

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15444

研究課題名(和文) 海洋細菌叢が持つDNAメチル化機構の多様性と生態学的意義の解明

研究課題名(英文) Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities

研究代表者

平岡 聡史(Hiraoka, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生命理工学センター)・研究員

研究者番号：70824423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリア・アーキア・ウイルスのDNAには様々な化学修飾(エピゲノム)が施されており、生理学的に重要な役割を担っている。しかし、今日の微生物エピゲノム研究は分離培養株を用いた研究が大半であり、未培養系統群が優占する環境微生物が持つエピゲノムの普遍性や多様性、生態学的な意義などは未知である。本研究課題では、研究代表者が確立した「メタエピゲノム解析」を海洋試料を対象に実施し、海洋微生物叢が持つDNA化学修飾機構の多様性を検証した。結果、培養株を利用した研究からは想像もつかないほど多様なエピゲノムを観測できた他、新規DNA化学修飾酵素の同定や、進化や生態との関連を議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、海洋微生物叢を対象に「メタエピゲノム解析」を実施し、ゲノム上のDNA化学修飾(エピゲノム)を大規模に解明した。本研究は、塩基配列のみを解析対象とする狭義のゲノム解析を越えて、エピゲノムをも含む広義のゲノム解析を行うことで、微生物の生理生態や進化により深くアプローチできることを示した成果である。今後、海洋のみならず土壌や腸内といった幅広い環境に生息する微生物叢を対象に解析を実施することで、従来のゲノム解析を越えた、より深い微生物生態系や進化の理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：DNA chemical modifications, including methylation, are widespread and play important roles in prokaryotes and viruses. However, current knowledge of these modification systems is severely biased towards a limited number of culturable prokaryotes, despite the fact that a vast majority of microorganisms have not yet been cultured. Here, using single-molecule real-time (SMRT) sequencing, we conducted culture-independent 'metaepigenomic' analyses (an integrated analysis of metagenomics and epigenomics) of marine microbial communities. We reconstructed >400 metagenomic-assembled genomes (MAGs) from diverse prokaryotes and viruses, respectively, and 220 modified motifs and 276 DNA methyltransferases (MTases) were identified. The MTase-motif correspondence found in the MAGs revealed 10 novel pairs, 5 of which showed novel specificities. Our findings highlight diverse unexplored DNA modifications that potentially affect the ecology and evolution of prokaryotes and viruses in nature.

研究分野：環境微生物学

キーワード：メタエピゲノム解析 メタゲノム解析 ロングリード バイオインフォマティクス 海洋微生物 原核生物 ウイルス エピゲノム

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

バクテリア・アーキア・ウイルスの DNA には様々な化学修飾（エピゲノム）が施されており、この仕組みはエピゲノムと呼ばれる。微生物においてこのエピゲノムは、ファージ感染に対する防衛機構(制限修飾系)や遺伝子転写制御、DNA ミスマッチ修復などの、生理学的に重要な機能に関わる例が知られている。今日、微生物エピゲノムに関する知見の大半は、ごく一部の分離培養株を用いた研究例によるものである。一方で、未培養系統群が優占する環境微生物が持つエピゲノムは、その観測が技術的に困難であり、研究例が限定的である。そのため、環境中の原核生物やウイルスが持つエピゲノムについては、その普遍性や多様性、進化・生態学的な意義などは検証されてこなかった。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、PacBio シーケンサをメタゲノム解析に活用し、培養に依存せずに環境微生物叢のエピゲノムを網羅的に観測する「メタエピゲノム解析」が可能であると着想し、実験とバイオインフォマティクス解析を組み合わせた解析技術の世界に先駆けて考案した。そして、琵琶湖の淡水試料を題材とした解析から、わずか2試料の解析ではあったものの、培養株ベースの研究からは想像がつかないほど多様な原核生物のエピゲノムの存在を明らかにし、手法の有効性を実証した(Hiraoka et al. Nat. Commun. 2019)。本研究課題では、表層から深海に至る複数深度の海洋微生物叢試料を対象にメタエピゲノム解析を行い、いままで研究の対象とされてこなかった海洋の原核生物と二本鎖 DNA ウィルスが持つエピゲノムを非培養的に大規模に解析した(図1)。

