

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660146

研究課題名(和文) 深海底に残るピロリ菌誕生過程の足跡：祖先型微生物と大型生物の網羅的相互作用解明

研究課題名(英文) Exploring the evolution of Helicobacter pylori in deep-sea: a comprehensive analysis of ancestral microbes-host interactions.

研究代表者

中川 聡 (Nakagawa, Satoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70435832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、深海底熱水活動域に見られる特異な『細胞外共生微生物とそのホスト生物』の相互作用を、網羅的に分子レベルで解明することにある。水深1000mを超える深海底から複数の細胞外共生生物(主に甲殻類、それらは主に硫酸酸化能を持つイプシロンプロテオバクテリア(ピロリ菌の祖先的性質を有する)およびガンマプロテオバクテリアに属する外部共生微生物を腹部剛毛に有する)を採取し、様々な環境条件下における代謝活性を遺伝子および代謝物質レベルで解析することに成功した。さらに、それらを内部共生および病原性近縁種-ホスト生物間の相互作用と比較検証している。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this study is to reveal the molecular mechanisms underlying the symbiosis between invertebrates and their epibionts in deep-sea hydrothermal vent environments. We especially have focused on the squat crab which is endemic to Japanese deep-sea hydrothermal fields (approximately 1000m in depth). The crab, on its setae, harbors sulfur-oxidizing symbionts belonging to Epsilonproteobacteria (including Helicobacter pylori) or Gammaproteobacteria. Effects of environmental fluctuations on the transcriptome and metabolome were examined. The molecular data were compared with corresponding data from host-endosymbiont symbiosis in deep-sea or host-pathogen interactions.

研究分野：微生物生態学

キーワード：深海底熱水活動域

1. 研究開始当初の背景

地球表面積の 7 割を占める海洋の平均水深は 3,800 m に達し、海洋生物圏のほとんどは暗黒・低温・高圧の深海である。しかし生物学的な研究対象としての海洋は表層が主体であり、深海底のほとんどは砂漠のような一見無生物の世界が延々と広がっている。深海底熱水活動域は、暗黒・高圧かつ 300 を超えるような超高温の有毒熱水が噴出する極限環境にありながら、海底から噴出する熱水中に含まれる還元物質（例えば硫化水素や水素ガス）を利用する化学合成共生微生物の一次生産活動に立脚する極めて生産的な生態系を育てている。現場に生息する大型生物は、それ自身は熱水成分を利用する化学合成能を持たず、それぞれが特定の化学合成微生物を細胞内あるいは細胞外に共生させることで、海洋表層からの有機物インプットがきわめて少ない深海底に生息する能力を獲得している。1977 年の発見以降、現場は「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」として注目され、生態学・分子生物学・地球科学など幅広い研究分野で画期的な知見をもたらす続けてきた。しかし、深海底熱水活動域における微生物共生系の分子的知見（例えば共生微生物とホスト間の物質交換や環境応答機構）は、依然ほぼ皆無である。なぜなら、それらの分子機構を実験生物学的に解析するために必要な、イプシロンプロテオバクテリアあるいはガンマプロテオバクテリアと呼ばれる深海底熱水活動域に固有の共生微生物の分離培養や、ホスト生物の長期飼育が困難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棲息する難培養性イプシロンプロテオバクテリアは、極めて利用価値の高い未開拓海洋資源である』と位置づけ、研究を進めてきた。その過程において、本微生物群の網羅的培養法を世界に先駆けて確立し、その類稀な共生能を理解し応用開発するため、主に細胞内共生イプシロンプロテオバクテリアを含めた生理・生化学的解析を進めてきた。例えば、本研究に関連する特筆すべき成果として、本共生微生物の一群が、世界的にも深海底熱水活動域にほぼ特異的に優占するにもかかわらず、ヘリコバクター属（胃癌原因菌とされるピロリ菌を含む）やキャンピロバクター属（腸炎等の原因菌を含む）といった人類に蔓延する重要病原性微生物（自然環境中にはほとんど優占的には検出されない）の祖先的特徴を有することを突き止め、専門誌やプレスリリースなどを通して報告してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海底熱水活動域に棲息する外部共生イプシロンプロテオバクテリアおよびガンマプロテオバクテリアとそのホスト生物において、生物毎の生命現象およ

び生物間の相互作用や環境変動への応答機構を、遺伝子および代謝物質レベルで網羅的に解析し、深海底熱水活動域に見られる内部共生系および人類に蔓延する病原性近縁種-ホスト生物間に見られる相互作用と比較検証することにある。具体的には、深海底熱水活動域から採取した外部共生微生物・ホスト生物の両者を様々な環境条件下で船上飼育し、生物毎に調整した試料を用いた時系列メタトランスクリプトーム・メタボローム解析、即ち 網羅的発現遺伝子解析 (RNA Seq)、細胞中に存在する全代謝物質の解析を行うことで目的を達成する。

3. 研究の方法

世界でも中部沖縄トラフの深海底熱水活動域にのみ棲息する細胞外共生微生物とそのホスト生物を主な研究対象とした。上述した目的を達成するため、深海底から採取した生物を直ちに（船上で）様々な条件下で（具体的には当該生物の生息環境の物理化学セッティングをベースに温度・エネルギー代謝基質の組み合わせ・安定同位体ラベル基質の種類を変えた）飼育（一定時間インキュベート）し、大きく 2 種類の解析手法、すなわち 網羅的発現遺伝子解析（メタトランスクリプトーム解析; RNA Seq）、全代謝物質解析（メタボローム解析）を経時的に実施することとした。

4. 研究成果

平成 25 年度は、中部沖縄トラフの深海底熱水活動域に特異な甲殻類とその細胞外共生微生物のそれぞれにおいて、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子の網羅解析（トランスクリプトーム解析）を実施する予定であった。本解析は平成 25 年度前半の航海で採取する試料を用いて実施する予定であったが、航海の時期が 2014 年 1 月に変更されたため、予備的に 2011 年 9 月に調整しマイナス 80 度で保存していた生物試料を用いて一連の作業、すなわち生物の各部位からトータル RNA を抽出し、ポリ A を用いてホスト生物と共生微生物由来の RNA を分画、さらに特殊に設計した磁気ビーズを用いて rRNA をハイブリダイズ・除去し、mRNA の割合を高めた。上記の航海で採取し保存していた複数の個体を用いて、複数回にわたりホスト生物および共生微生物に由来するトータル RNA を調整したが、ほとんどの試料において RNA の断片化（おそらく保存中に生じたものと考えられる）が高度に進んでおり、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析に必要なクオリティーの cDNA を調整することは不可能であると判断された。そこで、トランスクリプトーム解析は 2014 年 1 月の航海で調整した新鮮な試料を用いて生物の採取後迅速に行うべきであると判断した。しかしながら、上記 2011 年度の保存試料からシーケンス解析に足るクオリティーのゲノム DNA を得

ることはできたため、様々な遺伝子の完全長配列を取得することを目的としてライブラリーを調整し、次世代シーケンサーを用いて共生微生物のゲノム DNA を解析することに成功した。

次に平成 26 年度は、再度中部沖縄トラフに位置する深海底熱水活動域において、国立研究開発法人海洋研究開発機構の有する船舶「なつしま」および遠隔操作型無人探査機「ハイパードルフィン」を用いた調査航海を実施した。水深約 1000m の海底から複数の細胞外共生生物および細胞内共生生物を新規に採取することに成功した。船上にて直ちにインキュベートし、解析試料を調整した。これらの試料から発現遺伝子の網羅解析(トランスクリプトーム解析)すなわち宿主生物および共生微生物からのトータル RNA の抽出、生物毎の RNA の分画および rRNA の除去)および代謝物質解析(各種溶媒を組み合わせた代謝物質の抽出)用の試料を調整した。細胞外共生系では共生微生物と宿主生物の細胞のそれぞれを分取することは、細胞内共生系と比べ容易であると想定していたが、本試料調整においては、特に共生微生物と宿主生物の両者を完全に分離(特に共生微生物細胞のみを調整)することが想定より大変困難であった。そこで、以前の研究において深海底熱水活動域にみられる細胞内共生系で確立していた手法をベースとし、様々な物理化学的手法の組み合わせにより、外部共生微生物と宿主生物を分取する手法を最適化した。

