

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870295

研究課題名(和文) 貧栄養環境に生息する細菌群集の生存代謝メカニズムの解明と応用展開

研究課題名(英文) Physiological survival mechanism of bacterial community inhabiting in oligotrophic environments

研究代表者

木村 浩之(Kimura, Hiroyuki)

静岡大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30377717

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)：貧栄養から富栄養まで様々な栄養条件下に生息するバクテリアのtransfer-messenger RNA (tmRNA)の発現パターンを解析し、貧栄養環境下におけるバクテリアの生存戦略メカニズムについて明らかにした。

ゲノム情報を入手できるバクテリア菌株を様々な栄養条件下で培養し、tmRNAの発現量を測定した。その結果、貧栄養培地において有意に高いtmRNAの発現が見られた。次に、富栄養海域である清水港および駿河湾と、貧栄養海域である西太平洋の外洋域において表面海水を採取し、海洋バクテリアの全RNAを網羅的に解析した。その結果、貧栄養海域において優位に高いtmRNAの発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：Transfer-messenger RNA is small RNA that employs both tRNA and mRNA-like properties as it rescues stalled ribosomes during nutrient shortage. Here, we surveyed transcriptional responses of transfer-messenger RNA-containing bacterial strains in the medium of various nutrient conditions. Consequently, transfer-messenger RNA showed significant up-regulation in the nutrient-limiting growth conditions.

We collected seawater samples from open ocean (oligotrophic environment) and coastal area (eutrophic environment). We then performed transcriptomic analyses targeting total RNA extracted from the bacterial communities in the seawater samples. Transfer-messenger RNA was expressed at significantly higher levels in the seawater sample derived from the open ocean. In total, our results suggest the importance of transfer-messenger RNA as essential components for nutrient-limiting growth conditions in these bacteria.

研究分野：微生物生態学

キーワード：バクテリア 海洋細菌 極限環境 貧栄養環境 トランスクリプトーム RNA

1. 研究開始当初の背景

外洋域、サンゴ礁、南極湖沼、高地の湖に代表される貧栄養の水圏環境では、アミノ酸や糖、ミネラルといった栄養塩の不足が原因となり、生物の基本代謝である転写や翻訳が停滞するケースがあることが報告されている。これまでの研究において、貧栄養培地にて海洋細菌フラボバクテリア菌株を培養し、次世代シーケンサーを用いて全 RNA を網羅的に解析した研究により、貧栄養環境下において海洋細菌が small RNA を大量に発現することが報告された。中でも、small RNA の一種であり、transfer RNA と messenger RNA の両方の機能を有するキメラ状の RNA として知られている transfer-messenger RNA が大量に発現することが見出された。

transfer-messenger RNA は、アミノ酸の不足により翻訳が停滞した際に、独自の終止コドンを用いて翻訳を強制終了させる機能を有する。そして、messenger RNA 上で“スタック”したりボソームを解放し、翻訳の効率を上げる役割を担うことが知られている。しかしながら、天然水圏環境の栄養状態と transfer-messenger RNA の発現量の関係は、国内外の研究においてほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、全ゲノムが解読されているバクテリア菌株を購入する。そして、貧栄養から富栄養まで多様な栄養条件下にてこれらのバクテリア菌株を培養する。そして、各栄養系におけるバクテリアの transfer-messenger RNA の発現量を詳細に分析するとともに、貧栄養条件下における transfer-messenger RNA の重要性を明らかにする。

(2) 研究調査航海に参加し、外洋の貧栄養海域および沿岸域の富栄養海域にて海水試

料を採取する。そして、次世代シーケンサーを用いて、各海域に生息するバクテリア群集の transfer-messenger RNA の発現パターンを明らかにするとともに、貧栄養環境下におけるバクテリアの生存戦略メカニズムについての新たな知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 全ゲノムが解析され、すでにゲノム情報が公開されている 6 種類のバクテリア菌株を American Type of Culture Collection (ATCC) より購入した。small RNA 解析ソフトウェア Rfam 11.0 を用いて、各菌株の transfer-messenger RNA の塩基配列を同定した。さらに、遺伝子解析ソフトにて、それぞれの菌株の transfer-messenger RNA を特異的に増幅するための PCR プライマーをデザインした。次に、貧栄養から富栄養まで栄養状態の異なる多様な培地を用いて、6 種類のバクテリア菌株をそれぞれ培養した。増殖したバクテリア菌株から RNA を抽出した。そして、市販の DNA 合成キットを用いて逆転写反応により cDNA を合成した。定量 PCR 法により cDNA を鋳型とした PCR を行い、各栄養条件下における transfer-messenger RNA の発現量を測定した。

(2) 貧栄養海域である西太平洋の外洋域と富栄養海域である清水港および駿河湾において表面海水を採取し、海水試料をろ過することにより微生物群集を集積した。次に、微生物群集から全 RNA を抽出した。そして、全 RNA を鋳型とした cDNA を合成し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に cDNA の塩基配列を決定した。さらに、相同性検索により transfer-messenger RNA を同定し、各海域における transfer-messenger RNA のリード数から発現量を算出した。さらに、貧栄養環境にて有意に多く発現した遺伝子を特定するとともに、貧栄養環境でのバクテリアの生存

