

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651018

研究課題名(和文)環境が選んだ海底下未知微生物の機能を環境条件を用いた発現を鍵として読み解く

研究課題名(英文)Exploration of unknown microbial function through gene expression

研究代表者

諸野 祐樹 (Morono, Yuki)

独立行政法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・サブリーダー

研究者番号：30421845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では99%以上とも言われる環境中未知微生物資源という名の巨大なプールから数々の有用機能を取り出すことを目的とし、具体的には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。試料としては、海底下という、広大かつ未知領域の大きい環境を対象とし、基質誘導をアクセスの扉とすることで、未知の遺伝子機能推定や、遺伝子資源探索を試み、多様な微生物を由来とする遺伝子断片を取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied Substrate Induced Gene Expression (SIGEX) method to decipher unknown gene function of environmental microbes. We used drilled subseafloor sediment samples as DNA sources and established highly efficient SIGEX procedure. We could obtain many organo-halogen induced DNA fragments originating diverse microbial genome. Although there are several issue to be solved, this SIGEX approach can be useful technique to explore functions of unknown microbes in variety of environment.

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：海底下生命圏 遺伝子発現 機能遺伝子

### 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<sup>[1,2]</sup>が、リボソーム RNA 遺伝子配列による分子系統学的解析によると、海底下には現在まで分離・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<sup>[3]</sup>。

このような未培養系統微生物の生態を解明するために分子生物学的解析やメタゲノム解析などが行われているが、従来の機能推定では相同性検索に頼らざるを得ず、海底下試料に対して行われた例では、8割程度の配列が機能未知という結果に終わっている<sup>[4]</sup>。海底下で実際どのような微生物活動が行われているかについては、培養による単離が困難である以上、化学物質組成の鉛直プロファイルと群集構造を突き合わせて推測するしか手立てがなく、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長く議論されてきた。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資源の宝庫であることを示しているとも言え、手段さえ整えば遺伝子資源としてだけでなく、地球規模での物質循環プロセスに果たす役割についても知見が得られる可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究では未知遺伝資源の開拓と未知微生物の生態解明とを目標とした。機能推定の手段としては基質誘導による機能遺伝子発現解析 (SIGEX: Substrate Induced Gene Expression<sup>[5]</sup>) を用いた。ゲノムライブラリー中に存在する機能遺伝子の調節領域が基質による誘導に反応すれば形質転換宿主が蛍光を発する。これを FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)により高速選別し、調節領域の下流に存在する機能遺伝子を効率的に取得するものである。本研究ではこの方法を環境微生物の生体機能ポテンシャルを探るツールとして初めて用いるほか、嫌気緑色蛍光タンパク質<sup>[6]</sup>もレポーター遺伝子として用い、嫌気的な海底下生命圏における総合的な微生物群代謝機能推定ツールとしてアップグレードする。

### 3. 研究の方法

本研究では、平成24年度、平成25年度の2カ年度で実施した。研究期間では、基礎的な技術の検討、既存手法における問題点の洗い出し、解決のための方策およびその設計を含め、研究の土台になる部分にも注意を払いながら実施した。具体的には基礎的な技術検討により明らかになった既存手法の問題を解決する(1)効率向上のための手法改良、海底下の大半を占める嫌気環境対応型への

手法アップグレードを行う(2)好気/嫌気用ゲノムライブラリーの作成を行い、引き続き(3)SIGEX解析による環境代謝ポテンシャルの測定、および基質誘導応答遺伝子の取得で手法としての確立と新規塩基配列の解読を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 効率向上のための手法改良

実際にSIGEXのスキームを試験的に実施してみたところ、初段階のゲノムライブラリー構築での断片挿入効率が低く、100-1000種類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100-1000種類のクローンでカバーできるのは最大15Mbであり、数種の微生物ゲノムしかカバーしていないライブラリーを用いて微生物生態解析を行うのは理論的に不可能である。問題点解決の為、本研究ではTA-TOP0ベクターの利用を考案した(図1、pK18GreenTIR-TOP0)。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、TOP0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る。末端TOP0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。まず、市販されているTOP0-TAベクター(pCR2.1-TOP0)を用いて5-15kbの断片の挿入を試みたところ、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。

