

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658154

研究課題名（和文） 深海生物が身にまとう磁性硫化ナノメタル：金属濃縮機構の網羅解析

研究課題名（英文） Nanometer-sized sulfides of a deep-sea vent animal: comprehensive analysis of metal formation mechanisms.

研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：70435832

研究成果の概要（和文）：

本研究は、インド洋の深海底熱水活動域に棲息する固有巻貝とその共生微生物の環境応答機構や生物間相互作用を発現遺伝子およびタンパク質の両レベルで網羅的に解明することを目的としている。これまでの研究において、共生微生物および宿主生物の両者について、次世代シーケンサーを用いたメタトランスクリプトーム解析を行ない、それらの環境応答機構を mRNA レベルで網羅的に解析することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The main objective of this study is to reveal mechanisms by which deep-sea vent animals and their symbionts sense and respond to environmental fluctuations. By using the high-throughput sequencing technique, meta-transcriptome analysis from a deep-sea hydrothermal vent gastropod species was performed. This study lead to the identification of biological processes underlying physiological adaptation to deep-sea vent environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：深海底熱水孔環境、バイオメタル、共生、環境応答

1. 研究開始当初の背景

深海底熱水活動域は、暗黒・高圧かつ 300 °C を超える超高温の熱水が噴出する極限環境にありながら、化学合成独立微生物の一次生産活動に立脚するユニークかつ極めて生産的な生態系を育てている。1977 年の発見以降、本生態系は「地球上唯一、太陽光に直接依存しない“地球を食べる生態系”」として注目を浴び、生態学・分子生物学・地球科学など幅広い基礎研究分野で画期的な知見をもたらして続けた。しかしながら超高濃度の重金属が噴出する熱水活動域におい

て、現場の固有（微）生物が如何に金属代謝（特にその解毒）を行うかは、これまで殆ど知見がなかった。

近年の分子生物学的研究や安定同位体地球化学的研究により、現場に棲息する大型生物は、何らかの化学合成独立栄養微生物と絶対的な共生関係にあり、ほぼ全ての有機炭素を自身が共生させている化学合成独立栄養微生物（水素ガスや還元的硫黄化合物をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として利用する微生物）に依存していることが明らかとなった。しかしながら、深海底において共生

微生物と宿主生物がどのように物質を交換しているのか、深海底熱水活動域のような物理化学的環境変動の激しい環境においてどのようなメカニズムで環境変動に应答しているのか、といった微生物共生系の基礎的な分子生物学的知見は依然として皆無に近い。なぜなら、それらを実験生物学的に解析するために必要な、化学合成独立栄養性の共生微生物の分離培養、ならびに共生微生物を保持した宿主生物の長期飼育が不可能であったためである。

これまで研究代表者らは、『深海底熱水活動域に優占する難培養性イプシロンプロテオバクテリア (*Epsilonproteobacteria*) は、極めて高い二酸化炭素固定能を有することから、利用価値の高い未開拓海洋資源である』と位置づけ、その網羅的な分離培養法を世界で初めて確立するとともに、その特殊機能を二酸化炭素の再資源化および地球温暖化の防止に応用展開するため、独自に獲得した分離株群を用いて、その全ゲノム配列や生理生態学的機能、生化学的性状を解明してきた。

とくに、複数の分離株を対象とした全ゲノム解析を行なった結果、深海底熱水活動域に優占する難培養性イプシロンプロテオバクテリア (巻貝や多毛類・甲殻類など様々な動物に共生しているものもいる) は、ヘリコバクター・ピロリやキャンピロバクターといった、ヒトに蔓延する病原性微生物の祖先的特徴を有することを突き止めることに成功している。これらの病原性微生物は、慢性的な罹患や高い感染率が特徴的であり、消化管内の環境への適応機構や宿主生物 (ヒトなど) との分子的相互作用 (例えば 2 成分情報伝達システムタンパク質 Two-Component Signal Transduction System の役割など) は、重要なドラッグターゲットとして近年活発に研究されてはいるものの、それらの進化的起源や誕生過程について、広く微生物学の視点から迫ろうとするような研究例は皆無であった。

また、研究代表者らは、複数の化学合成微生物の分離株 (とくに深海底熱水孔環境に広く優占するイプシロンプロテオバクテリアの化学合成微生物群) の全ゲノム解析を通して、深海底熱水活動域に棲息する微生物群が、他に類の無いほど多くの金属センサーやその解毒システムを有することを突き止めてきた。

このような背景から研究代表者らは、平成 21-22 年度の科学研究費補助金 (挑戦的萌芽研究) において、インド洋の深海底熱水活

動域において採取したアルビン貝 (*Alviniconcha* sp.) とよばれる巻貝において、その共生微生物と宿主生物を対象とするメタトランスクリプトーム解析およびメタプロテオーム解析を実施し、その環境応答機構を網羅的に解析することに成功した。しかしながら、同海域に棲息する別の大型生物 (特に巻貝や甲殻類) およびその共生微生物については研究が進んでおらず、深海底熱水活動域に見られる共生系の環境適応機構を包括的に理解するにはほど遠い状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海底熱水活動域に生息する化学合成共生微生物とその宿主生物の環境応答機構を、発現遺伝子およびタンパク質の両レベルで網羅的に解析し、宿主生物が有する磁性硫化ナノメタルの形成機構や環境応答機構を分子レベルで解明することにある。

