

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07227

研究課題名(和文) 化学合成共生システムからエピジェネティクスの可能性を探る

研究課題名(英文) Explore the potential of epigenetic regulation in the chemosymbiotic system

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メタン酸化細菌を共生させた化学合成共生生物は、どのようにして一定サイズに維持しているかという問いには未だ解明されていない。研究代表者および研究分担者は、宿主内における共生細菌集団の維持に対するエピジェネティクスの遺伝子制御に着目した。シンカイヒバリガイ類への二つの共生細菌と、自由生活型メタン酸化細菌のPacBioシーケンサーによる全ゲノムシーケンシングを実施した。さらに、遺伝子発現解析から共生細菌において10倍以上の高い発現する遺伝子が見出され、それら遺伝子上流域にはいくつかのメチル化サイトが存在した。この発見は、共生細菌においてエピジェネティクスのような遺伝子制御があり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学合成生態系における共生システムについて、宿主動物が、「どのように共生細菌を維持しているか？」といった、未だ未解明な問いに対して、本研究によって、エピジェネティクスのような遺伝子制御の可能性を示すことができた。この新たな視点での研究は、ゲノミクスの成果と合わせ、共生機構の維持、継承メカニズムの解明に繋がるはずである。また、そのメカニズムの解明は、共生系を利用した物質生産を目指す共生工学に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemosymbiotic animals harboring methane-oxidizing bacteria are largely dependent on chemically-derived energy and nutrients provided by symbionts. It still remain unresolved as to how the symbiont growth is controlled to keep the within-host population size of symbionts to be constant. We focus on whether epigenetic regulation is associated with sustaining the symbiont population in host. PacBio whole genome sequencing was conducted for two symbionts of deep-sea Bathymodiolus mussels, and one free-living bacteria. The sequence analysis showed that these methane-oxidizing bacteria have the genome ranging 4 Mb to 4.5 Mb, of which about 50 thousands of sites is methylated. From the transcriptome analysis, expression of some genes in both symbionts are over 10-fold higher than those of free-living one. Some methylation sites were found in the upstream region of their gene. These finding indicates that symbiosis have the potential for enabling the epigenetic regulation.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：化学合成 共生 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球上に散在する深海熱水噴出孔周辺には、熱水や湧水に含まれる地球化学的な還元エネルギー（硫化水素、水素、メタン）を利用し、化学合成する微生物を体外・体内に共生させることで、その生命を維持している。この共生システムについては、宿主動物が、「どのように環境から共生者を選択、感染するのか?」、共生者が「宿主細胞内にてどのような代謝活動をしているのか?」などの、未だに解明されていない課題が多く残されている。このように共生研究を困難にしているのは、共生細菌が宿主動物への相互依存性が強く、絶対的相利共生であり、これまで宿主から共生細菌を分離培養した成功例はなく、宿主自身の飼育技術が確立していないことが大きな要因である。

研究代表者らは、これまで深海性二枚貝に共生する硫黄酸化共生細菌に対して、ゲノミクスを中心に研究を展開してきた。その成果として、深海性二枚貝であるシロウリガイ類やシンカイヒバリガイ類に共生する化学合成硫黄酸化細菌のゲノムにコードされる遺伝子からは、化学合成による生育が可能なシステムを構築可能であることを明らかにした。しかし、電子顕微鏡観察からは、共生細菌の宿主細胞内での活発な増殖の様子は観察されていない。では、「共生者は宿主細胞内にて自身の増殖をどのように制御し(制御され)ているのか?」「自己増殖のためではなく、何のために代謝活動をするのか?その制御は?」。研究代表者は、この問いに対して、これまでのゲノミクスあるいはトランスクリプトミクスの視点からではなく、ゲノム上の遺伝子を変化させることなく表現形を適応させることができるエピジェネティック的な遺伝子制御にこの問いを解き明かす「鍵」が潜んでいるのではないかと発案した。細菌におけるエピジェネティクスは、自己防衛のための制限修飾系以外にも、大腸菌等の腸内細菌ではゲノム複製のタイミングの制御、ミスマッチ DNA 修復に関わっており、カウロバクターでは、複製や細胞サイクルの制御に関わっており、また、他には病原因子の排出、Phase variation による遺伝子発現が報告されている。共生関連では、ミヤコグサ根粒菌の根粒形成過程において DNA メチル化が植物-根粒菌の相互間作用に重要な役割をなしていることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、「共生維持、制御へのエピジェネティック的視点からの解明」を目的として、どちらも同属と近縁関係にある深海二枚貝シンカイヒバリガイ類共生細菌およびメタンリアクター培養からのメタン酸化細菌について、ゲノム全体に亘る DNA メチル化模様を明らかにし、その中から共生システムに關与するエピジェネティック的な遺伝子制御を発見することを目的とする。このアプローチは、ゲノミクスあるいはトランスクリプトミクスを駆使しても、その実態を掴む事が出来ていない化学合成共生系における共生機構の構築、維持メカニズムに対して、共生系メカニズムに世代継承可能な DNA メチル化によるエピジェネティック的な制御が関わっているという仮定のもと、これまでに無い、新たな視点からのアプローチである。

3. 研究の方法

本研究計画は、第一に深海二枚貝シンカイヒバリガイ類共生細菌とリアクター培養可能な自由生活型メタン酸化細菌のゲノム配列を解読し、両者に共有されるオーソログ関係を明らかにする。続いて、それらゲノムに見られるメチロームを調べる。最後に、両者の遺伝子発現への正負の制御とそのメチル化パターンとの相関性(同機能遺伝子発現制御に関わるか)を示す遺伝子を探索する。シンカイヒバリガイ、ヘイトウシンカイヒバリガイのエラ組織をホモジナイズ、DNase 処理した後、共生細菌画分を集め DNA を抽出する。この工程により共生細菌ゲノムが 10 倍以上にエンリッチされた。得られた DNA を一分子シーケンサー PacBio Sequel (Pacific

Biosciences)にて各試料について 1 フローセルのシーケンスを実施した。自由生活型メタン酸化細菌としてメタンリアクター培養した試料から DNA を抽出し、上記同様にシーケンスを実施した。アセンブルは、PacBio 解析ソフトウェアパッケージ SMRT Link 6.0 に備わっているアセンブラーHGAP4 使用し、また修飾塩基検出には同ソフトウェアパッケージの「Base Modification Detection パイプライン」およびメチル化モチーフには「Base Modification and Motif Analysis パイプライン」を使用した。トランスクリプトームは、深海二枚貝については現場固定試料、自由生活型については、バイオフィーム形成初期から成熟期に至る 17 日(methR17d)、40 日(methR40d)、88 日間(methR88d)培養試料から RNA を抽出した。RNA-Seq シーケンスは Ion S5 XL システムにて実施した。得られたデータは、クリーンアップ後、EDGE-pro プログラムにて遺伝子発現レベルの推定を行った。

4 . 研究成果

本研究成果は、以下の三つに大別される。(1) 2 種の共生型メタン酸化細菌および自由生活型メタン酸化細菌のゲノム配列の解読、(2) 各ゲノム配列におけるメチロームプロファイルの作成、(3) 共生型に特異的なトランスクリプトームの特徴の解明である。

(1) メタン酸化細菌ゲノム

相模湾、水深 1,00m の深海メタン湧水域に生息するシンカイヒバリガイ(BjaS)、ヘイトウシンカイヒバリガイ(BplS)を採取し、そのエラ組織から共生細菌ゲノムエンリッチ手法により DNA を抽出し、一分子シーケンサー PacBio Sequel (Pacific Biosciences)にてシーケンスを実施し、シンカイヒバリガイから約 10 Gb(1.6 Million subreads)、ヘイトウシンカイヒバリガイから約 13.6 Gb (2.3 Million subreads)のシーケンスが得られた。続いて、PacBio 解析ソフトウェアSMRT Link 6.0 に備わっているアセンブラーHGAP4 にてアセンブルを実施した。構築されたコンティグ配列は、約 6.5~6.8 Mb となり、全配列の約 30%~40%のコンティグが構造的な異型(挿入、欠失、逆位)であることが判明した。このことは、宿主個体内にて共生細菌集団が均一ではなく多様体であることを示唆している。最終的には、最大公約的に遺伝子頻度を精査し、4.0 Mb シンカイヒバリガイ、4.7 Mb ヘイトウシンカイヒバリガイのゲノム配列を構築した(表 1)。一方、自由生活型メタン酸化細菌(methR)は、メタンリアクター培養下でのバイオフィームから DNA を抽出し、同様に PacBio Sequel にてシーケンスを実施した。その結果、約 9.6 Gb (1.7 Million subreads) のシーケンスが得られ、アセンブルにより 4.38 Mb のクロモソームと 42Kb のプラスミド配列を構築することに成功した(表 1)。

