

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810021

研究課題名（和文）複合汚染環境における微生物遺伝子応答の網羅的解析と環境評価に関する研究

研究課題名（英文）Evaluation of microbial community responses to mixed contaminant perturbation by using a functional genomics approach.

研究代表者

濱村 奈津子 (HAMAMURA NATSUKO)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 准教授

研究者番号：50554466

研究成果の概要（和文）：本研究では、複合汚染の現場生態系に及ぼす影響をより総合的に評価するため、環境微生物群の汚染物質暴露に対する遺伝子発現応答を網羅的に診断する手法の開発を目的とした。ヒ素等を含む汚染環境サンプルの解析では、汚染物質の毒性に対応して重金属耐性や代謝機能遺伝子の発現が検出された。それら遺伝子群の多くは複数の重金属類の輸送に関与しており、汚染に対応する指標マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to evaluate the overall effect of perturbation by mixed contaminants on microbial community in situ by detecting community-level gene expression responses using metatranscriptomic approach. The analysis of arsenic- and heavy metal-contaminated environmental samples revealed the specific expression of functional genes involved in metal resistance, which could potentially be targeted to assess toxic effect of pollutants in the environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：微生物生態学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：メタトランスクリプトーム、ヒ素、微生物生態

1. 研究開始当初の背景

環境汚染の生体への直接的な影響（生体毒性など）についての研究に比べ、それら汚染物質の環境微生物を通じた間接的な影響については今だ解明が進んでいない。汚染物質の環境動態には微生物による代謝が深く関与しており、それらの機構はエネルギー源としての利用や耐性機構としての代謝のみならず、栄養分獲得を目的とした鉱物風化の結果引き起こされる重金属の溶出など多岐に渡る。したがって、生態系で行われている生物活動を総合的に理解し適正な環境評価を

行うには、環境化学変化に密接な相互作用を及ぼす微生物群の代謝や汚染物質暴露に対する応答を生態系レベルで解明することが必要である。

汚染環境下で起こる様々な微生物による代謝や耐性機構の反応は、種々の遺伝子の発現によって制御されており、汚染物質の種類や濃度、環境条件などにより変化する。このような化学物質による遺伝子発現の変化を利用した毒性評価技術はトキシコゲノミクス（毒性ゲノム学）と呼ばれ、応用技術として DNA マイクロアレイを用いたバイオアッセ

イ等が開発されている。現在利用可能な微生物マイクロアレイのほとんどは、ゲノム解読されている菌、すなわち培養可能な菌の遺伝情報に基づいており、この手法ではそれらの菌が保有しない遺伝子に関しては環境試料中から検出不可能である。また近年、分子学的手法を用いた環境微生物群の解析により、これまでに単離・培養されてきた菌は環境中に存在する全微生物の1%にも満たないことが明らかになっている。したがって、多種多様な菌が混在する環境微生物群全体の遺伝情報を網羅的に検出し、汚染現場での適切な環境評価を行うには、既知の遺伝情報に依存しない新規手法の開発が必要である。

これまでの研究を通して代表者は、環境から単離された菌のゲノム解析および環境ゲノムの比較解析を行い、環境中での微生物機能を特定するには、コンソーシアを構成する個々のメンバーではなくコンソーシア全体としての代謝特性を解析する重要性を認識するに至った。これらの研究成果から、複合汚染環境で実際に発現されている機能を総合的に評価するには、既知の単離菌や遺伝情報に制限されない、微生物群の遺伝子応答を群衆レベルで明らかにする新規のメタ解析手法の開発が必要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、最新の分子生物学的手法であるメタトランスクリプトーム解析により汚染現場での微生物遺伝子応答を網羅的に検出する手法を確立し、環境中で発現されている機能遺伝子群と汚染状況との相関性を調べ、新規の環境評価手法としての有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、重金属等による複合汚染が確認されている環境サンプルを以下の3つの項目で解析を行うこととした。

- (1) 汚染環境サンプルを使ったメタトランスクリプトーム手法の妥当性：本手法はまだ世界でも数例しか報告がなく、解析されている環境も限られていた。そこでまず、メタトランスクリプトーム解析用試料の調整方法、および次世代シーケンサーを用いたライブラリーのシーケンス解読量などの検討を行う。環境RNAをランダムプライマーにより逆転写したcDNAのライブラリーを、クローニングせずに直接マシーケンシングでの解読を行う。
- (2) 群衆レベルで特異的に発現されている機能の特定：バイオインフォマティクスツールを用いた解析により、発現レベルの高い遺伝子群の機能を特定する。また、一般公開されているゲノムや他の環境のメタゲノムおよびメタトランスクリプト

ムデータと比較することで、汚染環境で特異的に発現されている代謝機能や遺伝子群を特定する。

- (3) ターゲット機能遺伝子群の発現レベルと汚染状況との相関性：インフォマティクス解析により特定されたターゲット機能遺伝子群の環境中での発現レベルを特異的定量PCR (qRT-PCR) により定量し、網羅的解析の発現データの検出精度を確認するとともに、より信頼性の高い遺伝子応答の定量データを用いて汚染状況との相関性を調べる。

