

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04843

研究課題名(和文) 深海底熱水活動域が育む微生物共生系：第三の分子生物学で紐解く生物間相互作用

研究課題名(英文) Symbiosis in deep-sea hydrothermal fields: using glycomics to better understand host-symbiont interactions.

研究代表者

中川 聡 (Nakagawa, Satoshi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70435832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、深海底熱水活動域において強固な共生関係にある微生物(Epsilonproteobacteria)と大型生物の相互作用・相互認識機構を分子レベルで解明することを主要目的としている。特に幅広い生物間相互認識に関わることが知られている糖鎖とその修飾タンパク質に注目し研究を進めた。本研究では深海底熱水活動域に見られる複数の共生系(細胞外共生系から細胞内共生系)において、複数の糖鎖とその修飾分子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は主に高等生物の病理学・生理学分野でこそ重要な研究対象として認識されているが、海洋の微生物生態学的研究では注目されてこなかった。本研究は、深海底における異種生物間の分子コミュニケーション手段の研究を通じて、人類に最も蔓延する病原性微生物の誕生過程の解明、共生(感染)メカニズムを標的とした画期的な治療法の開発に益する知見を得た。深海の共生系は、共生と感染の分子機構の類似性を進化の時間軸を加味して研究する絶好のモデルであり、本研究の成果は極めて独創的かつ進化学・病理学といった幅広い研究分野への波及効果が極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this study is to reveal the molecular mechanisms underlying epsilonproteobacterial symbioses in deep-sea hydrothermal fields. We in particular have focused on glycans and glycoproteins which play important roles in various host-symbiont interactions. We identified some sugar chains and glycoproteins in both episymbiosis and endosymbiosis.

研究分野：微生物生態学

キーワード：糖鎖 共生 深海底熱水活動域

様式C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物は、時に特定の大型生物と強固な共生関係を構築し、自由生活型微生物とは異なる独自の進化をたどりながら、宿主に新たな生理機能を付与するなど、幅広い生物の進化史や現在の生理生態において重要な役割を担っている。自然界には数多の微生物共生系が見られるが、特に限定的組合せでありながら相助的(共生関係を構築する宿主と共生微生物の種類が限定的でありながら、絶対的共生ではない)共生系において、微生物と大型生物間の相互作用や相互認識に関する分子レベルの知見は限られている。

深海底熱水活動域は、多様な大型生物が特定の微生物と強固な共生関係にあり、微生物と大型生物間の相互作用・相互認識の研究にとって最適のフィールドである。現場に固有の大型生物群は全て「環境獲得型」の相利共生、即ち卵の段階では共生微生物を保持せず、発生初期に環境中から共生微生物(例えば Epsilonproteobacteria と呼ばれる系統群)を選抜し、細胞内あるいは細胞外に宿すが、その分子機構は全く知られていない。Epsilonproteobacteria と呼ばれる深海特異の共生菌が、よく研究されてきた陸上や海洋表層のモデル共生菌(Alphaproteobacteria や Gammaproteobacteria)と決定的に異なるのは、宿主域や共生形態が多様(甲殻類に細胞外共生、巻貝に細胞内共生、単独で自由生活も可能) 宿主生物の全栄養を賄う化学合成微生物である(熱水活動域において宿主は口と肛門を退化させる例すらある) 病原性は無いが病原性微生物の祖先的性質を有する、の3点である。

深海底熱水活動域に優占する Epsilonproteobacteria は、極めて特異な糖鎖合成経路を有し(分子タグ)一方宿主の体内に糖鎖認識タンパク質(レクチン)が多量発現している(検出器)。当該糖鎖合成経路は、全真核生物が持つことで知られるが、真正細菌では病原菌 Campylobacteriales (カンピロバクター[腸炎等の原因菌、米国だけで年間 300 万件]やピロリ菌[胃潰瘍や胃癌原因菌、感染人口>30 億人]等を含む Epsilonproteobacteria の一員。深海のものとは進化的に近縁)に多く存在し、感染成立と疾病の慢性化を担う病原因子とされる(即ち糖鎖による分子擬態と考えられる)。深海微生物の糖鎖合成経路は、人類に蔓延する病原菌の病原因子のコアでもあるため、深海微生物における糖鎖とその修飾タンパク質の組合せを解明することは喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

本研究は「深海において特定の微生物(Epsilonproteobacteria)と無脊椎動物(甲殻類および巻貝)の共生関係は如何に成立するか?」という帰納的探求が困難な難問に、「微生物の糖鎖(=生物のタグ)と修飾タンパク質の組み合わせが、“共生”成立の鍵(換言すれば病原性微生物の“感染”機構の進化的プロトタイプ)である」という仮説から演繹的に突破口を切り開くものである。