さらに平成 27 年度は、中部沖縄トラフに位置する深海底熱水活動域において、国立研究開発法人海洋研究開発機構の有する上記船舶および遠隔操作型無人探査機を用いた調査航海に再び参加した。水深約 1000m を超える海底から複数の細胞外共生生物(主にゴエモンコシオリエビと呼ばれる甲殻類[主に硫黄酸化能を持つイプシロプロテオバクテリアおよびガンマプロテオバクテリアに属する外部共生微生物を腹部剛毛に有する])を新規に採取し、船上および下船後の飼育環境下(上記とは異なる条件。さらに本年度は、長期飼育環境下での外部共生微生物および宿主生物の相互作用・長期飼育が及ぼす外部共生系への影響ならびに飼育条件の改善を目的とし、水族館において長期飼育している個体を用いた飼育実験も行った)においてインキュベートし、解析試料を調整することに成功した。本インキュベート実験においては、前年度に最適化した外部共生微生物と宿主生物の分画法を用いて、外部共生微生物を宿主生物から分離した条件下においてもインキュベートを行い、その活動を経時的に分子レベルで解析することに成功した。当該試料および前年度の航海時に調整した試料を用いて、様々な環境条件下における代謝活性を遺伝子・代謝物質レベルおよび細胞レベルでも解析し、内部共生および病原性近縁種-宿主生物間の相互作用と比較検証して

いる。

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](計 4 件)

1. Mino S, Makita H, Toki T, Miyazaki J, Kato S, Watanabe H, Imachi, H., Watsuji, TO., Nunoura, T., Kojima, S., Sawabe, T., Takai, K., and Nakagawa, S. (2013). Biogeography of *Persephonella* in deep-sea hydrothermal vents of the Western Pacific. *Front Microbiol* 4, 107.
2. Konishi, M., Nishi, S., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Watsuji, TO., Nagano, Y., Yabuki, A., Nakagawa, S., Hatada, Y., and Horiuchi, J. (2014). Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, lacking the phytopathogenic fas genes, produces a novel glucotriose lipid biosurfactant. *Mar Biotechnol* (NY) 16, 484-93.
3. 中川 聡, (2014). *Epsilonproteobacteria*: 特殊環境のスペシャリスト. 極限環境生物学会誌 12, 63-70,
4. Fujiyoshi, S., Tateno, H., Watsuji, TO., Yamaguchi, H., Fukushima, D., Mino, S., Sugimura, M., Sawabe, T., Takai, K., Sawayama, S., and Nakagawa, S. (2015). Effects of hemagglutination activity in the serum of a deep-sea vent endemic crab, *Shinkaia crosnieri*, on non-symbiotic and symbiotic bacteria. *Microbes Environ* 30, 228-34.

[学会発表](計 9 件)

1. 中川 聡, 深海底熱水活動域に見られる化学合成共生系を理解する: 全ゲノム解析と群集遺伝学からのアプローチ、日本進化学会第 15 回つくば大会(招待講演)、2013 年 8 月 28 日~2013 年 8 月 30 日、筑波大学(茨城県つくば市)
2. 美野 さやか、深海底熱水活動域に優占する化学合成細菌の集団遺伝構造の解明、極限環境生物学会 2013 年度(第 14 回)年会、2013 年 10 月 26 日~2013 年 10 月 27 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)
3. 美野 さやか、深海底熱水活動域に生息する化学合成微生物の分布様式と集団構造の解明、ブルーアース 2014、2014 年 2 月 19 日~2014 年 2 月 20 日、東京海洋大学(東京都港区)
4. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に生息する甲殻類の血リンパ中異物認識因子の探索—ゴエモンコシオリエビの胸毛ファーム—、第 8 回細菌学若手コロッセウム、2014 年 8 月 6 日、ホテルニセコいこいの村(北海道虻田郡)
5. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に生息する

- 無脊椎動物の血リンパ中レクチンの探索と性状解析、環境微生物系学会合同大会 2014、2014年10月24日、浜松アクティビティコンgresセンター(静岡県浜松市)
6. 藤吉 奏、深海底熱水活動域に生息する甲殻類の血清中血球凝集タンパク質因子の探索と性状解析、極限環境生物学会 2014年度(第15回)年会、2014年11月2日、今帰仁村コミュニティーセンター(沖縄県今帰仁村)
 7. 藤吉 奏、Hemagglutination activity in the serum of deep-sea vent endemic crab、第88回日本細菌学会総会、2015年3月26日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
 8. Nakagawa, S.、Genomic and population genetic analysis of gastropod symbionts in deep-sea hydrothermal fields、8th International Symbiosis Society conference、2015年7月13日、リスボン(ポルトガル)
 9. 中川 聡、深海底熱水活動域に棲息する化学合成独立栄養微生物の多様性とその進化、第89回日本細菌学会総会、2016年3月23日、大阪国際交流センター(大阪府)

(2)研究分担者

(3)連携研究者

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanbi.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/Site/Scaly-Foot.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 聡 (NAKAGAWA SATOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70435832