

令和元年6月20日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14817

研究課題名(和文) “生命版リバーエンジニアリング” 発現から遺伝子機能を特定する

研究課題名(英文) Functional annotation of unknown sequences through gene expression by substrate induction

研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・主任研究員

研究者番号：30421845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海底下環境に膨大に生息しながら、その性質の大部分が未解明である微生物に関して、その遺伝子機能に関する知見を得るために、基質誘導による機能遺伝子発現解析(SIGEX: Substrate Induced Gene Expression)を応用した機能遺伝子探索を実施した。例えば出来上がったプログラムからそのアルゴリズムなどを解析するように、本研究では発現という現象から各DNA配列が持つ機能を推測しようと試みた。基質による誘導をアクセスの扉として、多様な微生物で構成される海底下生命圏の未知遺伝子機能推定や遺伝子資源探索を試み、遺伝子断片の取得やその機能との関連を推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAやRNAの配列を高速に解析する技術が日進月歩で発展している。一方で、膨大に得られる塩基配列情報がどのような機能を持つか、その意味付け(アノテーション)はデータベースでの相動性検索によるところが大きい。本研究では基質誘導によって遺伝子のスイッチがオンになる、発現、という現象を基に未知DNA配列の機能を推定しようとするアプローチである。実際に得られた配列についてデータベース検索を行ったところ、用いた基質との関連情報が存在しないものばかりであった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored unknown function buried in genomic DNA obtained from subseafloor biosphere, one of the most unexplored microbial habitat on Earth, by applying Substrate Induced Gene Expression (SIGEX) method. We extracted DNA from various subseafloor sediment samples and established procedure to construct genomic library with sequence length in average of 1700 bp and millions of clonal variations. In parallel, we also obtained metagenomic sequence information to further acquire functional information of DNA fragment. This SIGEX approach can be useful technique to decipher the gene functional information even for unannotatable sequences by metagenomic approach.

研究分野：地球微生物学

キーワード：海底下生命圏 基質誘導 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

培養技術は進歩すれども依然として培養できない微生物の研究は困難を極めている。地球表面積の7割を占める海底下には全地球バイオマス炭素の数~10%が微生物体として埋もれているといわれている[1,2]が、リボソーム RNA 遺伝子配列解析によると、海底下には分離・培養に至っていない多くの未知系統微生物群が優占種として存在することが明らかとなっている[3]。

このような未培養系統微生物の生態を解明するために行われたメタゲノム解析では、従来の機能推定である同源性検索を適用、海底下試料から得られた配列のうち8割程度が機能未知という結果に終わっている[4]。最近では、未知アーキアシングルセル由来の増幅ゲノム配列を解読し、死菌由来のタンパク質を分解、栄養としていることも明らかとなった[5]が、細胞ごとの解析では膨大な微生物群集の一部が見えるに過ぎず、地球最大の生命圏とも言われる海底下で起こっている元素循環は微生物反応をブラックボックスとして扱わざるを得なかった。しかし、この結果は裏返すと海底下が地球最大の未知遺伝機能の宝庫であることを示しているとも言え、手段さえ整えば地球規模での物質循環プロセスに果たす役割についてだけでなく、遺伝子資源としても有用な知見が得られる可能性を有している。

2. 研究の目的

本研究では未知微生物の生態解明と未知遺伝資源の開拓につながる知見を得ることを目標とし、研究を実施した。目標を実現させるアプローチとして、基質誘導による機能遺伝子発現解析 (SIGEX: Substrate Induced Gene Expression[6]) を応用し、転写因子など機能遺伝子群の一部を遺伝子誘導を通じて捉えることを試みた。SIGEX 法では、大腸菌などを宿主とするゲノムライブラリーを構築し、環境条件や基質の添加による遺伝子発現誘導を行う。ライブラリー中の挿入 DNA 断片がこの誘導に反応すれば宿主が蛍光を発し、これを FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)によって高速選別、調節領域および機能遺伝子を効率的に取得するものである。本法はその遺伝子選別において配列、機能のデータベースに依存しない。従って未知遺伝子が8割を占める海底下環境であっても適用可能である。データベース検索を主体とするメタゲノム解析とは一線を画した手法を用い、深海底下で繰り返される生物の代謝活動、海底資源のライフサイクルに関与する微生物機能の特定、さらには生命生存の極限に位置する環境微生物の生態解明にもつなげたい。

