

機関番号：82706
 研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20310124
 研究課題名 (和文) 地下深部生命圏の遺伝子資源保全へ向けた環境ゲノム調整法と多様性解析
 研究課題名 (英文) Preparation method of environmental DNA sample for conservation of the genetic resource in the deep subsurface biosphere and analysis of biodiversity harbored in the DNA
 研究代表者
 高見 英人 (TAKAMI HIDETO)
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー
 研究者番号：70359165

研究成果の概要 (和文)：

下北半島東方沖掘削コアサンプルを中心に環境ゲノム調整法を検討したところ、抽出される DNA 量は掘削深度と共に減少するが、DNA 量から予測される菌数と顕微鏡観察による結果との間に大差なく、DNA 調整法はほぼ確立出来たと考えられる。次に、調整 DNA 5 サンプルの多様性解析を 16S rDNA 組成と遺伝子から予測される代謝ポテンシャルに基づいて解析したところ、100m までの深度では JS1 や *Chloroflexi* に属する菌種が全層準で見られた。各深度から 6~8 万遺伝子が同定され、浅層準では硫酸呼吸関連遺伝子、中層準ではメタン合成関連等の遺伝子が特徴的であった。

研究成果の概要 (英文)：

We attempted to extract environmental DNA mainly from ocean drilling core samples recovered offshore Shimokita Peninsula. The extracted DNA decreased with increasing of depth but the estimated cell number from DNA amount was not so different from those counted by microscopy. Thus, It is though that the DNA extraction method was almost successfully established. We also analyzed to figure out biodiversity based on 16S rDNA and the predicted metabolic potential from the identified genes in the DNA samples. JS1 and *Chloroflexi* were found to be predominant taxa as described previously up to a depth of 100m. In each DNA sample from different depth, 60,000-80,000 genes were identified. The sulfur respiration-related genes and methanogenesis-related genes were highlighted in shallower and deeper horizons, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：ゲノム科学、微生物生態学、環境微生物学
 科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学
 キーワード：ゲノム資源、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、海底下掘削コアサンプル

における生物多様性を評価する方法としては PCR により増幅された 16S rDNA による系

統解析が主流で、得られる情報の多くが実際に培養出来ていない難培養性微生物由来のものであるため、実際の地下深部環境におけるゲノム、代謝的ポテンシャルに関する情報は殆ど得られていなかった。また、掘削コアサンプルからの DNA 抽出に関しても、その方法論が確立しておらず、抽出された DNA の評価も困難であった。一方、当時の次世代シーケンサーによる配列長は 100 base 程度と短く、これを用いたメタゲノム解析から多くの遺伝子情報を得ることはまだ困難な状況であった。

2. 研究の目的

本研究は、当初一部の限定された優先種が占める環境の微生物多様性解析を可能にする DNA 調整法を確立し、下北半島東方沖掘削コアサンプル中の微生物多様性を明らかにすることを目的とした。しかし、研究を進めて行く過程で、優先種として考えられていた既知細菌は、本研究で用いられたアクロモペプチダーゼに混入していた大量の DNA によるものと判明した。結局、この DNA は当初溶菌酵素として用いられていたアクロモペプチダーゼ生産菌に由来することがわかったが、ラベルに書かれていた生産菌名が誤同定であったため、その発見が遅れてしまった。そこで当初の予定を一部変更し、地下生命圏の遺伝子源保全とその利用を考える意味で重要な環境 DNA の抽出法について詳細に検討を行い、出来るだけ偏りのない抽出効率のよい DNA 抽出方法を確立することを目的とした。更に、本研究に用いた下北半島東方沖掘削コアサンプルの微生物多様性を単に PCR 増幅による 16S rDNA 配列の系統解析だけではなく、コアサンプル中にある潜在的代謝ポテンシャルから明らかにすることを本研究の目的とした。また、逆にこれまで未培養であった微生物種が優先種である場合については、出来るだけ未培養菌ゲノムの再構築を試み、代謝系に基づく特徴付けを行うことにも注力した。