機構に関する生理特性について考察した。

4. 研究成果

(1) 購入した6種類のバクテリア菌株の tmRNA は、360~400 bp の塩基配列からなり、ゲノム上に1コピーのみ遺伝子を有することが明らかとなった。6種類のバクテリア菌株を富栄養から貧栄養まで異なる6段階の栄養条件下にて培養した結果、富栄養培地では transfer-messenger RNA の発現はほとんど見られなかった。一方、貧栄養培地にて培養した微生物菌株から transfer-messenger RNA の発現が見られ、富栄養培地にて培養したバクテリア菌株の transfer-messenger RNA の発現量より有意に高い発現であることが明らかとなった。一連の研究結果により、貧栄養環境における transfer-messenger RNA の重要性が示唆された。

(2) 外洋の貧栄養海域および湾内の富栄養海域のバクテリア群集の RNA 解析においては、貧栄養海域において優位に高い transfer-messenger RNA の発現が示された。その発現量は、富栄養海域(清水港)の4.7倍を示した。さらに、栄養塩濃度を感知・伝達する機能を有するタンパクをコードした mRNA の発現量を比較した結果、貧栄養海域において二次伝達タンパクとして知られる His kinase が優位に高く発現していることが明らかとなった。さらなる RNA データの解析により、貧栄養海域におけるバクテリアの生存戦略とも言える生理機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Kyohei Baito, Satomi Imai, Makoto Matsushita, Miku Otani, Yu Sato, Hiroyuki Kimura, Biogas production using anaerobic groundwater containing a subterranean microbial community

associated with the accretionary prism. *Microbial Biotechnology*, 査読有、In press、2015、

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12179/full>

Koji Mori, Atsushi Yamazoe, Akira Hosoyama, Shoko Ohji, Nobuyuki Fujita, Jun-ichiro Ishibashi, Hiroyuki Kimura, Ken-ichiro Suzuki, *Thermotoga profunda* sp. nov., and *Thermotoga caldifontis* sp. nov., anaerobic thermophilic bacteria isolated from terrestrial hot springs, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 査読有、Vol. 64, 2014, p.p. 2128-2136.

http://ijs.sgmjournals.org/content/64/Pt_6/2128.abstract

Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Susumu Asakawa, Takeshi Watanabe, Seigo Shima, Nanako O. Ogawa, Martin Krüger, Makoto Matsushita, Hiroyuki Kimura, Naohiko Ohkouchi, Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation, *Analytical Chemistry*, 査読有、Vol. 86, 2014, p.p. 3633-3638.

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac500305j>

木村浩之、松下 慎、梅藤恭平、今井里弥、津島一平、大谷実来、佐藤 悠、海洋出版、陸上掘削による地域資源革命 ~ 付加体の地下圏微生物を利用したメタン・水素ガス生産 ~ . 月刊地球、査読無、Vol. 36, No. 2, 2014, p.p. 101-108.

Hiroyuki Kimura, Kousuke Mori, Toshiro Yamanaka, Jun-Ichiro Ishibashi, Growth temperatures of archaeal communities can be estimated from the

guanine-plus-cytosine contents of 16S rRNA gene fragments. Environmental Microbiology Reports, 査読有, Vol. 5, 2013, p.p. 468-474.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12035/abstract>

Yoshihiro Fujiwara, Takashi Okutani, Hiroyuki Kimura, First occurrence of *Alviniconcha* from Japanese waters (Gastropoda: Provannidae), Venus, 査読有, Vol. 71, 2013, p.p. 217-219.

木村浩之, 日本工業出版, 南西日本の地下圏微生物を利用した付加体エネルギー生産システム. クリーンエネルギー, 査読無, Vol. 22, No. 5, 2013, p.p. 27-32.

[学会発表](計 6 件)

佐藤 悠、藤原健智、木村浩之. ゲノム上に G+C 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性古細菌の生理生態. 第 16 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 静岡, 2015 年 3 月 7 日.

佐藤 悠、木村浩之. G+C 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を使い分ける好塩性古細菌 *Haloarcula* の生態.

環境微生物系学会合同大会 2014, 浜松, 2014 年 10 月 23 日.

Hiroyuki Kimura, Makoto Matsushita, Shugo Ishikawa. Microbial methane production and carbon-nitrogen cycles in subterranean environments associated with the accretionary prism in Southwest Japan.

13th Japan-Taiwan International Workshop on Hydrological and Geochemical Research for Earthquake Prediction. Tsukuba, 2014 年 9 月 2 日.
Yu Sato, Hiroyuki Kimura. *Haloarcula* strains regulate transcription of multiple 16S rRNA genes in response to

environmental temperatures.

15th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-15), Seoul, South-Korea. 2014 年 8 月 25 日.

佐藤 悠、木村浩之. 好塩性古細菌は環境温度により G+C 含量の異なる 16S rRNA 遺伝子を選択的に転写する.

第 29 回日本微生物生態学会大会, 鹿児島, 2013 年 11 月 23 日.

森浩二、細山 啓、山副敦司、黄地祥子、木村浩之、石橋純一郎、鈴木健一郎. 全ゲノム解析を用いた新種提案 - 温泉環境から分離した新規 *Thermotoga*-

第 29 回日本微生物生態学会大会, 鹿児島, 2013 年 11 月 23 日.

[図書](計 1 件)

木村 浩之 他, 朝倉書店, 環境と微生物の事典, 2014, p.p. 221-223.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~shkimur/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 浩之 (KIMURA, Hiroyuki)
静岡大学大学院理学領域・准教授
研究者番号: 30377717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし