

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650140

研究課題名(和文)細胞外DNAを取り込む極限環境微生物から探る遺伝子伝播

研究課題名(英文)DNA-incorporating microbial cells as agents of lateral gene transfer in extreme environments

研究代表者

柳川 勝紀(Yanagawa, Katsunori)

九州大学・比較社会文化研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50599678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：外来DNAの微生物細胞内への獲得頻度を評価する方法として、フローサイトメーターを用いた実験系の有効性を確認した。この手法を、様々な物理化学環境を示す地熱水試料に適用したところ、一部の試料においてのみ外来DNAの微生物細胞内への取り込みが確認された。しかし、長時間の培養後はそれが観察されなかった。これらの結果は、自然環境中の微生物群集の中に、外来DNAを細胞内に短時間で取り込む、いわゆるコンピテント状態にある微生物が存在することを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：An easy and rapid protocol to detect DNA-incorporating microbial cells by using flowcytometer was developed. This methodology was applied to microbial communities in several geothermal sites. Only one site showed the existence of naturally competent microbial cells, which uptake DNA molecules directly from extracellular environments into the cell bodies. In contrast, no uptake was observed after the long-term incubation of the samples. This study suggests that naturally competent cells are present in hot spring water and play an important role in horizontal gene transfer.

研究分野：地球微生物学

キーワード：遺伝子水平伝播 コンピテントセル 熱水

1. 研究開始当初の背景

生命の進化・多様性を支える要因として、遺伝子レベルでの積極的な交流の影響は計り知れない。この遺伝子水平伝播は生命が新たな環境へ適応する上で大きな利点を与えると期待されている。近年の環境ゲノミクス解析から自然界の驚くべき多様性が明らかにされ始めている。例えば、原核生物ゲノムの中には外来遺伝子が無視できない割合で存在しており、しかもその水平伝播は近縁系統間に限らず、アーキア-バクテリアというドメインレベルでも知られている。

遺伝子伝播の様式として、細胞同士の接着による接合、ウイルスに仲介される形質導入、そして細胞外 DNA を取り込むことで起こる形質転換が考えられている。この中で、外来 DNA の取り込みは、受容菌の状態に強く依存することが指摘されている。しかし、環境中の受容菌が外来 DNA に対して寛容になる条件、メカニズムについての研究は進んでいない。一方、分子生物学実験では大腸菌の形質転換を利用したクローニングが広く用いられているが、そこで使用するコンピテントセルから示唆的な情報がある。例えば、コンピテントセルの作成には、Ca, Mg, Mn, Rb などの二価陽イオンの存在と低温処理が重要であることが経験的に知られている。また、コンピテントセルにベクターを取り込ませるには熱処理または電気穿孔法が有効である。陸上温泉や深海熱水噴出域では、広い温度勾配と重金属イオンが報告されており、さらに起電力が生じていることが期待される。これらのことから、地熱地帯や深海熱水域は形質転換に好ましい条件が形成されていると仮説立てた。

2. 研究の目的

自然環境中で潜在的に起こる形質転換の前段階としての外来遺伝子を取り込むプロセスに着目し、微生物による細胞外 DNA の取り込み能力を測定する手法開発を試みた。そして、地熱水試料を対象に環境微生物が外来遺伝子を細胞内に取り込む頻度と環境条件を検証すべく、(1) 生息環境の物理化学的条件、(2) 優占する微生物群集を明らかにした上で、開発した手法を適用し、微生物による外来 DNA 取り込みとそれに影響を与える環境因子の関係性、微生物がコンピテント状態になる要因の特定、極限環境における遺伝子水平伝播の本質的メカニズムの理解を目的に研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) 手法開発 1: 放射性同位体ラジオトレーサーを用いた細胞外 DNA の取り込み

放射性同位体標識オリゴヌクレオチド、プラスミドをそれぞれ準備し、市販されているコンピテントセル(外来 DNA を細胞内に取り込みやすい状態にある大腸菌)にプロトコールに従って熱処理法で形質転換をおこな

った。その後、微生物細胞は 0.2 μ m ニトロセルロースフィルターに捕集した。その後、液体シンチレーションカクテルを添加、液体シンチレーション法で、試料中のトレーサーの放射能を測定した。得られた値から微生物画分に取り込まれた外来 DNA の相対量を算出した。また、細胞外 DNA の塩基数の変化として、ロングオリゴヌクレオチドやプラスミドの取り込みの場合に取り込み速度にどのような変化が生まれるか確かめた。また、熱処理の有無が与える影響についても検討した。

(2) 手法開発 2: フローサイトメーターを用いた外来 DNA を取り込んだ細胞の検出

蛍光分子ラベル(FITC または Cy3)もしくは核酸染色試薬(SYBR Green I, アクリジンオレンジ, または Propidium Iodide)で染色した DNA を、シリカメンブレンフィルターを使って精製、濃縮した。その後、(1)と同様にコンピテントセルへ形質転換で導入し、それを取り込んだ微生物細胞をフローサイトメーターで光学的に検出することを試みた。またその他の検討内容は(1)と同様の内容を実施した。

(3) 試料採取と地球化学分析

実験試料の採取は様々な泉質(化学的特徴)と温度を示す陸上温泉で実施した。国内では鹿児島(安楽温泉, 霧島温泉, 塩浸温泉, TM 温泉), 大分(岳の湯, 赤川温泉, ガニ湯, 郷の湯)で、国外ではインドネシアのスマトラ島(Sipoholon, Dolok Tinggi Raja)で実施し、炭酸泉, 硫黄泉, 高濃度の鉄分を含む温泉, 冷泉から実験試料を得た。いずれの調査地では、温度, 酸化還元電位, 硫化水素, メタンなどの物理化学成分の測定を行った。