共生細菌と自由生活型メタン酸化細菌のゲノムには、2,315、3,215、3,790 の蛋白質遺伝子がコードされ、3 つのリボソーム RNA オペロンが確認された。オーソログ解析により、約半数の遺伝子が三者に共通オーソログであり、その中にはメタン酸化初発酵素 methane monooxygenase、methanol dehydrogenase、そしてホルムアルデヒドからギ酸への酸化をする H4MPT pathway 遺伝子群があり、炭素同化を担う RuMP Cycle 遺伝子群が含まれていた。また、有機物貯蓄としてグリコーゲン合成遺伝子も共通にコードされていた。一方、自由生活型にはセルロース合成酵素、繊毛合成、タイプ VI 型分泌装置等の遺伝子群がコードされているが、これら遺伝子は共生菌ゲノムには存在しなかった。共生細菌と自由生活型の両者ゲノムの大きな相違点として、共生細菌ゲノムに約 1000 箇所以上のサイトに転移性遺伝因子 Insertion Sequence (IS)が伝播していることであり、これらはゲノム領域の 20% 以上に及んだ。その他にも多くの偽遺伝子が、共生細菌ゲノムに検出された。この転移性遺伝因子のゲノムへの積極的な伝播の状況は、他の昆虫への共生細菌ゲノムでも見られる共生に特徴的なゲノム構造である。

(2) メチロームプロファイル

構築したゲノム配列上でのメチル化プロファイルを作成するため、PacBio Sequel シーケンスデータをもとに SMRT Link 6.0 の” Base Modification Detection”パイプラインにて修飾塩基サイトを検出を実施した。その結果、各ゲノムから約 5 万箇所の塩基サイトが修飾されていることが推測された(表 1)。三者共に、m4C が約 25%、m6A が約 25%、残りが未同定修飾サイトであった。これら修飾サイトの 15%~20%のサイトから、9~11 種類のメチル化モチーフ配列が見出され、そのほとんどの配列に関しては報告例のない新規のモチーフ配列と考えられた。

表 1. 共生細菌と自由生活型メタン酸化細菌のゲノムとメチローム

	シンカイヒバリガイ共生細菌	ヘイトウシンカイヒバリガイ共生細菌	メタンリアクターメタン酸化細菌
Genome			
#Contig	50	130	1 + 1
Size	4,039,137	4,699,147	4,386,347 + 42,044
Ave. ctg length	80,782	36,147	---
N50	176,943	54,152	---
GC	42.5	40.3	39.8
#CDS	2,302	3,250	3,790
#Pseudogene	911	669	109
rm operon	3	3	3
#IS	1,029	1,186	185
Modified Base			
m4C	14,354	10,731	12,702
m6A	14,490	11,412	7,819
unidentified	25,040	23,201	29,853

(3) メタン酸化細菌トランスクリプトーム

共生細菌のトランスクリプトーム解析のために、各シンカイヒバリガイのエラ組織からの約 74 Million リードの RNA-Seq シーケンスを得たが、宿主リボソーム RNA が全リードの 65%まで残存し、ミトコンドリア由来リードは、0.5%~0.8%であった。一方、共生細菌由来のリードは、全体の 9%~11% であり、その内の 25%~35%が transfer-messenger RNA (tmRNA) 遺伝子が占めていた。この遺伝子はバクテリアにおいてリボソームの再生に関わっており、リボソーム活性が低下した定常期や静止期などにその発現が上昇することが知られている。続いて、自由生活型メタン酸化細菌のトランスクリプトーム解析は、バイオフィーム形成初期から熟成期までの三点について実施し、各過程にて約 20 Million リードの RNA-Seq シーケンスを得た。バイオフィーム細菌群の優占種である自由生活型メタン酸化細菌由来のリードは、初期から熟成期に遷移していく過程にて、全リードの 39%から 51%に増加していった。その中で、tmRNA 遺伝子発現は、共生細菌に比較し高く、48%から 64%に増加していた。このことは、共生状態の方がバイオフィーム状態の細菌よりもリボソームが活性化していることを示唆するものと考えられる。続いて、共生細菌と自由生活型細菌の遺伝子発現レベルを三者共有オーソログ遺伝子について比較してみた(Fig. 1)。メタンからギ酸までの酸化ステップおよび RuMP Cycle での同化に至るまでの酵素遺伝子は高いレベルの発現 (>1,000 RPKM) が両タイプの細菌で確認された。一方、共生細菌において分子シャペロンである GroEL/GroES 遺伝子の発現が自由生活型細菌に比べ 10 倍近く高いことがわかった。この GroEL/GroES の高発現は、アブラムシ共生細菌においても報告されており、共生細菌の共通な特徴だと考えられた。さらに、グリコーゲン合成遺伝子の発現においても共生細菌の方が高く、中央代謝である glycolysis 関連の糖新生へに関わる遺伝子も比較的高

