

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目:若手研究(スタートアップ)

研究期間:2008~2009

課題番号:20810047

研究課題名(和文)RNAから見た世界最深部生命圏の微生物に関する研究

研究課題名(英文)Research of microbe in the deepest subsurface biosphere based on RNA analysis

研究代表者

堀 沙耶香(HORI SAYAKA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号:20470122

研究成果の概要(和文): 静的な超深海底泥中の微生物生態系を明らかにする目的で、底泥から直接全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリーの作製と DNA ライブラリーとの比較を試みた。世界最深部マリアナ海溝底泥は、大深度小型無人探査機「ABISMO」での採泥に成功したが、含まれる微生物は予想以上に微量だった。そこで、まずは伊豆-小笠原海溝超深海底泥で予備実験を行い、巨大生物を含む底泥は、周囲の底泥よりクロロフレクサスの割合が有意に少ないことが示唆された。地質学的に静的な環境でも大型生物との共存により、活動状態にあるバクテリアの分布が不均一になることが示唆された。

研究成果の概要(英文): To clarify bacterial diversity in the geological static deep-sea sediment, I tried to extract RNA to make cDNA libraries. The Automatic Bottom Inspection and Sampling Mobile "ABISMO" succeeded sampling at the deepest Mariana Trench, however, the included microbe was lower amount than previous report. Then, preliminary experiment was performed using the sediment in the static Izu-Ogasawara Trench. The population of Chloroflexi surrounding giant protist was significantly lower than the plain sediment, suggesting that bacteria in the activity state were distributed heterogeneously in the geologically static environment by coexistence with the large-sized creature.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野:複合新領域

科研費の分科・細目:ゲノム化学・応用ゲノム化学

キーワード:微生物生態系、有孔虫、深海、RNA、極限環境

1. 研究開始当初の背景

地球表面の70%を占める海洋の95%以上は深海である。暗黒の深海では、熱水噴出孔等

の局所的な動的環境を除き、大部分は貧栄養、低温(0.5~4℃)の静的環境である。生命活動には不利に思える静的環境だが、深海底

下 800m までの地殻内には 10^6 細胞/cm³ を超える微生物群が棲息しており⁽¹⁾、その総量は地球の生物量の半分に匹敵すると推定されている。つまり、深海の静的環境に棲む微生物の理解は、地球規模のバイオマスの解明に必要不可欠である。

世界最深部のマリアナ海溝（深度 10897m）は、極端な貧栄養、水温 4℃、海流がほとんどない静的環境である。このマリアナ海溝底泥からは、DAPI 染色で底泥 1g 当たり 10^7 個の微生物細胞が検出されており、単離培養された菌の中には好アルカリ性菌や好熱菌など、マリアナ海溝環境とはかけ離れた至適生育条件を持つ種も含まれていた⁽²⁾。しかし、こうした微生物群が実環境でどのような生態系を築いているのか、活動中か休眠中か、どのような代謝や遺伝子発現を行なっているのかは全くわかっていない。そこで申請者は、上記を明らかにする目的で RNA に着目した。RNA の利点は、rRNA の発現でその種の活動状態が分かる。mRNA は合成/分解の回転が早く、遺伝子発現変動を速やかに反映する。また、恒常的な発現はその環境での生命維持の鍵遺伝子を示す。タンパク発現量が少ない情報伝達系や代謝系の上流因子、転写調節因子などでも、逆転写産物の PCR 増幅で解析可能。配列情報であり、同時に解析予定のメタゲノム情報と比較できる、などである。当研究グループは平成 20 年 6 月にも新たに採泥されるマリアナ海溝底泥 1.8 kg を入手予定であった。そこで、これに対して先述の RNA 抽出法を応用すれば cDNA ライブラリーの作製・解析に十分な RNA 量が得られると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

静的な超深海環境に棲息する微生物の生態系や、その場における代謝系、遺伝子発現レベルでの極限環境適応機構の一端を明らかにすることを目的とする。

なお、環境試料からのバクテリア mRNA の選択的抽出は、生態系が比較的単純な場合を除き、前例がなかった。そこで、底泥からのバクテリア mRNA 抽出法の確立も目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、超深海環境の微生物生態系において、