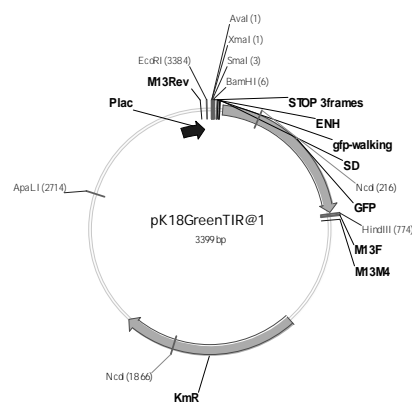


図1: pK18GreenTIR-TOP0

次に、ライブラリー作成のためのDNA抽出について検討を行った。市販キットによるDNA抽出前と抽出後、それぞれの海底下堆積物について微生物細胞数の計数<sup>[7]</sup>を行ったところ、ガーネットビーズを用い、高速で振とうする物理的細胞破碎によって破碎される細胞の割合は平均30.7%と、1/3程度以下に留まるとということが明らかとなった。そこで、DNAを抽出する手法の見直しを行った。大腸菌からプラスミドを抽出する際に行うアルカリ調製法からヒントを得て、アルカリ環境で熱を加えることにより、堆積物中の細胞が効率的に溶菌することを発見した。様々な深度の海底下堆積物に適用したところ、試料中

に存在する微生物の 60-80%程度が溶菌することが明らかとなり、抽出されてくる DNA の総量も増加した。これを論文として発表した<sup>[9]</sup>。

また、SIGEX は GFP をレポータータンパク質として利用しているが、分子状酸素が存在しないと発現した GFP タンパクが蛍光を持つ成熟型にフォールディングされないという欠点がある<sup>[9]</sup>。嫌気環境で培養した GFP 発現細胞培養液に酸素を吹き込んでフォールディングを促す方法も報告されているが、実際に試した限り正常にフォールディングされるのは形質転換宿主全体の 1%未満であり、SIGEX のような発現応答解析には用いることが出来ない。海底下環境の大半は酸化的物質の存在しない嫌気的環境が占めている。このような環境から得られたゲノムを用いて SIGEX を行うために嫌気状態のままに蛍光を発するタンパク質 *evoglow*<sup>[9]</sup> を改良型のレポータータンパク質として活用した、第二のベクターも構築した (pK18evoglow-TOPO。evoglow は酸素の存在にその蛍光強度がほとんど左右されないことから、嫌気/好気、それぞれの遺伝子発現パターンの比較や嫌気でのみ機能を有する調節因子など、これまで純粋菌株を分離してはじめて見つかるような遺伝子(群)が得られる可能性がある。

#### (2)好気/嫌気用ゲノムライブラリーの作成

次に、ゲノムライブラリーの作成を行った。まず堆積物の培養により脱ハロゲン活性が見られていた南海トラフ地震発生帯掘削試料を用い、ライブラリーの作成を行った。この時点では pK18GreenTIR のみが完成していたため、こちらを使用してライブラリーを作成した。エレクトロポレーションを用いた形質転換の結果、DNA の長さとして 2-5kb の断片を挿入したもので最大約 11 万バリエーションの形質転換体を持つライブラリーを作成することに成功した。一方、TOPO 化したベクターを用いたにもかかわらず、全体の 60-70%は DNA 断片が入っていないコロニーであり、長鎖での形質転換効率も 1 万バリエーションに届かないものが多いなど、問題点も顕在化した。

さらに、統合国際掘削計画(IODP)の第 329 次掘削航海で得られた南太平洋還流域 (SPG) 試料についても DNA 抽出を行い、pK18evoglow-TOPO ベクターに形質転換を行った。この際にはベクターへ DNA を挿入する際のベクターと挿入 DNA の混合比、エレクトロポレーションを行うに当たっての DNA 精製度や投入量、さらにはエレクトロポレーションの回数を増やすなど、様々な工夫を行った。結果として、SPG 掘削試料から 6 試料で DNA を取得してライブラリーを作成、ライブラリーを構成する形質転換体のバリエーションは 100 万を超え、当初目標としていた 10 万バリエーションを大きく超え、目標の 10 倍以上、1 ライブラリーあたり 5Gbp ~ 180Gbp の

