

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430176

研究課題名(和文) 深海熱水孔巻貝による硫化鉄バイオミネラリゼーション遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploration of genes associated with iron-sulfide mineralization in the deep-sea hydrothermal vent snail

研究代表者

高木 善弘 (TAKAKI, Yoshihiro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任技術研究員

研究者番号：10399561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：深海熱水活動域に生息する巻貝、スケーリーフットは、その貝殻および鱗状組織が硫化鉄結晶により覆われたユニークな形態を示す。スケーリーフットのトランスクリプトーム解析は、これまでゲノム解析された他の貝類の遺伝子数と同等の79,669の発現遺伝子配列が構築され、40,501の蛋白質遺伝子が同定された。さらに、組織間の比較トランスクリプトーム解析から、貝殻形成の鍵物質である酸性基質タンパク質、キチン合成酵素が鱗縁辺組織特異的に高発現していることを見出した。最後に、本研究計画にて構築した遺伝子配列情報は、今後の硫化鉄形成メカニズム解明に向けた分子生物学的研究に於いて基盤情報として活用されるはず。

研究成果の概要(英文)：Scaly-foot gastropod is the only creature with mineralized scales made of iron sulfides. The purpose of our research is to explore genes related to a unique biomineralization by comparative transcriptome analysis between 'Black scaly-foot' and 'White scaly-foot'. Sample of scaly-foot gastropod were in situ fixed for RNA preservation. We sequenced the transcriptome of the sclerite, mantle, gill, and foot tissues and generated a transcriptomic database containing 36,698 transcripts sequences (GC content 36.2%). Post-informatics resulted in the prediction of 40,501 protein coding transcripts. Under comparative transcriptomics among tissues, 29 of transcripts showed elevated expression specific to the sclerite tissue. These included genes related to the sclerite formation, such as acidic matrix protein homolog and chitin synthase. Overall, the present study can be saved as the basis for further molecular studies on iron-sulfide mineralization of sclerites.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：バイオミネラリゼーション 共生微生物

1. 研究開始当初の背景

深海熱水孔巻貝“スケリーフット”が、インド洋中央海嶺の「かいいいフィールド」の熱水活動域から発見され、その硫化鉄で覆われた鱗状組織を持つ新奇な形態から注目されている。この鱗状組織は、腹足表面の複合蛋白質層の外側に硫化鉄結晶層が重層した構造をなし、マテリアルとしてもユニークな特性を持つ。この硫化鉄層は、鉄や硫黄の純度の高さや規則正し形成パターンから巻貝により結晶化が制御されていることを示唆している。このように、スケリーフットによる硫化鉄バイオミネラリゼーションは、他の生物には見られない固有の機能であり、特に硫化鉄を制御するという、全く新しい生体結晶化作用として生物学的に興味深く、ナノテクノロジーにおける新たなツール開発、あるいは非常に硬い金属-有機物からなる新たな工学材料開発といった工学のリソースとしても期待されている。申請者らの研究グループは、インド洋中央海嶺の「ソリティアフィールド」の熱水活動域に硫化鉄では覆われていないスケリーフットが生息することを発見し、二つの熱水活動域でのスケリーフットがミトコンドリアの塩基配列から同一種であることを明らかにした。この発見は、硫化鉄層形成の有無による形態的差異をもつ同一生物種での網羅的な遺伝子発現比較研究を可能にし、硫化鉄層形成メカニズムの解明に向けて大きなアドバンテージを与えるものとして期待されていた。

2. 研究の目的

スケリーフットのように研究例が極めて少なく、参照できるゲノム配列がない非モデル生物であっても、近年のハイスループットなシーケンス技術を活用した網羅的なトランスクリプトーム解析により発現遺伝子の配列情報およびその発現量が推測可能になっている。そこで、本研究課題での目的は、硫化鉄バイオミネラリゼーションを示す“黒スケリーフット”と同バイオミネラリゼーションを示さない“白スケリーフット”の両スケリーフットの硫化鉄層形成に関わる組織での遺伝子発現プロファイル比較解析を実施し、硫化鉄バイオミネラリゼーションの有無に対応し変動する遺伝子を探索し、その中から“硫化鉄バイオミネラリゼーション関連遺伝子をリストアップ”する。そして、硫化鉄層形成メカニズムのモデル構築のためのベースラインデータを構築していくことである。

3. 研究の方法

スケリーフットの生息域は、深海熱水活動域に限定されており、生物試料を採取する過程に於ける水圧や温度変化による mRNA 損傷あるいは人工的変動の影響を極力軽減するために、組織 RNA 安定化処理(RNAlater 処理)した生物個体を準備した。白黒両スケリー

フットの硫化鉄層形成組織として外套膜と鱗縁辺部、非形成組織として腹足と鰓組織から全 RNA を抽出し、クオリティーを確認後、保存状態の良い 3 個体分を準備した。ここで解析に複数個体を用いるのは、発現遺伝子の個体間差を極力、低減するためである。つづいて、全 RNA から、rRNA 特異的除去方法により mRNA を調整し、次世代シーケンサー Ion PGM 用の RNA-seq ライブラリーを作成した。各組織からのシーケンスライブラリーにつき、2,000 万シーケンスリード以上、全体として 4Gb 以上のシーケンスを解読した。全組織を網羅しかつ発現遺伝子の完全長配列を構築するため、各組織からの全シーケンスデータを統合して Trinity プログラムにより「de novo transcriptome assembly」を行った。続いて、組織毎のシーケンスリードを再度、発現遺伝子配列に対してマッピングし、遺伝子の発現量を推定した。この遺伝子発現量を正規化し、組織間比較を実施し、硫化鉄層形成に対応し発現量が変動する遺伝子、すなわちバイオミネラリゼーション関連遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) 現場固定による全 RNA 調整方法の確立
深海熱水活動域からのスケリーフット採取過程の影響を軽減し、深海生息環境での遺伝子発現プロファイルを作成することを目的として、スケリーフット個体の深海現場環境での組織 RNA 安定化処理を施した。抽出した全 RNA は、Bioanalyzer により 18S 由来のピークのみ検出され、28S 由来は検出されなかった。この事象は、rRNA が破損されているためではなく、理由は分からないが他の軟体生物からの RNA においても同様に 28S が検出されない例が報告されている。18S および 28S rRNA の定量値比(RIN 値)としては、6.3 以上であることから品質は、RNA-seq 解析に供与できるものであり、現場環境での安定化処理の有効性が確認できた。

(2) RNA-seq からのスケリーフット遺伝子カタログ

全組織からの RNA-seq シーケンスリード統合した約 2 億リードを使用し、Trinity プログラムにより、アセンブルを実施した結果、79,669 転写配列(全塩基 67.0 Mb、N50 1526 bp、GC 含量 36.2%)が構築され、40,501 個の CDS が予測された。これら CDS の内 75% が、NCBI nr データベースに対してホモログ遺伝子が見出された。さらに、MEGAN プログラムにより、45% の CDS の機能が同定され、KEGG 機能カテゴリー分類すると Metabolism が 11.7% と最も多く、Organismal Systems が 8% と続き、Genetic Information Processing と Environmental Information Processing は、共に約 4% の CDS が割り振られた(図 1 参照)。

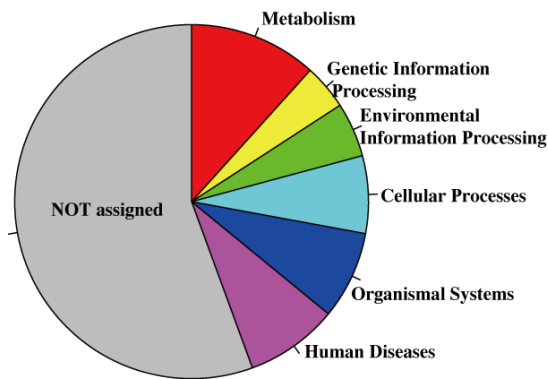


図1 スケリーフット発現遺伝子の機能カテゴリー分布

(3) 黒スケリーフットの組織間遺伝子発現比較

黒スケリーフットの硫化鉄層形成組織として外套膜と鱗縁辺部、非形成組織として腹足と鰓組織における RNA-seq シーケンスデータから TMM(Trimmed Mean of M values)正規化し、遺伝子発現マトリックスを作成した。外套膜、腹足、鰓の3つの組織間の発現プロファイルは、ピアソン相関係数で 0.977~0.994、スペルマン順位相関係数で 0.617~0.757 の相関を示した。一方、鱗縁辺部は、これら組織とは比較的低い相関(ピアソン相関係数で 0.887~0.908、スペルマン順位相関係数で 0.403~0.445)を示し、鱗縁辺部が他の組織と比べより特異的な発現パターンをもつことが示唆された。