3. 研究の方法

本研究は、グライコミクスの手法を駆使して、深海底における共生微生物-大型生物間の相互作用を分子レベルで解明する。具体的には、研究の期間内において第1ターゲット:共生 Epsilonproteobacteria の関わる細胞“外”共生系、即ち全ゲノム解析を終了している分離株と飼育中の宿主の共生系を対象として、微生物特異糖鎖の生合成経路解析、糖タンパク質の機能・修飾様式の解析を多元的に展開し、確立した方法論を第2ターゲット:細胞“内”共生系に適用することで、深海底における異種生物間相互作用の分子機構を糖鎖生物学の観点から比較・体系化することを目指した。

4. 研究成果

まず、深海底熱水活動域に固有の化学合成微生物群が有する糖鎖関連遺伝子群の機能解析を進めた。以前実施した調査航海において、中部沖縄トラフに位置する深海底熱水活動域(水深は約 1000m、最高温度は 311 度の熱水が噴出している)から採取し飼育中の甲殻類(ゴエモンコシオリエビと呼ばれる。腹部剛毛に莫大な付着共生微生物を有する)を主要な解析対象とし、主に(a)メタゲノム解析による糖鎖関連遺伝子クラスターの同定、(b)糖鎖関連酵素の発現・精製、(c)糖鎖関連酵素の生化学的性状解析を実施した。(b)において、大腸菌の形質転換および発現誘導・精製が想定より困難であったが、無細胞系を用いることにより性状解析に足る量の糖鎖関連酵素群を取得することに成功した。

次に、深海底熱水活動域に固有の化学合成微生物群が有する糖鎖修飾タンパク質の機能解析を進めた。これまでの研究において性状解析を進めてきた複数の Epsilonproteobacteria 分離株に加え、ゴエモンコシオリエビ共生菌を主要な解析対象とし、主に高速・高質量分解能の質量分析計を用いて、グライコム・プロテオーム同時解析を実施した。本解析により網羅的な糖鎖構造解析と糖鎖修飾タンパク質の同定が可能となりつつあるが、糖鎖のシグナルが弱く分析条件の最適化を進めた。

さらに、深海底熱水活動域に固有の細胞内共生微生物が有する糖鎖関連遺伝子群の機能解析を進めた。具体的には、これまで申請者が実施した調査航海において、インド洋中央海嶺等から採取した巻貝を主要な解析対象とし(特にアルピンガイと呼ばれる巻貝。本共生系では、既に主要共生微生物系統群に近縁な Epsilonproteobacteria の分離培養・性状決定・ゲノム解析に成功しているためである)、共生微生物と分離培養株を比較しながら、主に(a)メタゲノム解析によ