3. 研究の方法

(1) 掘削コアサンプルからの DNA 抽出

掘削コアサンプルからの DNA 抽出は、出来るだけ DNA を断片化せずに高い抽出効率を得るため、ビーズビート法による物理的破碎と溶菌酵素による酵素的破壊の 2 つのステップを組み合わせることによって行った。ビーズビート法については、本研究にて購入したシェイクマスターオートを用い、ビート時間を 1, 3, 5, 10 分と 4 段階行い、抽出後の DNA の断片化状態を確認した。溶菌については、Lysozyme を用い 37°C で 1 時間反応させた後、SDS と Proteinase K を加えて 55°C で更に 1 時間反応させた後、ニッ

ポンジーン社製の ISOIL for Large と Toyobo 社製の MagExtractor を組み合わせて DNA の精製を行った。DNA の抽出に用いたコアサンプルは、0.7m, 5m, 18.5m, 48m, 107m の 5 層順から回収されたものを用いた。

(2) DNA の増幅

(1) で少量の DNA しか抽出出来なかった層準については、GE Healthcare 社製の GenomiPhi vr2 DNA amplification kit を用いて DNA 増幅を行った。増幅した DNA を用いた 16S rDNA の PCR 増幅を行い、増幅前後での DNA のチェックを行った。

(3) ショットガンライブラリーの作製と塩基配列決定

(1) で抽出された、(2) で増幅された DNA を用いて、ショットガンライブラリーの作製を行った。ライブラリーはホストに大腸菌を用いて行い、塩基配列決定はサンガー法で ABI 社製の DNA sequencer 3730 を用いて行った。

(4) 塩基配列のアセンブルと遺伝子予測

塩基配列のアセンブルは PCAP を用い、遺伝子予測は、MetaGene Anotator を用いて行った。また、遺伝子機能推定は nr-na に対する blast search を行い、KEGG でアサインされている KO family に属する遺伝子と塩基配列から予測された全遺伝子とでクラスタリングを行い、遺伝子のグルーピングを行った。

(5) メタゲノム配列データからの代謝予測

メタゲノム配列からの代謝予測は(4)で予測された遺伝子を KEGG 代謝マップに blast ベースで貼付けることによって行った。また、優先種のゲノム配列については、KEGG 代謝マップ以外にも MetaCyc (Encyclopedia of metabolic map) を用いて予想される代謝マップの構築を行った。

4. 研究成果

(1) DNA の抽出

ビート時間を 1, 3, 5, 10 分を行った結果、1-3 分では DNA の抽出効率が低く、10 分では DNA の断片化が顕著に見られたので、ビート時間は 5 分と設定し、更に Lysozyme, Proteinase K による溶菌酵素処理を行って DNA を抽出した。その結果、最も掘削深度が浅い 0.7m では 420 ng/g-core、最も深い 107m では 8.3 ng/g-core と約 50 倍の差が見られた。コア中に棲息する微生物の平均ゲノム長を仮に 3 Mb とすると、1 細胞当たりの DNA 量が 3 fg となるので、抽出された DNA 量は、約 1.7×10^8 (0.7m) - 2.7×10^6 cells/g-core (107m) と見積もられた。検鏡

によって実際計測された細胞数は、107m 付近で約 8×10^6 cells/cm³ なので両者に大きな違いは見られなかった。したがって、本法による DNA 抽出は概ねコア中に存在する微生物由来のゲノムを反映しているものと考えられる。

(2) 16S rDNA に基づく微生物多様性

3. (1) で抽出された DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子のコンセンサプライマーを用いて増幅された PCR 産物をクローン化し、各層準から sequencing された約 1000 クローンの塩基配列に基づいて多様性解析を行った。その結果、クローン数ベースでは、どの層準でも JS1 に属す