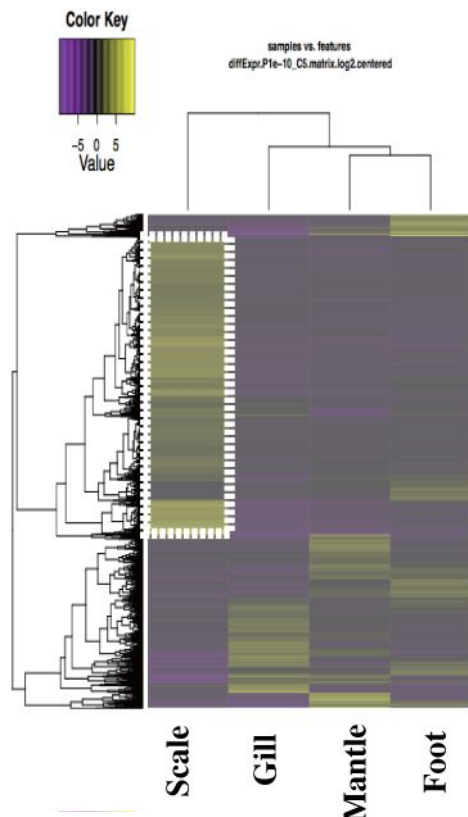


図2 組織間遺伝子発現比較

さらに、鱗縁辺部と他の組織との遺伝子発現比較から、鱗縁辺部において約 3108 個の転写配列が統計的に有意な特異的発現上昇 (>10 fold-change, p-value: < 1e-3)していることが明らかになった(図2参照)。これら転写配列には、貝殻形成の鍵物質である酸性基質タンパク質遺伝子、キチン合成酵素、コンドロイチン合成酵素、コラーゲンなどの一般的に細胞外マトリックスの構成因子に關与する遺伝子が多くコードされていた。

(4) 白黒スケリーフットの鱗縁辺部の遺伝子発現プロファイルの比較

白スケリーフットからの鱗縁辺部、外套膜、腹足、鰓組織から RNA-seq ライブラリーを作成し、各組織から 400~500 万リードをシーケンスし、黒スケリーフットのトランスクリプトーム解析から構築された全転写配列に対してマッピングを行った。その結果、90%以上のシーケンスリードがマッピングされた。白黒スケリーフットの両ミトコンドリア COI 遺伝子配列が一致したことから遺伝的距離が近いことが示されていたが、トランスクリプトーム解析からも遺伝子領域配列においても完全一致あるいは数%以下の塩基配列差異しかないことが示された。また、組織間の発現比較から黒スケリーフットと同様に、酸性基質タンパク質遺伝子、キチン合成酵素遺伝子の鱗縁辺部組織特異的な発現上昇が確認された。一方、両スケリーフットの鱗縁辺部からの遺伝子発現プロファイルは、比較的高い相関(ピアソン相関係数: 0.977~0.983、スペルマン順位相関係数: 0.727~0.764)が示され、統計的に有意(p value: < 1e-3)な発現変動する遺伝子は見出せなかった。

形態型(morphotypes)が異なる白黒スケリーフット間に於いて遺伝的差異が殆ど無いことから、トランスクリプトーム解析から形態型の違いを導く遺伝子発現変動を見出す可能性を示した。しかしながら、形態型による変動遺伝子の発見には至らなかった。その理由としてシーケンスが不十分であった可能性が考えられ、今後、更にシーケンス量を増加した比較解析を実施していき、スケリーフットの硫化鉄バイオミネラリゼーション形成に關与する遺伝子を特定に繋げてく。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 善弘 (TAKAKI, Yoshihiro)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任技術研究員
研究者番号： 10399561

(2) 連携研究者

布浦 拓郎 (NUNOURA, Takurou)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・グループリーダー
研究者番号： 60359164

和辻 智郎 (WATSUJI, Tomo-o)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・研究員
研究者番号： 50409091