遺伝子断片を有するライブラリーの構築を成し遂げた。また、断片の挿入効率も劇的に向上し、未挿入クローンの割合は 1 割以下に低下した。

これらのライブラリーについて、緑色蛍光を発しない断片挿入クローンのみをセルソーターで高速選別することでゲノムライブラリーとして構築作業を完了した。

#### (3)SIGEX 解析による環境代謝ポテンシャルの測定、および基質誘導応答遺伝子の取得

まず、南海トラフ掘削試料を用いて作成したライブラリーから有機ハロゲン物質を気質とした際に遺伝子発現応答を示したクローンに取得を行った。遺伝子群を取得、シーケンス解析を行った結果、脱ハロゲンに関連する可能性のある遺伝子群を得た。三塩化フェノール (TCP)、三臭化フェノール (TBP)、三ヨウ化フェノール (TIP) のそれぞれを基質としてクローンをソーティングし、96 ウェルプレートにおいて基質誘導性の確認などを行い、計 45 クローンを基質誘導クローンとして取得した。これらについて、塩基配列解析を行った。解析結果として得られたクローンには、重複しているものも見られたが、23 のユニークな塩基配列を得た。これらについてデータベース検索を行ったところ、脱塩素を行うことが知られている *Dahalococcoides* 属細菌と相同な塩基配列が見つかった一方で、*Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Deferribacteres* や *Methanomicrobia* など、多様な微生物を由来とする配列が見られた。さらに、メタン生成アーキアである *Methanomicrobia* 属の *Methanococcoides* に由来であると思われる遺伝子断片も見つかった。また、解読された塩基配列のうち、9 断片については、データベース上で有意な相同性を示す配列が見つからないものも存在した。タンパク質のアミノ酸配列としての相同性では、いくつかの遺伝子配列において *permiase* やトランスポーターとの相同性が認められたほか、転写因子と相同性を示す配列も存在し、これらの結果をまとめ、堆積物中の微生物群集構造や脱ハロゲン活性のデータと共に論文として発表した<sup>[10]</sup>。

一方で、配列解析における問題点も露見した。得られた 45 種類の基質応答プラスミドのうちのいくつかで、サンガー法による塩基配列決定が著しく困難である配列が存在した。プラスミド自身の加熱変性や、挿入配列部分の PCR 増幅を試みても解析状況が好転しなかったことから外部業者へ委託し、難読配列用の試薬などを用いて解析を実施したが状況は変化せず、サンガー法による解析は不可能であるという状況に陥った。基質誘導に対する応答遺伝子を取得するという SIGEX 法の性質から、転写因子を含む配列が得られることが想定される。転写因子には自己会合によりヘアピン構造などをとるものも知られ

ており、これらの二次構造がサンガー法における配列解析を妨げていた可能性がある。

#### 今後の展望

本研究では、SIGEX 法を海底下堆積物に適用するための基礎技術開発、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ことに成功した。目標として設定したライブラリーサイズを大きく上回る効率の高い手法を確立したことで、環境を構成する希少かつ特徴的な微生物の有する遺伝子断片をも拾い上げられるようになったことは、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。

今後は、確立した本手法をさらに応用し、多様な環境中に存在する微生物群からの機能遺伝子発見に努めると共に、新規機能を有する遺伝子の応用へも目を向けた研究展開を図っていききたい。これに際しては、前述した遺伝子配列解析における問題点を解決するための工夫なども入れ込みつつ、効率的な機能遺伝子探索となるようなグレードアップを図りながら進めたい。

#### 参考文献

- [1]. Whitman, *et al.*, *PNAS* **95**, 6578-6583, doi:10.1073/pnas.95.12.6578 (1998).
- [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]. Uchiyama, *et al.* *Nat Biotech* **23**, 88-93 (2005).
- [6]. Drepper, T. *et al.* *Nat Biotech* **25**, 443-445 (2007).
- [7]. Morono, *et al.* *ISME J* **3**, 503-511, doi:10.1038/ismej.2009.1 (2009).
- [8]. Morono, *et al.* *Appl Environ Microbiol* **80**, 1985-1994 (2014).
- [9]. Zhang, *et al.* *FEMS Microbiol Lett* **249**, 211-218, doi:doi:10.1016/j.femsle.2005.05.051 (2005).
- [10]. 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