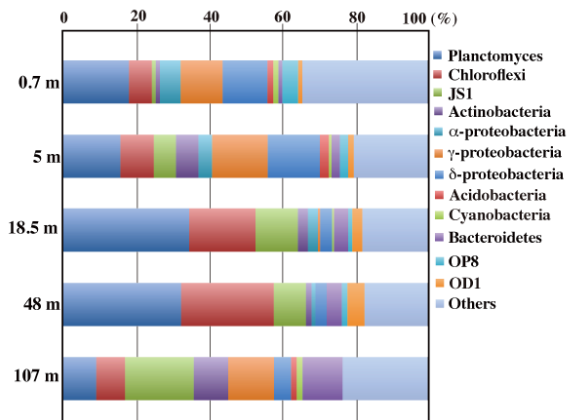


図 1. 下北半島東方沖掘削コアの 16SrDNA に基づくバクテリアの多様性解析。%は OUT 数の割合を示す。

るバクテリアの割合が最も高く、全体の 35-55% を占めていたが、98% 以上の similarity を同種とした OUT (operational taxonomic unit) ベースでは *Planctomyces* や *Chloroflexi* の割合が増加し、特に、18.5m と 48m ではその傾向が強かった(図 1)。各層準で検出されたバクテリアが帰属する Phylum の種類には大きな違いは見られなかったが、その割合は、層準ごとに異なりバクテリアの多様性は深度によって大きく異なることがわかった。アーキアについては、どの層準においても FCG1 や *Thermoplasmata* に帰属するものの比率が高いが、OUT 数はバクテリアと比べると少なく最も浅い 0.7m では約 1/3 程度であった。

(3) メタゲノム配列解析

3. (1) で抽出された、あるいは 3. (2) で増幅された DNA を用いてショットガンライブラリーを作製し、各コアサンプル由来のライブラリーのうち 1 万クロンの両端配列をサンガー法にて sequencing した。その結果をまとめた後、最終的に 4 万クロンの両端配列の sequencing を終了した。表 1 は、深度別に採取された各コアサンプルから見出された遺

伝子の内訳を示したものであるが、配列の総塩基長は約 50-55 Mb でアセンブル後の圧縮率は約 70-87% と低かったことから、16S rRNA 遺伝子に基づく多様性解析結果と同様に本サンプルに含まれる微生物の多様性が高いことがあらためてわかった。各深度からは約 63,000-86,000 遺伝子が見出され、全配列中に含まれる 16S rRNA 遺伝子の割合は 0.02-0.07% であった(表 1)。次に、全ての深度から見出された遺伝子と既知生物種由来の遺伝子を合わせてクラスタリング解析を行った。クラスタリング解析においては公共ゲノムデータベースの一つである KEGG でオノロググループとしてアサインされている KO 遺伝子をクラスタリング結果を評価する際の指標とし、基本的に 1 クラスターに 1 KO 遺伝子が含まれる様にクラスタリング条件を設定した。その結果、全層準由来の約 36 万遺伝子は 122,219 グループに分けられ、そのうち 16,594 グループ(13.6%) は既知ゲノム由来の遺伝子を含むグループであった。また、これらグループには全層準由来の遺伝子の半数が含まれていた。一方、層準間で比較してみると、3,150 (2.6%) グループが全層準に共通であり、全層準由来遺伝子の約 40% の遺伝子が含まれていた。これらグループに含まれる遺伝子を層準ごとに調べた結果、遺伝子数には大きな偏りが見られたと同時に各層準には特徴的なグループが存在し、それら遺伝子機能は多岐にわたっていた。特に、浅層準では硫酸呼吸関連遺伝子、中層準ではメタン合成関連等の遺伝子が特徴的であった。

表 1. コアサンプルから見出された遺伝子の内訳

サンプル ID	深度 mbsf	リード	総塩基長 Mb	アセンブル Mb	CDS 数	コード領域 %	16S rRNA %
1H1	0.7	77,439	54.9	48.8 (87%)	86,363	82.5	0.045
1H4	5	76,953	51.3	37.6 (73%)	67,494	77.5	0.023
3H2	18.5	76,004	48.9	39.9 (81%)	73,184	77.8	0.034
6H3	48	76,651	49.1	37.1 (75%)	67,202	73.0	0.040
12H4	107	76,301	48.9	35.2 (72%)	63,711	73.5	0.067