3. 研究の方法

本研究は平成28年度、29年度の2カ年度による実施を予定していたが、研究を実施する過程で、ライブラリー作成のための手法をさらに改良する必要が生じたこと、メタゲノムシーケンス配列を並行して取得し得られた基質誘導 DNA 断片に関する作用機序を含めた情報取得へと繋げる試みを実施するため、研究期間を1年間延長することを申請し、30年度までの実施とした。

研究開始前に予察的に SIGEX のスキーム (図1) を通常のクローニング手順で実施してみたところ、ゲノムライブラリー構築での断片挿入効率が低く、総計で100-1000程度の断片挿入クローンしか得ることが出来なかった。5-15kb程度の断片を挿入するとしてこのクローン数でカバーできるのは最大15Mbp、数菌体の微生物ゲノム分に過ぎない。短期的な成否から長期的な利用まで、このライブラリーのクオリティが本研究の根本を支えるため、本研究の初段階は徹底的な効率改善対策の検討とした。

第二ステップとしては、海底下環境の大部分を構成する嫌気的環境での遺伝子発現を適切にとらえるための手法改良を目指した。SIGEX 法では、基質による誘導に反応した遺伝子断片の下流に位置する緑色蛍光タンパク質が共発現することで陽性クローンの高速取得を可能としている。原著論文で用いられていた緑色蛍光タンパク質遺伝子は、蛍光分子形成に分子状酸素を必要とする *gfp* 遺伝子であった。ホストとする大腸菌は嫌気環境でも生育が可能な通性嫌気性菌であるため、この *gfp* に代えて嫌気状態のままで蛍光を発する *evoglow*[7]遺伝子を用いることで、嫌気環境での発現実験を可能とするシステム構築を実施した。

上記のステップを経て構築した方法を用いて SIGEX 用ゲノムライブラリーの構築を実施し、アミノ酸や芳香族化合物、金属イオンなどを用いてライブラリーに対して基質誘導実験を実施し、陽性クローンの検出、全体に対する割合の算定を実施したのちに、実際に陽性クローンの

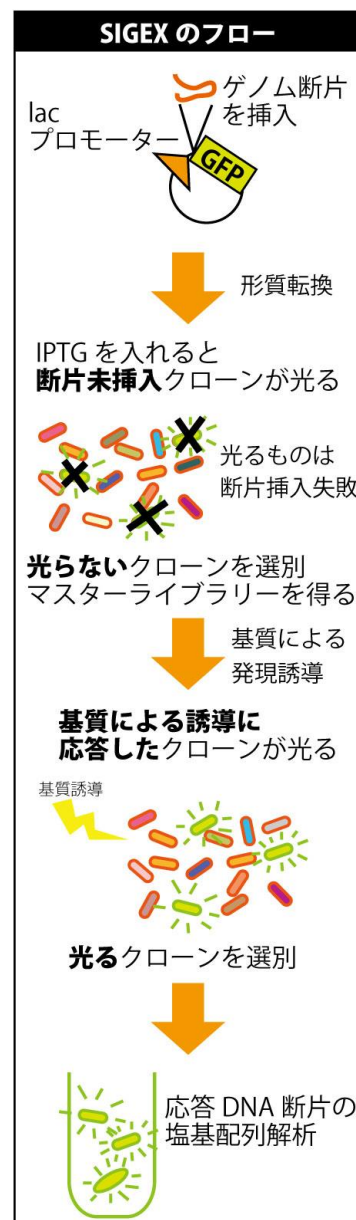


図1: SIGEXのスキーム

facs ソーティングによる取得を実施した。

さらに、得られたクローンについては、既報論文[8]においてサンガー法による塩基配列解析を実施したが、塩基配列解析に想定以上の時間を要し、何度トライしても解読が出来なかったプラスミドが存在するなどの問題が顕在化した。この点を改善するため、本研究では抽出したプラスミドは Nextera テクノロジーと次世代 DNA シーケンサー MiSeq の組み合わせにより、高効率かつ高速に塩基配列解読を行った。Nextera システムでは、トランスポザゼの働きによる解読対象のプラスミド断片化、インデックス配列の付加、短サイクルの PCR による MiSeq 解析可能な試料としての調製が可能である。難読配列を含めた解析にも実績があることから、高い効率で塩基配列解析が実施出来、上記の問題が解決できる。

