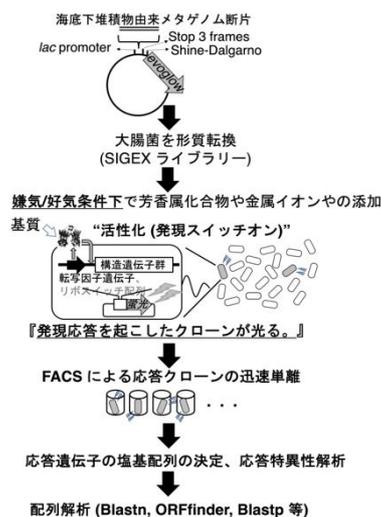


図1 本研究で用いた SIGEX 法

発現するため大腸菌が蛍光を発する。これをFluorescence Activated Cell Sorting (FACS) により高速選別し、機能性遺伝子群 (調節領域 (転写因子やリボスイッチ配列等) 及び構造遺伝子群) を効率的に取得する。これまでの機能発現型メタゲノム法は、一般的に酵素活性の検出ベースの手法が提案され、広く実施されてきた。本法はFACSを用いた迅速スクリーニ

ング法であり、調節領域が正常に働けば良いので、補因子が必要であったり、封入体形成の心配がある酵素遺伝子等の構造遺伝子群自体が働く事は必ずしも必要としない。つまり本手法はまさに遺伝子機能推定に対しての従来とは異なったベクトルからのアプローチである。これまでのSIGEX研究ではレポーター遺伝子として*gfp*を用いていたが、GFPは酸素原子を発色団の形成に必要とするため、好気条件下でのみで基質誘導解析を行うしかなかった。本研究では嫌気環境が大半を占める海底下生命圏を対象とするため、好気/嫌気両条件下で発色団を形成する*evoglow*⁸をレポーター遺伝子としたSIGEXライブラリーを作製することにした。その際にライブラリーの総挿入DNA断片長を拡大するため、ブラッシュアップも行うことにした。そして、その作製ライブラリーを用いて、海底下環境を代表する基質と考えたハロゲン化合物¹⁰と金属イオン¹¹とをトリガーとした遺伝子発現により、海底下微生物未知遺伝子の機能を予測した。

⁸Uchiyama *et al.* (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 88-93; ⁹Drepper *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.*, **25**, 443-445; ¹⁰Leri *et al.* (2015) *Nat. Geosci.*, **8**, 620-624; ¹¹Gillard *et al.* (2019) *Front. Mar. Sci.*, **6**, 462

3. 研究の方法

下北半島沖海底下コア試料(KY11-E06航海,海面から海底までの距離:1180m,深度:0-5 cm)と上越沖海底下コア試料(NT-13-15航海,海面から海底までの距離:1162m,深度:0-10,10-20,20-30cm)を環境サンプル、大腸菌MegaX DH10B T1Rを宿主、*evoglow*をレポーター遺伝子としたSIGEXライブラリーを作製した。作製の際のブラッシュアップとして、TOPOベクター使用の検討、NucleoMag NGS Clean-up and Size Selectによる挿入断片長鎖DNA(>800bp)の選択的回収、TOPOライゲーション時のインサート濃度の検討、カラム(DNA Clean & Concentrator-5 Kit)によるDNA濃縮を行なった。

そして、KY11-E06_0-5ライブラリーとNT13-15_0-10ライブラリーを対象に、好気/嫌気両条件下で1mMのハロゲン化物を含む有機芳香族化合物(安息香酸,3-クロロ安息香酸,3-ヒドロキシ安息香酸,フェノール,2,4-ジクロロフェノール)、好気条件下で0.01mMの金属イオン(MnCl₂,NiCl₂,CoCl₂)による基質誘導解析を行なった。次に、MoFlo XDP cell sorterを用いたFACSにより陽性クローン候補を384プレートに単離した。生えたクローンについて一部は応答解析を行い、また、全てについてサンガー法を用いて挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

作製したライブラリーから任意に選択した56クローンを用いて制限酵素処理解析した結果、挿入DNA断片の平均長は2kbpであり、また、クローンバリエーションは $>2.1 \times 10^6$ だった。つまり、4つのSIGEXライブラリーのそれぞれの総挿入DNA断片長は $>4.1\text{Gbp}$ であった。また、KY11-E06_0-5ライブラリーとNT13-15_0-10ライブラリーを対象に好気条件下で1mM IPTGを添加し解析を行った結果、発光を示すクローン(セルフライゲーションや短鎖DNAの挿入が起きたクローン)の数は検出限界以下であった。つまり、ブラッシュアップによりセルフライゲーションや短鎖DNAの挿入を防止することが出来たため、そのようなクローンをライブラリーから除くための一段階目のFACS(クローンバリエーション数を減らす可能性がある)

をする必要がなくなった。また、それぞれのメタゲノムを用いて16S rDNAアンプリコンシーケンス解析を行なったところ、ProteobacteriaとDesulfobacterotaが優先的な門の一つであった。