- (1) 構成する微生物コミュニティの理解を、16S rRNA 解析を元に行なう。
- (2) 遺伝子発現パターンの理解を、mRNA 解析を元に行なう。

世界最深部マリアナ海溝底泥は、当研究グループ等による採泥（大深度小型無人探査機「ABISMO」を利用）に成功した（北緯 11 度 22 分；東経 142 度 43 分；深度 10350 m；2008 年）。しかし、底泥 1g から全 RNA は検出限

界以下、DNA は僅か数 ng（微生物細胞約 10^6 個相当と推定）しか抽出されず、微生物が微量（予想量の 10 分の 1 以下）であることが示唆された。そこで、まずは 1g 当たり約 150 ~ 300 ng の DNA が抽出できる伊豆-小笠原海溝 静的超深海底泥（北緯 32 度 47 分，東経 141 度 52 分；深度 7111 m；2007 年、無人探査機「かいこう 7000II」により採泥）を用いて予備実験を行った。

まず、-80℃凍結 MBARI コアの上層（5cm）を分取し、RNA PowerSoil Total RNA isolation Kit と PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MO Bio, Carlsbad, CA USA) を用いて全 RNA と DNA を同時抽出した。全 RNA は SuperScript III (Invitrogen) による逆転写後、バクテリア共通 rRNA プライマー（27F, 1492R）を用いて PCR 増幅とクローニングを行った。シーケンスを決定し、Greengenes によるアライメントの後、リボソーム用の系統解析ソフトウェア「ARB」で種を同定・分類した。

一方、mRNA の抽出法の検討では、MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit (Ambion) の利用、アガロースゲルからの切り出しと mRNA 回収（変性、非変性ゲルを用いたフェノール・フリーズ法、フェノール熱融解法、カラム精製法）、アクリルアミドゲルからの切り出しと mRNA 回収、全 RNA 由来 cDNA 産物の GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) による増幅⁽³⁾を試みた。

参考文献

- (1) Parkes RJ, Cragg BA, Bale SJ, Getliff JM, Goodman K, Rochelle PA, Fry JC, Weightman AJ, and Harvey SM (1994) Nature 371(29), 410-414.
- (2) Takami H, Inoue A, Fuji F, and Horikoshi K (1997) FEMS Microbiol. Lett. 152, 279-285.
- (3) Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, Join I (2008) PLoS ONE. 3, e3042.

4. 研究成果

伊豆-小笠原海溝底泥の DNA 由来 rRNA ライブラリーから、16S rRNA 配列を 117 クローン、cDNA 由来 rRNA ライブラリーから、219 クローンをシーケンス解析した。その結果、いずれもアルファ、ガンマ、デルタ-プロテオバクテリアが過半数を占め、10% 前後のアシドバクテリア、Gemimonas、バクテロイデス、クロロフレクサス、アクチノバクテリア等が検出された（表 1、図 1）。

それぞれの分類群の占める割合は、DNA 由来、cDNA 由来で差は見られなかった（カイニ乗検定またはフィッシャーの正確確率検定、

p > 0.05)。これは、地質学的に安定な(変化の乏しい)静的環境では、棲息する生物の環境適応と淘汰が進んでおり、現在その環境に存在する種は適応し活動状態にあるものが多いことを示唆している。

表 1 各分類群に含まれるクローン数

Bacterial division	Number of clones in phylogenetic groups			
	Xeno + rDNA	Xeno + rRNA	Sediment rDNA	Sediment rRNA
α -proteobacteria	10	88	4	57
γ -proteobacteria	24	63	32	32
δ -proteobacteria	22	50	25	45
Acidobacteria	23	32	16	16
Gemimonas	6	34	4	19
Others	5	22	1	11
Bacteroidetes	6	5	11	8
Actinobacteria	10	5	9	2
Chloroflexi	1	6	2	12
Planctomycetes	4	12	0	2
Candidate division NKB19	3	2	1	4
Candidate division WS3	0	1	1	6
β -proteobacteria	2	0	4	0
Candidate division OP3	2	0	2	1
Chlorobi	1	1	0	1
Candidate division SR1	2	0	1	0
Termite group I	2	1	0	0
Candidate division TM6	2	0	1	0
Verrucomicrobia	1	2	0	0
Nitrospira	1	0	0	1
Candidate division CV	0	0	1	0
Firmicutes	1	0	0	0
Marine Group A	0	1	0	0
Candidate division OD1	0	0	0	1
Candidate division OP10	0	0	0	1
Candidate division OP11	0	0	1	0
Candidate division PBS3	0	1	0	0
Candidate division TM	0	0	1	0
Total	128	326	117	219

