

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710011

研究課題名(和文) 海洋シアノファージによる溶菌に由来する溶存態タンパク質の変遷プロセスの解明

研究課題名(英文) Metaproteomics of viral lysates in a marine *Synechococcus*

研究代表者

吉田 光宏 (YOSHIDA, Mitsuhiro)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・ポストドクトラル研究員

研究者番号：60565555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海洋の炭素・窒素サイクルの促進に関わるウイルスの感染・溶菌現象に着目し、海洋溶存有機物プールへの供給に寄与する宿主細胞溶解物のプロテオーム組成を明らかにした。海洋シアノファージの代表株を用いて調製した宿主シアノバクテリアの培養溶菌液に由来する溶存有機物のプロテオーム解析を行った。その結果、溶菌後の溶存態画分中のプロテオームの主な構成は、光合成関連タンパク質や糖質・アミノ酸代謝関連酵素、ウイルス構造タンパク質であった。ウイルス溶菌後に溶存態として存在するプロテオームの形成には、細胞に含まれるタンパク質分子の違い・細胞内局在の違いが関わっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the comprehensive metaproteomic analysis using the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was performed to investigate the dissolved (< 0.2 μm) proteomic composition of viral lysates occurring during infection of a marine cyanobacterial *Synechococcus* sp. The analysis of the lysate proteome revealed that photosynthetic proteins, metabolic enzymes involved in amino acids and carbohydrates, and viral capsids were major components, possibly indicating the formation of dissolved proteins during viral infection was influenced by differences in the nature and subcellular localization of protein molecules.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環 溶存有機物 プロテオミクス 微生物ループ 海洋

1. 研究開始当初の背景

溶存有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM)は、海洋の有機物の90%以上を占め、海洋生態系における物質循環(炭素・窒素循環および微生物ループ過程)の駆動を担っている。DOMの生産プロセスとしては、(1)植物プランクトンによるDOMの細胞外放出、(2)動物プランクトン捕食後の分解産物(DOM)の生成、(3)ウイルス感染による宿主(細菌・植物プランクトン)の崩壊時の細胞外DOM放出、が知られているが、これらのプロセスにおける生成および分子変換機構についての詳細な研究例は殆どない。

近年、海洋でのバクテリオファージ(細菌に感染するウイルス)による細菌の死滅は、微小鞭毛虫による捕食と同レベルの影響を持つと見積もられており、ファージによる溶菌も重要なプロセスであるとの認識が持たれている。ファージのなかで、特に、水圏環境中の一次生産者であるシアノバクテリアに感染するファージの研究が盛んに行われてきた。そのような中、本課題代表研究者は、湖沼で多発する有毒アオコ原因シアノバクテリアおよびその感染性ファージの生態学的相互関係を解析し、ファージが宿主の動態を制御する消滅因子であることを突き止めた<sup>3)</sup>。また、研究代表者は、海水に含まれる溶存タンパク質のプロテオームについて網羅的ショットガン法を行うことにより、シアノバクテリアとファージに由来するタンパク質が豊富に存在することを発見した(図1; 雑誌論文(1)参照)。この結果は、シアノバクテリアとファージの相互作用が海洋の溶存タンパク質プールに寄与することを示唆するものである。しかしながら、ファージによる溶菌に由来する溶存タンパク質の生成プロセスは不明であるのが現状である。こうした経緯を踏まえ、微生物ループや海洋の物質循環に対するファージの寄与についても興味を持ったため、本研究課題の提案に至った。

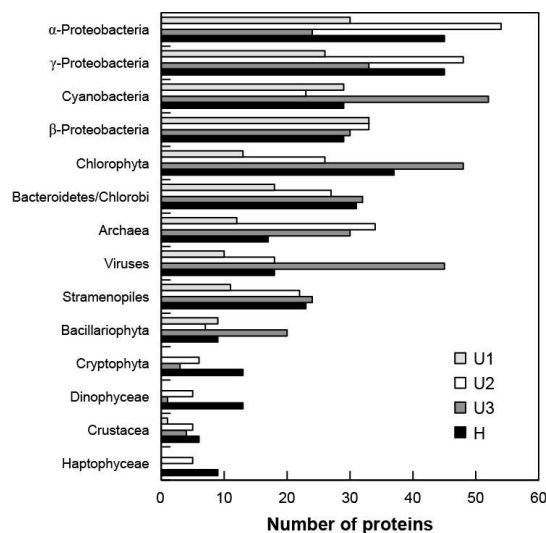


図1. 日本沿岸海域(愛媛県近海表層4地点)における溶存態タンパク質の由来微生物分類群別の分布 (Yoshida *et al.*, *J. Oceanogr.*, 2014).