次に、KY11-E06_0-5ライブラリーとNT13-15_0-10ライブラリーを対象に、嫌気/好気両条件下で5つの1mM有機芳香族化合物に対する応答を調べたところ、両ライブラリーともに好気/嫌気両条件下ともハロゲン化合物に対し高い誘導を起こすことが明らかとなった。特に、好気条件下で2,4-ジクロロフェノールに非常に高い誘導(>4.7%)を示した。また、好気条件下で3種の0.01mM二価金属イオン(MnCl₂, NiCl₂, CoCl₂)に対する応答を調べたところ、両ライブラリーとも高い誘導(0.6-5.0%)を示した。MoFloを用いたFACSにより、両ライブラリーから嫌気条件下でのみ3-クロロ安息香酸に反応する4つのクローンと、好気条件下で2,4-ジクロロフェノールに反応する可能性がある298クローン、好気条件下でMnCl₂に反応する可能性がある79クローン、好気条件下でNiCl₂に反応する可能性がある31クローンを単離した。Sanger法により、嫌気条件下でのみ3-クロロ安息香酸に反応する4つのクローンについては全て挿入DNA断片の塩基配列を同定した。その内の1クローンは基質応答性を詳細に解析した。好気条件下で誘導を行い単離したクローンの幾つかについて誘導時に用いた基質を用いて誘導解析を行ったところ、殆どのクローンで誘導が確認出来た。また、好気条件下で2,4-ジクロロフェノールに反応する可能性がある187クローン、MnCl₂に反応する可能性がある69クローン、NiCl₂に反応する可能性がある18クローンについても挿入DNA断片の塩基配列を同定出来た。残りについてはプライマーウォーキングが必要なものであったり、難読配列であったものである。ただし、好気条件下での2,4-ジクロロフェノール, MnCl₂, NiCl₂, CoCl₂ について、1.5kbp程度の大腸菌16S rDNAを挿入断片としたクローンはこれらでレポーター遺伝子の発現誘導は全く観察されなかったが、inverse PCRで作製した空ベクターを保持したクローンでは発現誘導が観察されており、陽性クローンの扱いについて今後注意が必要であると考えられる。Blastn検索の結果、ほぼ全て未知DNAであった。ORFfinderとBlastpを用いた検索の結果、転写因子遺伝子、トランスポザーゼ遺伝子、耐性タンパク質遺伝子、エフラックス/トランスポーター遺伝子、センサー遺伝子が一部に含まれるものの、殆どが機能未知遺伝子あるいは未知遺伝子であった。また、嫌気条件下でのみ3-クロロ安息香酸に反応する4つのクローンの内の3つ(挿入断片1114 bp, 1405 bp, 1705 bp)については、inverse PCRによりそれぞれ6種の欠損変異体を作製し、一部は解析が終わった。今後は、inverse PCRにより欠損変異体を作製・解析しどの領域が反応に必須であるかを明らかにしたり、ゲノム上での周辺配列の同定、RT-qPCRで実際にmRNAが出来ているかなどを明らかにする必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taisuke Wakamatsu, Saki Mizobuchi, Fumiaki Mori, Taiki Futagami, Takeshi Terada, Yuki Morono	4. 巻 12
2. 論文標題 Construction of Aerobic/Anaerobic-Substrate-Induced Gene Expression Procedure for Exploration of Metagenomes From Subseafloor Sediments.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 726024(1-12)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.726024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fumiaki Mori, Tomoyasu Nishimura, Taisuke Wakamatsu, Takeshi Terada, Yuki Morono	4. 巻 36(3)
2. 論文標題 Simple, In-liquid Staining of Microbial Cells for Flow Cytometry Quantification of Microbial Population in Marine Subseafloor Sediments.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME21031(1-6)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME21031.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 若松 泰介, 溝淵 早紀, 森 郁晃, 二神 泰基, 寺田 武志, 諸野 祐樹
2. 発表標題 海底下堆積物由来メタゲノムを対象とした好気/嫌気両条件下で実施可能な基質誘導性遺伝子発現解析法の開発
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Morono, Taisuke Wakamatsu, Saki Mizobuchi, Fumiaki Mori, Taiki Futagami and Takeshi Terada
2. 発表標題 Exploration of genomic function of subseafloor sediments through aerobic/anaerobic-Substrate-Induced Gene Expression.
3. 学会等名 AGU Fall Meeting 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸野 祐樹, 若松 泰介, 溝渕 早紀, 森 郁晃, 二神 泰基, 寺田 武志
2. 発表標題 好気/嫌気両条件下で実施可能な基質誘導性遺伝子発現解析 (SIGEX) 法の開発と海底下堆積物ゲノムでの実証
3. 学会等名 極限環境生物学会2021年度 (第22回)年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 郁晃, 西村 知泰, 若松 泰介, 寺田 武志, 諸野 祐樹
2. 発表標題 簡易的染色手法とフローサイトメトリーによる海底下微生物の細胞カウント手法
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 晶, 若松 泰介, 森澤 高至, 寺田 武志, 石井 俊一, 諸野 祐樹
2. 発表標題 Screening of genes from subseafloor sediments and Co-rich ferromanganese crust using substrate-induced gene expression (SIGEX) method.
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	諸野 祐樹 (MORONO Yuki) (30421845)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(高知コア研究所)・主任研究員 (82706)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------