(4) メタゲノム配列からの代謝能探索

メタゲノム配列から見出された遺伝子がどのような代謝に関与しているのかを調べるため、KEGG の代謝 pathway を構成する遺伝子との相同性検索を行い、各層準間での KEGG pathway の充足率の違いを検討した。その結果、代謝マップによっては、それを構成するに必要な遺伝子の充足率に大きな差が見られるものもあり、現在層準間に差が見られた代謝 pathway については更に検討中であ

る。一方、CO₂を固定し、methano- genesis や acetogenesis に関与するアセチル-CoA pathway を構成するに必要な遺伝子群が全ての層準において検出された。また、同様の方法論を用いて、下北半島東方沖掘削コアサンプルとは別に解析が進められ、地下鉱山の熱水環境に繁茂するバイオマットに由来するメタゲノム配列からほぼ再構築された優先種のゲノム中にもアセチル-CoA pathway を構成するに必要な遺伝子群が全て見出された。

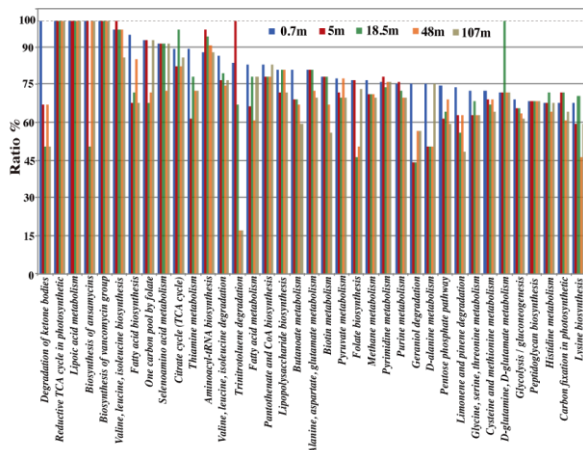


図 2. 深度別に見出された遺伝子の KEGG pathway を構成する遺伝子の充足率 (KEGG に登録されている 146 の代謝マップのうちの一部)

(5) 結論

一般に、メタゲノム解析において環境中における微生物の多様性を 16S rRNA 遺伝子に基づいて解析する際、一部の優先種が存在する場合はまずそれに由来する DNA を出来るだけ取り除く方が効率的である。しかし、本研究開始当初予想されていた既存の優先種は、本研究で用いられたアクロモペプチダーゼに大量に混入していた DNA に依存することが原因と判明した。したがって、優先種ゲノムの除去法を検討するよりは、地下生命圏の遺伝子源保全とその利用を考える意味で重要な環境 DNA の抽出法について詳細な検討を加えるべきと考え、出来るだけ偏りのない抽出効率のよい DNA 抽出方法を本研究においてほぼ確立した。一方、仮に優先種がいた場合でもそれが未培養菌である場合は、そのゲノム情報を得ることは微生物生態系における優先種の役割等を知る、また培養方法を検討する意味でも極めて重要である。そこで、環境中に明らかに既知種が優先種として存在する場合以外は、あえて優先種に由来する DNA を除く必要がないと判断した。環境中に構築された微生物コミュニティの特徴を理解する上で、代謝ポテンシャルを知ることが極めて重要なアプローチの一つである。しかしながら、これまでは代謝マップレベルでの解析がなされた例がなかったため、本研究

においては KEGG の代謝マップを用いた方法により特徴付けを行った。その結果、今後更なる検討が必要ではあるが、本研究で用いた下北半島東方沖掘削コアサンプルの代謝レベルでの特徴付けを行うことに成功した。本研究における成果は、今後のメタゲノム解析における一つのスタンダードとなりうるものと考えられる。