本研究は、(3)で形成されるDOMのうち、タンパク質の運命を解明する研究と位置づけられる。さらに、海洋でのタンパク質の分子変換におけるファージの寄与を解明し、微生物ループでのファージのあたらしい生態学的機能を明らかにできる研究である。

2. 研究の目的

海洋の炭素循環におけるファージの寄与を明らかにするために、本研究では、DOMのなかでも、易分解性物質で生物体の50%以上を占めるタンパク質に焦点をあて、海洋の一次生産者であるシアノバクテリア(*Synechococcus*)の感染ファージ溶菌プロセスにおける生成溶存タンパク質のプロテオーム組成の全体像を網羅的ショットガン解析により明らかにする。

3. 研究の方法

代表的なシアノファージ感染系である宿主 *Synechococcus* sp. WH7803 株とその感染ファージ株 S-PM2 の培養系を用いて溶菌液を調製した。57時間後に得られた完全溶菌液を0.2 μm フィルターで濾過し、その濾液を溶存態画分とした。この画分を限外濾過・TCA沈殿により精製した溶存態タンパク質試料についてSDS-PAGEを行った。各レーンにつき、CBB染色された部分を20~30区分に切り分け、in-gel消化法を用いてペプチド抽出した後、イオントラップ型のLC-MS/MS質量分析計に供した。

4. 研究成果

海洋シアノファージの代表株(S-PM2)を用いて、宿主シアノバクテリア(*Synechococcus* sp. WH7803)の培養溶菌液を調製した。ファージ感染開始から57時間後には、宿主が完全溶菌した(図2)。57時間後と溶菌途中の33時間後の試料(それぞれ57h試料と33h試料)に含まれる溶存タンパク質画分を抽出・精製し、SDS-PAGE解析を行った(図3)。ファージ感染直後(0h)は、溶存態タンパク質のバンドおよびタンパク質の存在を示すCBB染色像が観察されなかった。一方、感染開始から33時間後(33h)・57時間後(57h)には、明瞭な複数のバンドが観察された。さらに、これらの試料ではスメア状のバンドパターンを示したことから、多様なタンパク質の存在が示唆された。この結果から、ファージ感染後において一部のタンパク質が宿主細胞から消失し、分解を経て溶存態へと移行したものと推察された。

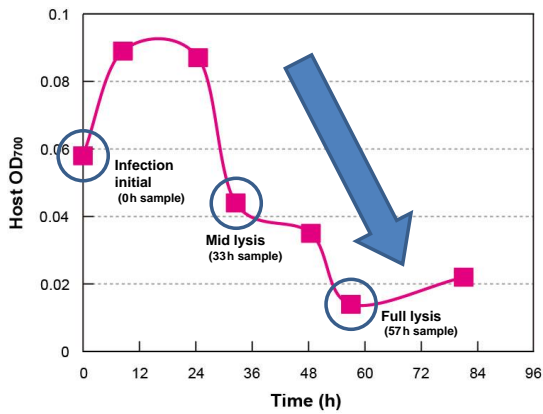


図 2. シアノファーゲ S-PM2 による宿主 *Synechococcus* sp. WH7803 の溶菌過程。

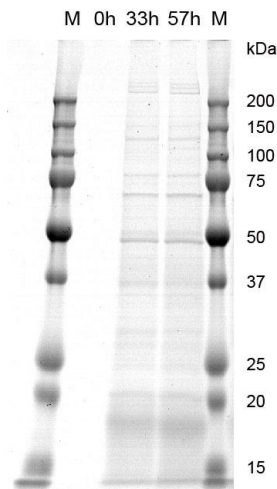


図 3. S-PM2 感染・溶菌プロセスにおける *Synechococcus* 宿主細胞溶解物に由来する DOM 画分中プロテオームの SDS-PAGE 展開。

双方の試料においてバンドパターンにあまり違いが見られなかったことから、57 h の試料を溶菌陽性対象として選択し、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオーム法に供した(図 4)。解析した溶存態プロテオームより同定されたタンパク質の細胞内局在を調べた結果、細胞質に局在するタンパク質が全体のおよそ半数を占め、最も高い割合を示した(43%)。一方、細胞膜などの他の細胞部位に存在するタンパク質の割合は低かった。これらの部位(特に細胞膜)には、ファージによる溶菌を受けてもなお細胞レベルの高分子構成を保ったままのタンパク質、あるいは二次的に高分子粒子形成を伴ったタンパク質が存在し、分解を受けずに残存している可能性が示された。KEGG によるタンパク質機能分類に準拠すると、溶菌後の溶存態画分中のプロテオームは、光合成関連タンパク質(20%)やウイルス構造タンパク質(16%)、糖質・アミノ酸代謝関連酵素(それぞれ 12%・11%)が主要構成員であった。以上のように、ウイルス溶菌後に溶存態として存在するプロテオームの形成には、細胞に含まれるタンパク質分子の違い・細胞内局在の違いが関わっている可能性が考えられた。