4. 研究成果

ライブラリー構築の効率改善対策として、具体的には、TA-TOPO ベクターと Gateway システムの利用を考案した。TA ベクターはベクターの両 5' 末端に T-overhang が突き出た構造のもので、SIGEX において最も大きな問題となる自己環状化を防止する。また、TOPO ベクターとは末端にトポイソメラーゼを結合したベクターであり、末端 TOPO の働きでライゲーション反応が高効率で行われることが知られている。実際、市販されている TA-TOPO ベクターを用いて 5-15kb の断片の挿入を行った事前検討では、通常の TA ベクターに比べて 100 倍以上の挿入効率向上が見られた。本研究では、まず、既に構築して保有していた TOPO-TA アダプテーション済みの SIGEX ベクターを用い、外来 DNA 断片挿入効率の向上を狙った。下北半島沖から取得した堆積物試料から抽出した DNA 試料を用いて、(1)短鎖 DNA の除去、(2)形質転換効率の向上、を行った。

(1) 短鎖 DNA の除去

一般的な遺伝子組み換えのスキームの中でも問題になることとして、ベクターに組み込む DNA 断片の挿入効率は短鎖の方が高く、長鎖になるにしたがって低くなるという傾向がある。実際に行ったライブラリー構築の試みの中で、ゲル電気泳動による短鎖 DNA の除去を実施したとしても、除去したはずのサイズの DNA フラグメントがライブラリーの中に混入するという事実が確認されたため、磁性ビーズによるサイズセレクションを複数回実施することで短鎖 DNA の除去を試みた。この DNA について SIGEX ベクターへの挿入を実施したところ、それまでに見られていた短鎖 DNA 断片の挿入が見られなくなり、1000bp 以上の DNA 断片が挿入された SIGEX 誘導用ライブラリーを安定して作り出すことが出来るようになった。

(2) 形質転換効率の向上

形質転換効率は SIGEX ライブラリーにおける機能性遺伝子断片の探索における深さ(環境 DNA のどれくらいの割合が探索対象に入るか)を決定する重要な意味を持つ。この点をしっかり検討するため、TOPO-TA 化したベクターの使用、およびベクター/インサート比の検討を実施した。ベクターへのインサート DNA 挿入効率の向上に加えて、さらに、エレクトロポレーションによるプラスミド導入効率の改善を目指し、エタノール沈殿によって行っていた DNA 濃縮をカラム濃縮に切り替えるなどの改善を施したところ、平均として 1000bp を超える挿入 DNA 断片を持つライブラリーを $>10^6$ のクローンバリエーションで構築することに成功した。

上記の方法を用い、日本海上越沖から得られた堆積物のうち、海底下からの深さが異なる(0-30cm まで、10cm おきに三つ)ライブラリーを構築した(平均挿入断片長は 2000bp、総挿入遺伝子断片長は 6Gbp 程度)。これについて、D-アミノ酸やメタン、ギ酸や酢酸などを用い、さらに好氣的環境、嫌氣的環境におけるライブラリーの基質誘導実験を実施した。フローサイトメトリーを用いた基質応答確認を実施したところ、好氣的環境に比べ、嫌氣的環境の方が基質誘導によって蛍光タンパク質 EVOGLOW が発現する頻度が高くなる傾向が認められた。

一方、南太平洋の中心部に存在する環流域の海底下から取得した堆積物試料を用いて作成した SIGEX ライブラリーに対して、酢酸、メタン、およびマンガンイオンを誘導基質として取得

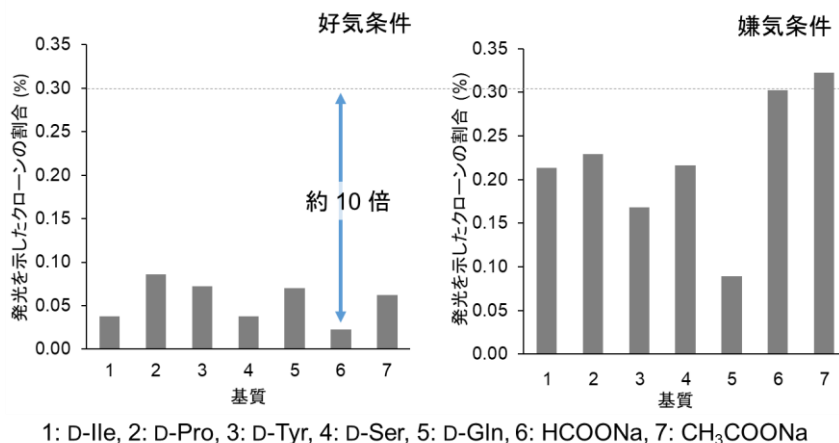


図 2: 好気、嫌気環境における SIGEX の結果例

したクローンについて、次世代シーケンサーを活用した配列解析を試みた。87株の基質誘導陽性クローンについてプラスミドの抽出を行い、トランスポザーゼを活用した Nextera システムによるランダム断片化、およびそれと並行する MiSeq ライブラリー化を実施し、プラスミドの配列決定を実施した。このプロセスを実施することにより、先にも述べた、サンガー法による配列決定の際に直面した難読配列による配列決定失敗などは起こらず、全塩基配列の決定を速やかに実施することが出来た。この南太平洋環流域の資料からは酢酸ナトリウムで 63、メタンで 17、塩化マンガンで 7 のクローンを陽性クローンとして単離したが、これらの配列情報についてデータベースによる相同性検索を行ったところ、それぞれの応答基質に対する反応に関する知見は一つも見つからなかった。さらに、配列の詳細解析を実施したところ、半数を超える 45 の配列について、内部に反復配列を有していることが明らかとなった。また、22 の配列に関しては Riboswitch scanner などによる解析から高次構造の安定性が高く、リボスイッチではないかと推測されたが、既存のリボスイッチファミリーとの構造類似性を示したものは 2 配列のみで、残りの 20 配列については構造類似性を示さなかった。転写因子結合部位の検索も実施したところ、4 配列について転写因子結合部位と推測される配列が見られた。様々な解析を実施したにもかかわらず、酢酸ナトリウムで誘導された 1 配列については誘導機構やその機序が全く不明という状態であった。

さらに、メタゲノム情報との相互解析を目指して、先述の日本海上越沖堆積物から抽出した DNA (ベクター挿入前) について、ナノポアシーケンサーである MinION を用いた配列解析を実施した。この SIGEX ライブラリーについては陽性クローンを取得する前の段階であるため、MG-RAST 等を用いた解析を実施したのみであるが、下記図 3 のような簡易アノテーション結果が得られている。

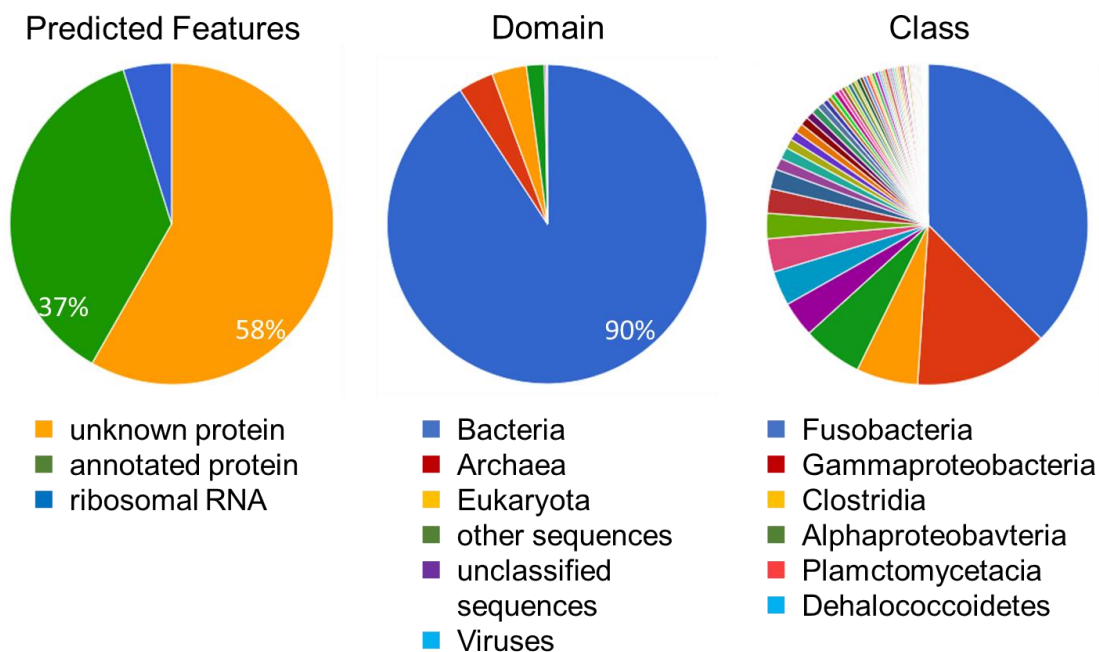


図 3: MG-RAST によるアノテーション結果の例

本研究では、現在盛んに実施されているメタゲノム解析によっても明らかにすることが出来ない生命圏が有する機能を紐解く手段として SIGEX 法を海底下堆積物に適用するアプローチを模索した。結果としてライブラリーとしての探索深度をさらに拡大するため、および環境微生物群集を構成する微生物群の網羅性を高めるための、基礎的手法の確立に成功した。また、海底下環境の大部分を構成する嫌氣的環境において基質誘導実験を行うことが可能なシステムとしても構築することが出来た。これらは、海底下生命圏だけでなく、環境微生物群の機能解明や有用機能発掘への応用が期待できる成果であると考えている。一方で、データベースや誘導機構を明らかにするデジタルツールでも機序を明らかにすることが出来ない配列も得られていることから、これらの配列については実験的に作用のメカニズムを調べていくことを目指したい。一方で、得られた新規配列については応用へも目を向けた研究展開を図っていきたいと考えている。