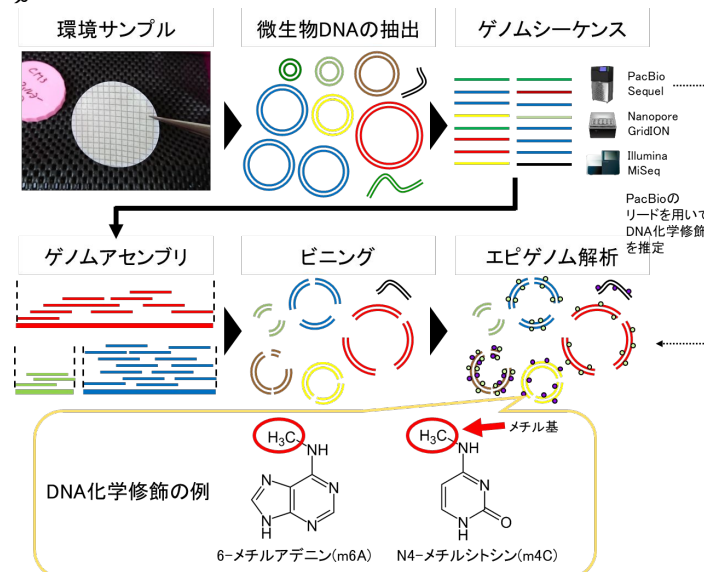


図 1 メタエピゲノム解析の概要

3. 研究の方法

- (1) 【サンプリング】物理化学的・生物学的特性が変化する海洋層として、表層から深海に至る4深度(5, 90, 200, 300 m)の海水(60 ~ 300L)を太平洋域にてサンプリングし、フィルター濾過により微生物細胞を回収した(図2)。
- (2) 【メタゲノムシーケンシング】DNA抽出と精製の後、PacBio Sequel、Nanopore GridION、Illumina MiSeqを併用して非培養的なショットガンシーケンスを行い、配列解析を実施した。
- (3) 【ゲノム再構築とエピゲノム解析】ゲノムアセンブリとピニングから Metagenome assembled genome (MAG)を作成し、それらのゲノム上で起きているエピゲノムの検出と修飾モチーフ推定を行った。そしてゲノム配列からメチル化酵素遺伝子を予測し、モチーフと酵素の対応付けを行った。
- (4) 【大腸菌実験】新規のモチーフ配列を認識すると予測された酵素遺伝子候補について、大腸菌を用いた組み換え実験を行い、酵素の認識モチーフを実験的に検証した。
- (5) 【群集間比較解析】メチル化酵素遺伝子は門レベルの系統を超えて頻繁に水平伝播する一方で、同じ種や属内でも異なる分布を示す例が知られている。本解析ではサンプル内・サンプル間の比較を通じて、群集内・群集間の多様性や普遍性を評価した。
- (6) 【進化系統解析】特に Alphaproteobacteria 綱に着目し、種の系統樹と DNA メチル化酵素の分子進化系統樹を作成し、両者の比較解析を実施した。また、ゲノム中におけるモチーフ配列の出現頻度を調べ、その期待値との差を解析した。

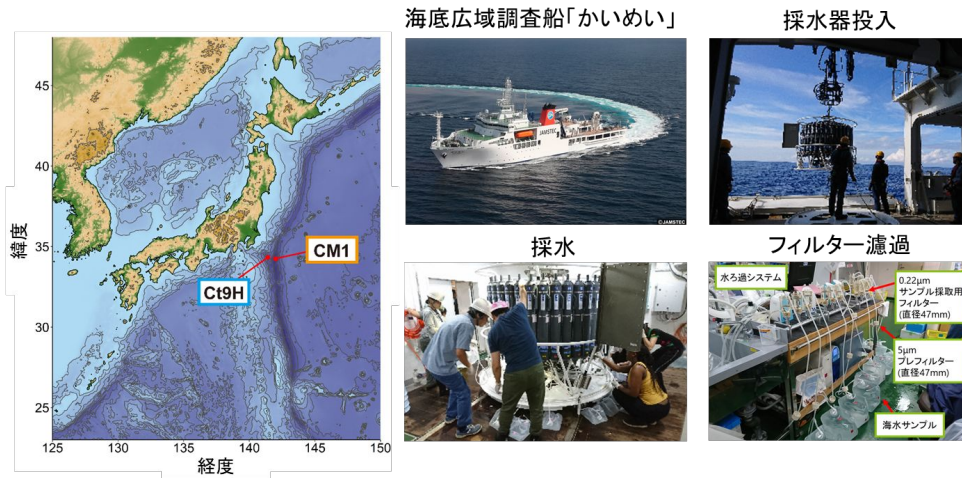


図 2 サンプルングの概要

#### 4. 研究成果

ショットガンシーケンスデータの解析から、400 以上の原核生物とウイルスのゲノム (MAG) を取得した。そして、このゲノム上から DNA 化学修飾を検出し、新規のものを含む 220 の多様な修飾モチーフを推定した (図 3)。また、DNA メチル化酵素 (MTase) 遺伝子を探索したところ、新規モチーフを特異的に認識する新規酵素を得られ、5 つについて大腸菌を用いた実験から対応関係を実証した。さらに、Alphaproteobacteria で高度に保存されている MTase ホモログの中から未知のモチーフ特異性を持つ酵素を見出し、in vivo/in vitro での酵素機能の検証や進化学的解析を行った。本研究により、海洋微生物叢を持つ多様なエピゲノムの存在が明らかになり、それらが生態や進化に大きな影響を与えていることが示唆された (Hiraoka et al. Nucleic Acids Res. 2022)。本研究成果は、海洋研究開発機構と国立遺伝学研究所より、プレスリリースを発表している。(2022/1/21 付) ([https://www.jamstec.go.jp/j/about/press\\_release/20220121/](https://www.jamstec.go.jp/j/about/press_release/20220121/))