4. 研究成果

(1) 汚染環境サンプルを使ったメタトランスクリプトーム解析用試料調整方法の検討

新規に採取したヒ素やセレン等の有害元素を含む塩湖の底質及び周辺土壌を用いて、メタトランスクリプトーム解析用試料調整の検討を行った。環境サンプルを現場でLifeGuard (MoBio) とRNAlater (ABI) のRNA保存剤に採取し、室温で約7日間保存後RNA抽出時まで-20度で冷凍保存したところ、同一サンプルの比較においてLifeGuardで保存したサンプルは約10倍高いRNA収量を示した。環境試料中の微生物遺伝子発現を検出する際の問題点として、菌中RNAのほとんどがリボソームRNA (rRNA) でありmRNAの含量が非常に少ないことが挙げられる。そこで、遺伝子発現を効率よく検出するために、Ambion社のMICROBExpress Kitを使用してトータルRNA抽出後rRNAを特異的に除去し、その効果を検討した。rRNA除去前と後のRNAサンプルをアガロースゲル電気泳動で確認したところ、除去前のサンプルと比較して16Sと23SリボソームRNAが除去後のサンプルでは顕著に減少したことから、ある程度の除去効果があったと考えられた。得られたRNAをランダムプライマーにより逆転写し、次世代シーケンサーで直接解読した。

(2) 次世代シーケンサーによるメタトランスクリプトーム解析

シーケンス解析の解読量は、サンプル中の微生物群や発現している遺伝子の多様性および予算により左右されるが、これまでに発表されたメタトランスクリプトーム解析論文では、海洋表層水で約15Mb (文献1)、土壌で25Mb (文献2) の解読を行っている。これらの環境サンプルでは微生物群集構造が非常に多様であるため、多量のシーケンスが必要であったと考えられ、特に土壌サンプルでは解析にリボソームRNAも含まれており、全シーケンスの8%のみがmRNAであった。本研究に用いるサンプルのように、比較的単純な群衆構造の環境で、汚染による選択がかかっている場合には、より少ないシ

ークエンス解読でも有用な遺伝子応答情報が得られると考えられる。そこで、比較的微生物群集構造の単純な環境サンプル(含重金属高温温泉マット)を用いて、4Mbと20Mbのシーケンス解読(Roche/454 FLX)による比較解析を行った。初期解析の結果、微生物群集構造の単純な環境サンプルの場合、およそ4 Mb程度のシーケンス解析量(平均200bp/read)で、現場において優位に発現している機能遺伝子群の特定が可能であった。また比較解析の結果、解読量の違いによる発現遺伝子の多様性の差異は見られなかった。しかしながら、次世代シーケンス技術の飛躍的な進歩により、現時点(2011年5月)ですでにIllumina等のシーケンサーにより、大量の配列をより安価に解読することが可能であることから、今後はGbレベルでの解読が行われることが予測される。

(3) バイオインフォマティクス解析による高発現遺伝子群及び機能の特定

解析の第一段階では、全トランスクリプトーム配列とrRNAデータベースとの相同性検索を行い、putative rRNA配列を検出した。高温温泉マットのサンプルでは、全トランスクリプトーム配列(20Mb)の約97%、上記(1)でrRNAを特異的に除去した塩湖底質のサンプルにおいても、全配列(約30Mb)の約94.5%はrRNAであった。rRNAの系統解析により、中性高温温泉マットでは好熱菌の*Sulfurihydrogenibium* spp.が優占的に存在し、汚染塩湖底質では特に好塩・好アルカリ菌である*Halomonas*や*Bacillus*の割合が高いことが示された。このようなrRNAの解析により現場環境で活性の高い微生物種が特定できるが、機能遺伝子発現解析の効率化にはrRNAの特異的除去や遺伝子発現誘発因子への暴露など、さらなる工夫が必要である。

解析の第二段階では、第一段階で相同性が見られなかった配列を、GenBankやゲノムデータベース(Refseq)との相同性解析及びMG-RASTによるアノテーションにより解析し、機能遺伝子のmRNAを特定した。ヒ素等を含む塩湖底質サンプルで発現の確認された機能遺伝子グループとしては、エネルギー生成・代謝やタンパク質合成など微生物の生命維持活動に関わる機能に加えて、重金属耐性や代謝のような汚染暴露に対する特異的応答と考えられる機能も検出された。ヒ素や硫化鉄を含む高温温泉のトランスクリプトーム比較解析においても同様の重金属耐性遺伝子群の特異的発現が検出されたことから、これらの遺伝子群は有害元素複合汚染特有の毒性に対応する指標マーカーとして有用である可能性が示唆された。