いレベルで発現していた。最後に、これらメタン細菌は数十種類のバリエーションが異なる toxin-antitoxin system 遺伝子セットをコードしている。このシステムは、細菌の生育および細胞死を制御するシステムであり、様々なストレス環境下での生存に重要な役割をなすことが知られている。その遺伝子セットのなかで共生細菌と自由生活型細菌にてオーソログ関係にある toxin-antitoxin system の発現レベルが共生細菌にて自由生活型細菌に比較し、10 倍近く高い発現レベルをしていることが明らかになった。toxin-antitoxin system の中には toxin 分子により自己の生育を抑える役割を担うものもあり、宿主細胞内での共生といった環境の中で自己の生育を抑えることが、宿主との共生関係を維持するのに必須と考えられ、その細胞状態のコントロールにこのシステムが役割を担っているとも推定できる。

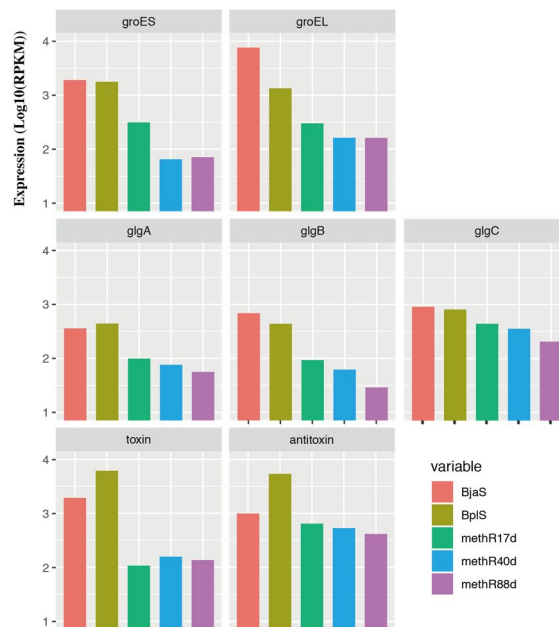


Fig. 1 共生細菌と自由生活型細菌での発現差がみられた遺伝子

これら共生菌のみに高発現レベルを示す GroEL/GroES 遺伝子の遺伝子上流域でのメチル化パターンにおいて、共生菌にはモチーフ配列として CAGCmAGG(シンカイヒバリガイ -289 番目、ヘイトウシンカイヒバリガイ-241 番目)が見出され、自由生活型には確認されなかった。この遺伝子でのエピジェネティック的な発現制御の可能性を示唆している。一方、共生細菌に高発現した toxin-antitoxin system の遺伝子上流域には自由生活型ともにメチル化サイトが検出されたが、共通モチーフ配列は見出されなかった。

本研究において、共生細菌におけるエピジェネティック的な発現制御の可能性を示唆することができた。今後、ゲノム全体を網羅した結果を得るために、同一機能ファミリー間での共通性や生活環での共通性についてさらなる精査を行い、さらなるエピジェネティック的な発現制御遺伝子の特定に繋げていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 平山仙子、高木善弘、阿部真理子「深海に生息する好気性メタン酸化細菌

Methyloprofundus sp. INp10のゲノムおよびトランスクリプトーム解析」2018年度極限環境生物学会年会 2018年

2. 高木善弘、平山仙子、阿部真理子、津田美和子「メタン酸化バイオフィルムにおける遺伝子発現解析」環境微生物系学会合同大会2017 2017年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 生田 哲郎

ローマ字氏名： (IKUTA, Tetsuro)

所属研究機関名： 国立研究開発法人海洋研究開発機構

部局名： 海洋生物多様性研究分野

職名： 技術研究員

研究者番号(8桁): 80584846

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。