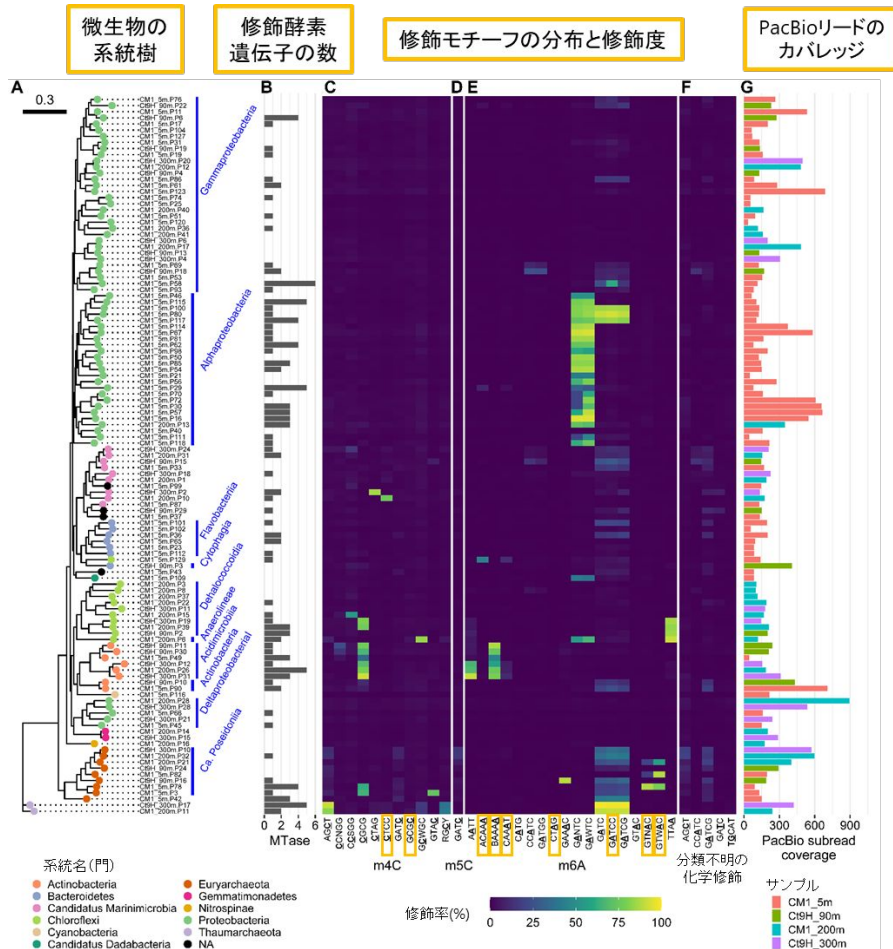


図 3 海洋細菌・古細菌が持つエピゲノムの分布

本研究では海洋微生物叢を対象に、塩基配列のみを解析対象とする狭義のゲノム解析を越えて、エピゲノムをも含む広義のゲノム解析を行うことで、微生物の生理生態や進化により深くアプローチできることを示した成果である。今後、海洋のみならず土壌や腸内といった幅広い環境に生息する微生物叢を対象に解析を実施することで、従来のゲノム解析を越えた、より深い微生物生態系や進化の理解が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraoka Satoshi, Sumida Tomomi, Hirai Miho, Toyoda Atsushi, Kawagucci Shinsuke, Yokokawa Taichi, Nunoura Takuro	4. 巻 50
2. 論文標題 Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab1292	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoshi Hiraoka
2. 発表標題 Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities
3. 学会等名 2021 PacBio Japan Virtual User Group Meeting（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡聡史、澄田智美、平井美穂、豊田敦、川口慎介、横川太一、布浦拓郎
2. 発表標題 海洋細菌叢・ウイルス叢が持つエピゲノムの多様性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡聡史、澄田智美、平井美穂、豊田敦、川口慎介、横川太一
2. 発表標題 海洋微生物叢が持つエピゲノムの多様性と進化・生態との関わり
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Hiraoka
2. 発表標題 'Metaepigenomic' analysis for identification of unexplored prokaryotic DNA methylation in nature.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（国際シンポジウム）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡聡史
2. 発表標題 バイオインフォマティクスによる環境微生物生態へのアプローチ
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース「海洋細菌叢・ウイルス叢が持つDNA化学修飾（エピゲノム）を大規模に解明」国立研究開発法人海洋研究開発機構 2022年 1月 21日  <a href="https://www.jamstec.go.jp/j/about/press_release/20220121/">https://www.jamstec.go.jp/j/about/press_release/20220121/</a></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------