具体的には、本研究では中央インド洋海嶺に位置する深海底熱水活動域 (「かいいいフィールド」と呼ばれる) に棲息する細胞内共生微生物とその宿主生物 (「スケーリーフット」と呼ばれる) を研究対象として、共生微生物および宿主生物両者の環境変動への応答機構を発現している遺伝子のレベルで網羅的に解析 (次世代シーケンサーを用いたメタトランスクリプトーム解析) することとした。

本研究は、過去に全く研究例のない極限環境生物の特異なバイオナノメタル生成機構を分子レベルで網羅解明し、次世代のメタルバイオテクノロジー分野において、高効率かつ高選択的なレアメタル分取・重金属除去・金属センサー開発等の最適化を可能とするブレークスルーをもたらす可能性を有している。

3. 研究の方法

研究に用いた試料は、2009 年 11 月にインド洋中央海嶺のかいいいフィールド (水深約 2,420m) で行なった調査航海 (独立行政法人海洋研究開発機構が実施した YK09-13 航海) において、有人潜水艇「しんかい 6500」を用いて採取した。採取した個体を船上に持ち帰り、直ちに様々な条件下 (具体的には、温度や代謝基質の種類および濃度等を変化させた計 10 条件) で船上飼育実験に供した。一定時間飼育した後、経時的 (およそ 12 時間毎) に回収した個体を RNase 阻害剤の存在下にて解剖し、細胞内共生微生物が含まれる

食道組織をホモジナイズ・分画・洗浄した後、 -80°C で凍結保存した。

研究室に試料を持ち帰り、共生微生物と宿主生物細胞の含まれる画分を遠心分離により取得し、キットによりトータルRNAを抽出した。加えて、宿主生物由来のRNAと共生微生物由来のRNAをキャップトラッパー法（末端のポリAを利用する手法）により分画した。さらに、磁気ビーズを利用して、mRNAを可能な限り濃縮してから逆転写酵素を用いてcDNAを合成・精製した。NanoDropによりcDNAを定量するとともに、アガロースゲル電気泳動により、スミアあるいは特定の低分子バンドがないことを確認した。

GS FLX および Ion Torrent 用ライブラリ作成キットを用いて、cDNAを200–300bp程度にフラグメント化（Bioanalyzerによりサイズ確認を行った）精の後製した。試料毎の識別タグを付加したアダプターを連結させ精製した後、サイズゼレクトおよびクオリティーチェック・定量PCRを行ない、シーケンスライブラリーを作製した。エマルジョンPCRおよびビーズ回収の後、シーケンスを行なった。

4. 研究成果

インド洋中央海嶺の深海底熱水活動域（カイレイフィールド）に棲息する固有巻貝（スケーリーフット）について、様々な条件下で船上飼育した個体を用いて、*Gammaproteobacteria*に属する共生微生物および宿主生物の両者を対象とするメタトランスクリプトーム解析を実施した。

これまでの研究において、宿主生物から調整したcDNAを用いた解析においては、GS FLX（合計2ライブラリ、長さ計約11 Mb）および Ion Torrent（合計3ライブラリ、長さ計約230 Mb）により、合計約241Mb（約280万リード）の塩基配列情報を取得することに成功した。

また、共生微生物画分から調整したcDNAにおいては、上記と同様に Ion Torrent（合計5ライブラリ、長さ計約370 Mb、約325万リード）の配列情報を取得することに成功した。

これまでの解析において、各々の船上飼育個体に由来するライブラリでの出現頻度（すなわち各遺伝子の転写頻度）を個体間で比較するのみでなく、各個体における共生微生物および宿主生物間の遺伝子発現様式に関連性があるものを検出し、宿主生物および共生微生物において環境変動への適応に特異的かつ同調的な発現様式を示す遺伝

子群を同定している。これらの解析により、深海底熱水孔環境に生息する共生微生物および宿主生物両者の環境応答に関わる分子機構を、高解像度な発現遺伝子ネットワークとして表現することが初めて可能となった。

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1件）

- ① Konishi, M, Watsuji, T, Nakagawa, S, Hatada, Y, Takai, K, Toyofuku, T. (2012). Effects of hydrogen sulfide on the bacterial communities on the surface of galatheid crab, *Shinkaia crosnieri*, and in bacterial mat, by using rearing tanks. *Microbes Environ* 28, 25-32. doi:10.1264/jsme2.ME12070、査読有り

〔学会発表〕（計4件）

- ① 小西 正朗、深海からの新規バイオサーファクタント生産菌の分離、日本生物工学会64回大会、2012年10月23日、神戸国際会議場（兵庫県）
- ② 小西 正朗、飼育培養手法を用いた化学合成系無脊椎動物の共生菌-宿主関連性の実験的検討、日本地球惑星科学連合2012年度連合大会、2012年5月20日、幕張メッセ（千葉県）
- ③ 阿部 真理子、インド洋中央海嶺熱水活動域と南マリアナ熱水活動域におけるアルビン共生菌の系統・機能遺伝子発現・活性解析、第27回日本微生物生態学会、2011年10月8日、京都大学（京都市）
- ④ 島村 繁、Genome analysis on the horizontally transmitted bacterial endosymbiont of deep-sea vent gastropod in the Central Indian. 2011年ゲノム微生物学会ワークショップ、2011年8月20日、東北大学（仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：70435832

(2) 連携研究者

高井 研 (TAKAI KEN)
独立行政法人・海洋研究開発機構・研究員
研究者番号：80359166

澤辺 智雄 (SAWAB TOMOO)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：30241376
鈴木 庸平 (SUZUKI YOHEY)
東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：0359168