参考文献

1. Lipp and Morono et al., Nature 454, 991 (2008),
2. Kallmeyer, et al.. PNAS, 109, 16213-16216, doi:10.1073/pnas.1203849109 (2012).
3. Inagaki, F. et al. PNAS 103, 2815-2820 (2006).
4. Biddle, et al., PNAS 105, 10583-10588 (2008).
5. Lloyd et al., Nature 496, 215 (2013)
6. Uchiyama, et al. Nat Biotech 23, 88-93 (2005).

7. Drepper, T. et al. Nat Biotech 25, 443-445 (2007).
8. Futagami and Morono et al. Appl Environ Microbiol 75, 6905-6909, doi:10.1128/aem.01124-09 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. T. Wakamatsu Y. Morono T. Futagami T. Terada S. Nishikawa T. Morisawa K. Ohshita F. Inagaki M. Ashiuchi, Metal - ion - induced expression of gene fragments from subseafloor micro - organisms in the Kumano forearc basin, Nankai Trough, Journal of Applied Microbiology, 2018, 125 : 1396-1407, <https://doi.org/10.1111/jam.14061> (査読あり)
2. Morono, Y., Hoshino, T., Terada, T., Suzuki, T., Sato, T., Yuasa, H., Kubota, Y., and Inagaki, F., Assessment for capacity to capture aerosol-DNA by clean filters for molecular biology experiments., 2018, Microbes and Environments, 33 (2), 222-226, <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18012> (査読あり)
3. Ohshita Koki, Fukui Kenji, Sato Mizuki, Morisawa Takashi, Hakumai Yuichi, Morono Yuki, Inagaki Fumio, Yano Takato, Ashiuchi Makoto, Wakamatsu Taisuke, Archaeal MutS5 tightly binds to Holliday junction similarly to eukaryotic MutSγ, 2017, The FEBS Journal, 284:3470-3483, doi:10.1111/febs.14204 (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 西川 奈七、若松 泰介、森澤 高至、溝渕 早紀、寺田 武志、稲垣 史生、芦内 誠、諸野 祐樹、嫌気条件下での基質誘導性遺伝子発現解析法 (SIGEX) による海底下微生物由来機能未知遺伝子へのアプローチ、2018、極限環境生物学会 2018 年会、くにびきメッセ (島根県島根市)
2. 溝渕早紀、若松泰介、森澤高至、西川奈七、寺田武志、石井俊一、稲垣史生、芦内誠、諸野祐樹、海底下堆積物メタゲノム中の遺伝子機能探索に向けた基質誘導性遺伝子発現法 (SIGEX) の改良、2018、日本地球惑星科学連合 2018 年大会、幕張メッセ (千葉県千葉市)
3. 溝渕早紀、若松泰介、森澤高至、西川奈七、寺田武志、稲垣史生、芦内 誠、諸野祐樹、海底下微生物遺伝子を対象とした基質誘導性 遺伝子発現解析法 (SIGEX) による基質応答解析、2018、農芸化学中四国支部第 53 回講演会、高知大学物部キャンパス (高知県南国市)
4. Takashi Morisawa, Yuki Morono, Takeshi Terada, Satomi Nishikawa, Koki Ohshita, Fumio Inagaki, Makoto Ashiuchi, Taisuke Wakamatsu、Screening of metal-ion inducible genes from subseafloor sediments of Nankai Trough using substrate-induced gene expression method、JpGU Meeting 2017、幕張メッセ (千葉県千葉市)
5. 諸野 祐樹、寺田 武志、伊藤 元雄、稲垣 史生、Technological breakthroughs in search of the deep subseafloor biosphere、Japan Geoscience Union Meeting 2016 (招待講演) (国際学会)、幕張メッセ (千葉県千葉市)
6. 諸野 祐樹、海底下に広がる巨大生命圏とその探索ー最先端技術で生命の実態にせまるー、日本農芸化学会中四国支部創立 15 周年記念第 22 回若手研究者シンポジウム (招待講演)、2016、高知大学農学部 (高知県南国市)

※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。