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 Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Takami H. 他 14 人中 14 番目. Insights into the evolution of *Archaea* and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal division. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2011, 3204-3223 査読有り
- ② 布浦拓郎, 高見英人, 地下生命圏におけるメタゲノム解析, バイオインダストリー, 査読なし, 25, 2008, 61-69.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 坪内泰志, 多様性指数から見たアーキア菌叢層序変遷, 日本ゲノム微生物学会, 東北学院大学, 2011 年 3 月 12 日
- ② 西真郎, メタゲノム解析から見えるマリアナ海溝最深部の優先種ゲノム, 日本ゲノム微生物学会, 東北学院大学, 2011 年 3 月 12 日
- ③ 坪内泰志, 海洋性堆積物 365m 鉛直プロフィールはアーキアとの生息域の相関を解く手がかりとなるか, 日本微生物生態学会, 筑波大学, 2010 年 11 月 25 日
- ④ 高見英人, Candidate division OP1 は祖先的 acetyl-CoA pathway を有する好熱性 acetogen, 日本微生物生態学会, 筑波大学, 2010 年 11 月 25 日
- ⑤ 西真郎, メタゲノム解析から見える世界最深部マリアナ海溝底泥の微生物生態系, 日本微生物生態学会, 筑波大学, 2010 年 11 月 24 日
- ⑥ 西真郎, 下北半島掘削コアのメタゲノム解析から見える微生物代謝の可能性, 日本ゲノム微生物学会, 九州大学, 2010 年 3 月 8 日
- ⑦ 坪内泰志, 16S rRNA 遺伝子のコンセンサス配列の差異に基づく下北半島掘削コアからの archaea の探索, 日本ゲノム微生物学会, 九州大学, 2010 年 3 月 8 日
- ⑧ 高見英人, OP1 様細菌に支持される微生物マットのメタゲノム解析, 日本ゲノム微生物学会, 九州大学, 2010 年 3 月 8 日
- ⑨ 高見英人, メタゲノム解析から見た掘削コアの遺伝子多様性, 日本微生物生態学会,

2009年11月21日, 広島大学

⑩ Takami H., Metagenomics in the deep subsurface environments. The 8th International Workshop on Advanced Genomics. (**Invited speaker**) 2009年5月20日, National Center of Science, Tokyo

⑪ 坪内泰志, primer mismatching を介した希少アーキアの探索, 日本ゲノム微生物学会, 中央大学, 東京 2009年3月5日

⑫ 高見英人, 下北半島東方沖掘削コアのメタゲノミクス, 日本微生物生態学会, 2008年11月26日, 北海道大学, 札幌

⑬ Takami H., Metagenomic analysis of deep subsurface core samples collected in an offing of the Shimokita Peninsula on the northwest Honshu, Japan. ISSM 2008, 2008年11月18日, グランシップ, 静岡

⑭ Takami H., Metagenomic analysis of deep subsurface environments. Metagenomics 2008 (**Invited speaker**), 2008年11月5日, UC San Diego, USA

⑮ Takami H. Metagenomic analysis of deep subsurface core samples collected in an offing of the Shimokita Peninsula on the northwest Honshu, Japan. ISME12, 2008年8月20日, ケアンズコンベンションセンター, オーストラリア

⑯ 高見英人, 地下深部をメタゲノムから探る, 文科省特定領域研究「ゲノム研究」主催シンポジウム 新しいシーケンス技術とメタゲノム解析のインパクト (招待講演) 2008年5月28日, 東京大学 弥生講堂

[図書] (計3件)

① 高見英人, 岩波書店, 極限環境生物学, 2010年, 89-132.

② 高見英人, 高木善弘, CMC 出版, メタゲノム解析技術の最前線, 2010年, 95-107.

③ 高見英人, CMC 出版, マリンメタゲノムの有効利用, 2009年, 104-122.

[その他]

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/xbr/emrt/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 英人 (TAKAMI HIDETO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号 : 70359165

(2) 研究分担者

堀 沙耶香 (HORI SAYAKA)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号 : 20470122 (2008年度)

坪内 泰志 (TSUBOUCHI TAISHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号 : 30442990 (2009年度-)

(3) 連携研究者

豊田 敦 (TOYODA ATSUSHI)

国立遺伝学研究所・特任准教授

研究者番号 : 10267495

堀 沙耶香 (HORI SAYAKA)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号 : 20470122 (2009年度)

(4) 研究協力者

西 真郎 (NISHI SHINRO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主事