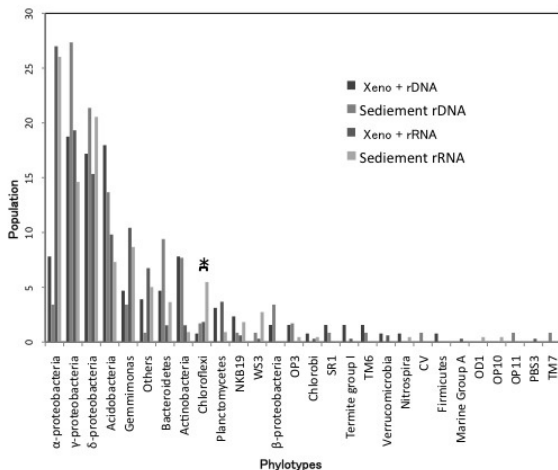


図 1 各分類群の占める割合

さらに、この海域には体長 9 cm を超える巨大原生動物(底生有孔虫、ゼノフィオフォア。図 2) が多数棲息していた。ゼノフィオフォアは分泌物と周囲の底泥からなる「殻」をまとう性質を持つ。そのため、殻の中の栄養組成の違いから、ゼノフィオフォア周辺のバクテリア生態系が局所的に変化している可能性を考えた。そこで、ゼノフィオフォアを含む底泥について、同様に cDNA 由来 rRNA ライブラリーを作製し、バクテリア組成を比較した。シーケンスを解析した。その結果、ゼノフィオフォアを含む底泥(表 1、図 1 中「Xeno +」と標記)は、含まない付近の底泥(表 1、図 1 中「Sediment」と標記)と比べ、cDNA 由来のクロロフレクサスの割合が 2.7 倍低く、

有意差が検出された(ゼノフィオフォア含; 1.8%、含まない底泥; 5.8%。フィッシャーの正確確率検定、p < 0.05)。他の分類群における差は検出されなかった。よって、地質学的に静的な環境でも、大型の生物との共存により、局所的に一部の活動状態にあるバクテリアの割合が変化し、不均等に分布していると示唆された。



図 2 採集したゼノフィオフォア

一方、mRNA ライブラリーの作製では、バクテリアの rRNA 保存領域や上記ライブラリーで得られた配列情報を利用したオリゴビーズによる rRNA 除去法、アガロースゲルやアクリルアミドゲルからの mRNA の物理的回収、全 RNA 由来 cDNA を Genomiphi 法で DNA 増幅し、mRNA 由来 cDNA の割合を増やす方法等を試した。しかし、rRNA を完全に除去することはできず、mRNA 配列は得られなかった。現段階では、微生物多様性が高い環境では、まず rRNA ライブラリーを作製し、同定された菌の近縁種の性質から、代謝系に関わる遺伝子群を推測し、RT-PCR 等で発現量を解析する手法が有効だと考えられる。

今後は、本研究から派生的に得られたゼノフィオフォアの存在でクロロフレクサスの活動が抑制されるメカニズムにも着目し、静的環境での栄養収支、他生物との共生による環境適応機構の一端を明らかにしていきたい。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

Sayaka Hori, Tsuchiya Masashi, Shinro Nishi, Wataru Arai, Takao Yoshida, and Hideto Takami, Bacterial diversity surrounding a new candidate genes Xenophyophores (Foraminifera) discovered at a depth 7111m near the Boso Peninsula, 4th International Symposium on Chemosynthesis-Based Ecosystems, 2009 年 7 月 2 日, 沖縄

堀沙耶香, 土屋正史, 西真郎, 荒井涉, 吉田尊雄, 高見英人, Inactivation of

alfa-proteobacteria and activation of gamma-proteobacteria induced by a new candidate genus Xenophyophores (giant foraminifera) at a depth 7111m in the Izu-Ogasawara Trench, 第 32 回日本分子生物学会年会,2009 年 12 月 11 日, 横浜

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/200901016725047918>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀 沙耶香 (HORI SAYAKA)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20470122