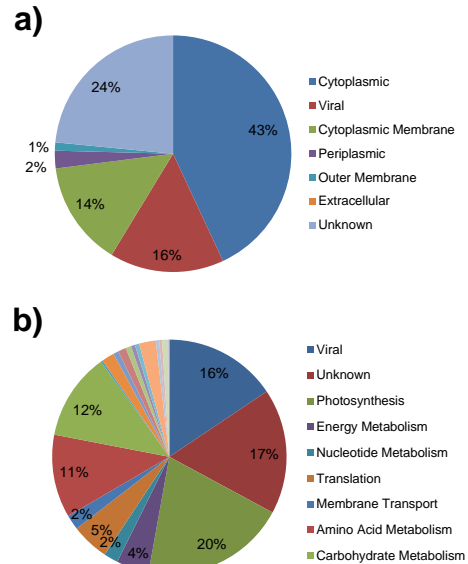


図 4. S-PM2 による宿主 *Synechococcus* 溶菌後(57 h 後)の溶存画分におけるタンパク質の(a)細胞内局在および(b) KEGG 機能カテゴリー別分布。

各試料において同定した総 MS/MS スペクトルデータをもとにペプチド計数を行った結果、光合成色素タンパク質に由来するペプチドの量が最も多く検出された。他の溶菌現象である細胞の自己分解プロセスにおいては、栄養制限にตอบสนองして自身に多く含まれる光合成色素タンパク質を分解・利用して生残する機構が発動するため、細胞溶解時にはこのタンパク質が溶存態としてあまり放出されない可能性が考えられる。今後、人工的に栄養源を制限したバッチ培養系の試料についても解析し、得られたデータを上記のウイルス溶菌データと擦り合わせることで、ウイルス溶菌が海洋生態系に与える生物地球化学的循環へのインパクトを明確にする予定である。

## 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(査読有)] (計 6 件)

- (1) Yoshida M, Yamamoto K, Suzuki S (2014) Metaproteomic characterization of dissolved organic matter in coastal seawater. *J. Oceanogr.*, 70(1): 105-113. DOI: 10.1007/s10872-013-0212-6
- (2) Yoshida M, Suzuki S (2014) Heavy oil exposure increases viral production in natural marine bacterial populations. *J. Oceanogr.*, 70(1): 115-122. DOI: 10.1007/s10872-013-0216-2
- (3) Yoshida M, Takaki Y, Eitoku M, Nunoura T, Takai K (2013) Metagenomic analysis of viral communities in (hado)pelagic sediments. *PLoS ONE*, 8(2): e57271. DOI: 10.1371/journal.pone.0057271

- (4) Yoshida-Takashima Y, Yoshida M, Ogata H, Nagasaki K, Hiroishi S, Yoshida T (2012) Cyanophage infection in the bloom-forming cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in surface freshwater. *Microbes Environ.*, 27(4): 350-355.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME12037>
- (5) Shozen K-I, Satomi M, Yano Y, Yoshida M, Fukui Y, Takano T, Funatsu Y (2012) Effect of sucrose and halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* on chemical characteristics and microbial proliferation during fish sauce fermentation. *J. Food Safety*, 32(4): 389-398.  
DOI: 10.1111/j.1745-4565.2012.00392.x
- (6) Fukui Y, Yoshida M, Shozen K-I, Funatsu Y, Takano T, Oikawa H, Yano Y, Satomi M (2012) Bacterial communities in fish sauce mush using culture-dependent and -independent methods. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58(4): 273-281.  
DOI: 10.2323/jgam.58.273

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 吉田光宏, 島村繁, 布浦拓郎, 高井研. 海洋シアノファージによる溶菌に由来する溶存態有機物のプロテオーム解析. 第 29 回日本微生物生態学会, 鹿児島大学, 2013/11/23.
- (2) 吉田光宏, 高木善弘, 布浦拓郎, 高井研. Metagenomic analyses of the viral communities in (hado)pelagic sediments. 第 28 回日本微生物生態学会, 豊橋科学技術大学, 2012/9/20~2012/9/21.
- (3) Yoshida M, Nunoura T, Takaki Y, Takai K. Metagenomic analyses of viral communities in (hado-)pelagic sediments. 第 6 回国際水圏ウイルスワークショップ, オランダ・テセル島, 2011/11/1.
- (4) 吉田光宏, 布浦拓郎, 高木善弘, 高井研. 深海堆積物表層環境におけるウイルスメタゲノムの解析. 第 27 回日本微生物生態学会, 京都大学, 2011/10/8.

[その他]

アウトリーチ活動: 海洋研究開発機構横須賀本部での科研費採択研究に関する一般公開 (2011/10/1).

JAMSTEC 機関リポジトリのホームページ:  
[http://www.jamstec.go.jp/jir/infolib/meta\\_pub/G000002REP](http://www.jamstec.go.jp/jir/infolib/meta_pub/G000002REP)

(JAMSTEC 機関リポジトリ: 海洋研究開発機構で生み出された学術雑誌論文、紀要論文、会議発表用資料、図書等の知的生産物を電子的な形態で保存し、公開するシステム。[OAI-PMH 準拠])

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 光宏 (YOSHIDA, Mitsuhiro)  
独立行政法人 海洋研究開発機構・海洋・  
極限環境生物圏領域・ポストドクトラル  
研究員.  
研究者番号: 60565555