(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4件)

Kawai, M., Futagami, T., Toyoda, A., Takaki, Y., Nishi, S., Hori, S., Arai, W., Tsubouchi, T., Morono, Y., Uchiyama, I., Ito, T., Fujiyama, A., Inagaki, F., and Takami, H. (2014) High frequency of phylogenetically

diverse reductive dehalogenase-homologous genes in deep seafloor sedimentary metagenomes. *Front. Microbiol.*, 査読有り, 5, Article no. 80. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00080

Morono, Y., Terada, T., Hoshino, T., and Inagaki, F. (2014) Hot-alkaline DNA extraction method for deep seafloor archaeal communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有り, 80, 1985-1994. DOI: 10.1128/AEM.04150-13

Morono Y., Terada T, Jens K, Fumio I. (2013). An Improved Cell Separation Technique for Marine Subsurface Sediments: Applications for High-throughput Analysis Using Flow Cytometry and Cell Sorting. *Environ Microbiol.* 査読有り, 15:2841-2849. DOI: 10.1111/1462-2920.12153

Futagami, T. \*, Morono, Y. \*, Terada, T., Kaksonen, A. H., and Inagaki, F. (2013) Distribution of dehalogenation activity in seafloor sediments of the Nankai Trough subduction zone. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 査読有り, 368, 20120249 DOI:10.1098/rstb.2012.0249 (\*equal contribution)

#### 〔学会発表〕(計10件)

Morono, Y., Ito, M., Terada, T., and Inagaki, F. (2013. 12. 11) Metabolic activity of seafloor microbes in the South Pacific Gyre. AGU Fall Meeting, San Francisco, USA.

Morono, Y., Ito, M., Terada, T., and Inagaki, F. (2013. 11. 29) Technological challenges for the advanced study of deep seafloor life. International Astrobiology Workshop 2013, JAXA/ISAS, Sagami-hara, Kanagawa, Japan.

諸野祐樹 (2013. 10. 27) 海底下環境における微生物生命圏とその生態に関する研究, 日本極限環境生物学会, 明治大学, 川崎市.(奨励賞受賞講演)

諸野祐樹, 寺田武志, 星野辰彦, 稲垣史生 (2013. 10. 27) 強アルカリ条件を用いた海底下試料からの効率的核酸抽出法の確立とその評価. 第14回極限環境生物学会年会, 明治大学, 川崎市.

Morono, Y., Terada, T., and Inagaki, F. (2013. 8. 26) Technological challenges for the advanced study of seafloor life. Goldschmidt 2013, Florence, Italy. (INVITED)

諸野祐樹, (2013. 6. 15), 海底下における微生物とその代謝・活性, 未知の海底下生命圏を紐解くテクニックとその応用, 極限環境生物学会 第14回シンポジウム, 東洋大学 (招待講演)

諸野祐樹, 伊藤元雄, 寺田武志, 稲垣

史生 . ( 2013. 5. 30-6. 1 ) NanoSIMS およ  
びセルソーティングによる南太平洋環  
流域堆積物試料中の微生物代謝活性解  
析 , 日本地球惑星科学連合 2013 年大会 ,  
幕張 .

諸野祐樹 , 寺田武志 , 稲垣史生 , (2012. 12.  
1) , 海底下堆積物からの細胞分離法の確  
立 , およびフローサイトメトリーによる  
菌数カウントと選択的細胞濃縮 , 極限環  
境生物学会 第 13 回年会 , 日本大学 , 東  
京

諸野祐樹 , (2012. 10. 5) , 「微生物は一  
億年生きる ? - 最新の技術で探る海底  
下生命圏とその生存戦略 - 」 , 酵素工学  
研究会第 68 回講演会 , 東京大学 ( 招待講  
演 )

Morono Y., Terada T., Nishizawa M., Ito M.,  
Hillion F., Takahata N., Sano Y., and  
Inagaki F. (2012. 5. 7) Carbon and nitrogen  
assimilation in deep subseafloor microbial  
cells, Microenergy 2012, Aarhus, Denmark

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

諸野 祐樹 ( Morono , Yuki )

独立行政法人海洋研究開発機構 ・ 高知コ  
ア研究所 ・ サブリーダー

研究者番号 : 30421845