(4) ターゲット機能遺伝子群の定量及び汚染状況との相関性解析

上記(3)で特定された高発現遺伝子の多くは、汚染環境に限らず発現されるハウスキーピング遺伝子など微生物の生命維持活動に関わる機能であり、指標マーカーとしては適切ではないと判断した。そこで、発現量が比較的高く、特異的機能は明らかにされていないが重金属酸化反応に関与していると考えられるCytochrome遺伝子をターゲットとし、特異的定量PCR(qRT-PCR)を行った。その結果、Cytochrome bd酸化酵素は鉄含有量の多いサイトで高い発現を示し、Cytochrome cは逆の傾向を示していたことから、前者は鉄酸化代謝へ関与している可能性が示唆された。

また、特異的な汚染物質の代謝に関与している遺伝子群として、ヒ素の代謝に関与するヒ素酸化及び還元酵素に着目して調べた。これらヒ素代謝遺伝子の発現はメタトランスクリプトームでは検出されなかったが、特異的RT-PCRでは発現が見られた。この結果より、特異的な汚染物質代謝に関わる遺伝子の発現は、現場の微生物群全体の発現量に比較すると低レベルである、または遺伝子の保有または発現が一部の微生物種に限られている可能性が示唆される。したがって、このような汚染物質代謝遺伝子群の解析には、特定遺伝子をターゲットとしたより検出感度の高い定量手法が適切であり、網羅解析で検出された汚染に特異的な高発現遺伝子群と組み合わせ、総合的に汚染状況との相関性解析を行う必要があると考えられる。

(5) まとめ

本研究の結果より、メタトランスクリプトーム解析の汚染環境サンプルへの応用は妥当であり、汚染環境中の微生物群集における遺伝子応答発現の網羅的検出手法としての有用性が示された。重金属等による複合汚染環境では、重金属の耐性や代謝に関与する遺伝子の発現が特異的に検出された。それらの遺伝子群の多くは複数の重金属類の輸送に関与しており、有害元素複合汚染特有の毒性に対応する指標マーカーとして有用である可能性が示唆された。今後はさらに複数の汚染環境サンプルの解析を行い、これらターゲット遺伝子の応答発現と汚染状況の総合的解析を進めていく必要がある。

文献1: Microbial community gene expression in ocean surface waters. Frias-Lopez, J. et al. (2008) *PNAS* 105:3805-3810.

文献2: Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of meta-transcriptome. Urich, T. et al. (2008) *Plos One* 3:e2527.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Hamamura, N., R.E. Macur, Y. Liu, W.P. Inskeep, A-L. Reysenbach, (2010) Distribution of aerobic arsenite oxidase genes within the Aquificales. *Interdisciplinary studies on Environmental Chemistry*, 査読無, Vol. 3, 2011, p47-55
- 2) Inskeep, W.P., D.B. Rusch, Z. Jay, M.J. Herrgard, M.A. Kozubal, T.H. Richardson, R.E. Macur, N. Hamamura 他 11 名, (2010) Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal importance of geochemical controls on microbial community structure and function. *PLOS One*, 査読有, Vol. 5, No.3, 2010, e9773

[学会発表] (計 9 件)

- 1) Hamamura, N., Meneghin, J. and Reysenbach, A-L. (2011) Comparative meta-transcriptomic analysis of Aquificales-dominant terrestrial hot springs. ポスター発表、TBI/INL/RCN- Metagenomic Analysis Workshop, Jackson Hole, Wyoming, U.S.A., 1月14日, 講演要旨集, 5.
- 2) 濱村奈津子, (2011): 環境中ヒ素動態に影響を及ぼす微生物群集機能の解析、招待講演、トピア科学シンポジウム「バイオレメディエーション: 微生物群の解析からデザイン化まで」, 名古屋市, 1月28日, 講演要旨集, 5.
- 3) Hamamura, N., Itai, T., Liu, Y., Inskeep, W. P. and Reysenbach, A-L. (2010): Diversity and functional analysis of bacterial communities associated with soda lake in Khovsgol. ポスター発表、日本微生物生態学会第26回大会, つくば市, 11月25日, 講演要旨集, 127.
- 4) Hamamura, N., Meneghin, J. and Reysenbach, A-L. (2010): Comparative meta-transcriptomic analysis of Aquificales-dominant terrestrial hot springs. 口頭発表、The 13th International Symposium in Microbial Ecology, Seattle, Washington, USA, 8月26日, Abstracts, CT35.002.
- 5) Hamamura, N., Meneghin, J. and Reysenbach, A-L. (2010): Comparative

community gene expression analysis of Aquificales-dominant geothermal springs. 口頭発表、第4回日本ゲノム微生物大会, 福岡市, 3月8日, 講演要旨集, 31.

- 6) Hamamura, N., Meneghin, J. and Reysenbach, A-L. (2009): Comparative metatranscriptomics of Aquificales-dominant hot springs. 口頭発表、日本微生物生態学会第25回大会, 広島市, 11月21日, 講演要旨集, 24.

[その他]

- 1) アウトリーチ活動: 微生物生態学会平成22年度大会の一環として催した一般向け公開講座(微生物観察教室)の実行委員として企画運営を行った。(2010年11月23日開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱村 奈津子 (HAMAMURA NATSUKO)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバルCOE 准教授
研究者番号: 50554466