る糖鎖関連遺伝子群の同定、(b)糖鎖関連酵素の発現・精製、(c)糖鎖関連酵素の性状解析を実施した。

最後に、上記の細胞内共生系を対象として、当該共生系における糖鎖修飾タンパク質の同定・性状解析を実施した。細胞内共生 *Epsilonproteobacteria* と系統的に近縁な分離株を対照としながら、主にグリコプロテオーム解析の手法を応用して(a)糖鎖修飾タンパク質の機能・局在性の解明、(b)タンパク質における糖鎖修飾部位の同定を試みた。アミノ酸配列から想定される糖鎖修飾タンパク質よりは少ないものの、複数の糖鎖修飾タンパク質について、機能・局在性や修飾部位といった糖鎖生物学的知見を得ることに成功している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mino Sayaka, Yoneyama Naoki, Nakagawa Satoshi, Takai Ken, Sawabe Tomoo	4. 巻 6
2. 論文標題 Enrichment and Genomic Characterization of a N ₂ O-Reducing Chemolithoautotroph From a Deep-Sea Hydrothermal Vent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2018.00184	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 Sinninghe Damste Jaap S., Rijpstra W. Irene C., Foesel Barbel U., Huber Katharina J., Overmann Jorg, Nakagawa Satoshi, Kim Joong Jae, Dunfield Peter F., Dedysh Svetlana N., Villanueva Laura	4. 巻 124
2. 論文標題 An overview of the occurrence of ether- and ester-linked iso-diabolic acid membrane lipids in microbial cultures of the Acidobacteria: Implications for brGDGT paleoproxies for temperature and pH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organic Geochemistry	6. 最初と最後の頁 63 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.orggeochem.2018.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagata Ryousuke, Takaki Yoshihiro, Tame Akihiro, Nunoura Takuro, Muto Hisashi, Mino Sayaka, Sawayama Shigeki, Takai Ken, Nakagawa Satoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Lebetimonas natsushimae sp. nov., a novel strictly anaerobic, moderately thermophilic chemoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest in the Mid-Okinawa Trough	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Systematic and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 352 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.syapm.2017.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muto Hisashi, Takaki Yoshihiro, Hirai Miho, Mino Sayaka, Sawayama Shigeki, Takai Ken, Nakagawa Satoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 A Simple and Efficient RNA Extraction Method from Deep-Sea Hydrothermal Vent Chimney Structures	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 330 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17048	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 Nakajima Yuichi, Shinzato Chuya, Khalturina Mariia, Nakamura Masako, Watanabe Hiromi Kayama, Nakagawa Satoshi, Satoh Noriyuki, Mitarai Satoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite loci for the deep-sea hydrothermal vent limpet, <i>Lepetodrilus nux</i> , and the vent-associated squat lobster, <i>Shinkaia crosnieri</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Marine Biodiversity	6. 最初と最後の頁 677 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12526-017-0704-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Junichi, Kawagucci Shinsuke, Makabe Akiko, Takahashi Ayu, Kitada Kazuya, Torimoto Junji, Matsui Yohei, Tasumi Eiji, Shibuya Takazo, Nakamura Kentaro, Horai Shunsuke, Sato Shun, Ishibashi Jun-ichiro, Kanzaki Hayato, Nakagawa Satoshi, Hirai Miho, et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Deepest and hottest hydrothermal activity in the Okinawa Trough: the Yokosuka site at Yaeyama Knoll	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 171570 ~ 171570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.171570	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 Akira Inoue	4. 巻 291
2. 論文標題 Discovery of a Novel Alginate Lyase from <i>Nitratiruptor</i> sp. SB155-2 Thriving at Deep-sea Hydrothermal Vents and Identification of the Residues Responsible for its Heat Stability	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 15551-15563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M115.713230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sayaka Mino	4. 巻 11
2. 論文標題 Endemicity of the cosmopolitan mesophilic chemolithoautotroph <i>Sulfurimonas</i> at deep-sea hydrothermal vents	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ISME J	6. 最初と最後の頁 909-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ismej.2016.178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Muneyuki Fukushi
2. 発表標題 Ecophysiology of a novel thermophilic N ₂ -reducing epsilonproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal field
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Tominaga
2. 発表標題 Distribution pattern of microbial communities in the shallow-water hydrothermal field off Kueishan Island, Taiwan.
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 聡
2. 発表標題 海洋の極限環境に生息する微生物の生理生態学的研究
3. 学会等名 2018年度海洋若手研究集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 貴大
2. 発表標題 深海工ヒ鉗脚に付着する多毛類の生態学的・系統学的研究
3. 学会等名 極限環境生物学会2018年度（第19回）年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Nakagawa
2. 発表標題 Deep-sea vent bacteria: who's there, what are they doing, and what's new?
3. 学会等名 Symposium of Integrative Biology: Biodiversity in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神崎隼人
2. 発表標題 中部沖縄トラフ熱水活動域海底下における微生物群集構造と生理機能
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川聡
2. 発表標題 海洋の極限環境に生息する難培養微生物の生理生態的研究
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 美野さやか
2. 発表標題 深海底熱水活動域に生息するコスモポリタン微生物の集団ゲノミクス解析
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川聡
2. 発表標題 しんかい16500の覚悟で臨む海洋(微)生物研究
3. 学会等名 京都大学 生態学研究センター シリーズ公開講演会 第9回(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 聡
2. 発表標題 深海底熱水活動域に優占する化学合成共生微生物の生存戦略と進化
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部第1回講演会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中川 聡
2. 発表標題 深海底熱水活動域に優占する化学合成共生微生物の多様性と進化
3. 学会等名 日本進化学会第18回大会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 So Fujiyoshi
2. 発表標題 Unique morphological features of deep-sea endemic crab ventral setae.
3. 学会等名 5th INTERNATIONAL WORKSHOP ON DEEP SEA MICROBIOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sayaka Mino
2. 発表標題 Population genetics and phenotypic differences of cosmopolitan mesophilic Sulfurimonas at deep-sea hydrothermal vents
3. 学会等名 5th INTERNATIONAL WORKSHOP ON DEEP SEA MICROBIOLOGY
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 武藤 久
2. 発表標題 環境RNAを用いた微生物相解析：熱水活動域チムニーの場合
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 永田 亮佑
2. 発表標題 深海底熱水活動域から分離した新規イプシロンプロテオバクテリアの生理生態学的性状
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤吉 奏
2. 発表標題 深海底熱水活動域に生息する固有甲殻類の共生器官”腹部剛毛”の構造的特徴
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 美野 さやか
2. 発表標題 深海底熱水活動域に普遍的に生息する化学合成独立栄養細菌の生物地理学的特徴の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会第31回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 武藤 久
2. 発表標題 深海底熱水活動域に形成されるチムニー構造物微生物からのRNA抽出～RNAを用いた微生物相解析を目指して
3. 学会等名 極限環境生物学会2016年度（第17回）年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 武藤 久
2. 発表標題 中部沖縄トラフで発見された熱水活動域ノホサイトの微生物学的研究：新規微生物の分離培養とRNAを用いた微生物相解析
3. 学会等名 ブルーアース2017
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----