(4) 微生物群集組成

16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析用として、研究調査地では孔径 0.2 μ m のフィルターに微生物を捕集し、冷凍保存した。持ち帰った試料は、PowerSoil DNA Isolation Kit(MO Bio)を用いて DNA を抽出した。その後、Uni530F-Uni907R mix プライマーセットを用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅、クローンライブラリーを作成し、各試料における微生物群集構造を決定した。

(5) DNA 取り込み能の測定

(1)と(2)の実験では、後述するように、(2)の方が本研究には適していると判断されたため、(2)の条件検討の結果を踏まえて、環境試料を対象とした実験を行った。核酸染色試薬で染色した DNA を試料に添加し、短時間のインキュベーションを行い、外来 DNA を取り込んでいると考えられる微生物ポピュレーションの検出を試みた。この際、温度や重金属濃度などの物理化学因子が与える影響についても検討した。

4. 研究成果

(1) 手法開発 1:放射性同位体ラジオトレーサーを用いた細胞外 DNA の取り込み

20bp 程度のオリゴヌクレオチドではオートクレープ処理したコントロール試料に比べ有意な放射能が検出されなかった。一方、ロングオリゴヌクレオチドとプラスミドの場合は、添加トレーサー量の1万分の1から10 万分の1 程度の極めて微弱なシグナルが検出することができた。また、熱処理の有無が与える影響については、有意な変化は見られなかった。この手法では、バックグラウンドシグナルも条件や処理時間に応じて不安定に変動する傾向があり、定量的な考察においては実験回数を多くして統計的に処理することが望ましく、結果の解釈には注意が必要であることが分かった。

(2) 手法開発 2:フローサイトメーターを用いた外来 DNA を取り込んだ細胞の検出

蛍光分子として FITC や Cy3 ラベルした場合と、核酸染色試薬として SYBR Green I を用いた実験を比較した場合、後者の方が顕著なシグナルを検出することができた(図1)。FITC ラベルプローブは分子量や構造そのものにわずかながら影響を与えるためであると考えられる。また、(1)と同様、ロングオリゴヌクレオチドとプラスミドのみ、いずれのシグナルも検出することができた。この結果については、1 分子あたりシグナル強度が関係しているのかもしれないので、今後の検証が必要である。なお、ロングヌクレオチドよりプラスミドを用いた方が検出できる割合が高く、全コンピテントセルの数%に相当した。また、熱処理の有無はこの割合に大きな影響を与えないことも(1)の結果と一致していた。この手法の方が、迅速であり、同じ手法で全微生物細胞数も検出できるため、環境試料を用いた実験にはこちらの手法を用いることとした。

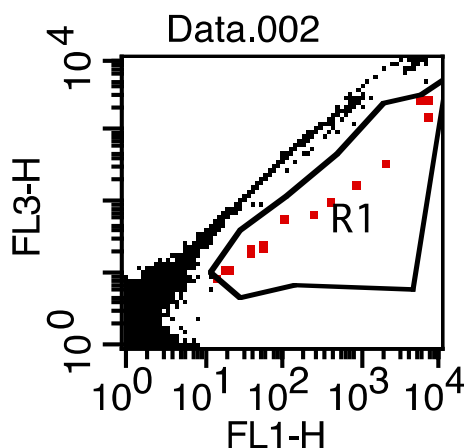


図1. SYBR Green I 染色したプラスミドを取り込んだコンピテントセルをフローサイトメーターで検出(赤色)。黒丸はバックグラウンドシグナルであり、両者を識別するためにはFL1(530/30)とFL3(670LP)の双方を使っ

た解析が有効であった。

(3)地球化学分析

化学分析の結果、今回取得した炭酸泉の中では、Dolok Tinggi Raja からの試料が、物理化学条件として全ての試料の条件を網羅していることが判明した。その試料では源泉上流から下流にかけて、温度が63 度から50 度まで低下しており、温度帯ごとに特徴的な微生物マットが発達し、その色は黄色、紅、黄緑、深緑、茶と変化していた(図2)。

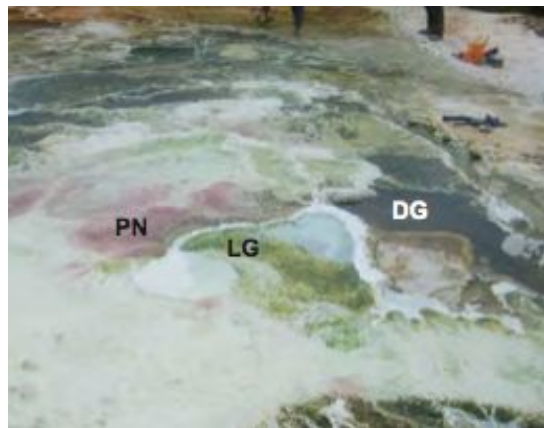


図2. 地熱水が下流に向かうに連れ、異なる色の微生物マットが発達していた(PN: ピンク, LG: 黄緑, DG: 深緑)。温泉の流れの向きは左下から右上。

この試料では、上流から下流にかけて、温度は63 度から50 度まで減少、酸化還元電位と溶存酸素は増加、カルシウム濃度も7mM から3mM まで減少するというような系統的な変化が確認された。また、源泉では硫化水素も200 μ M 程度含まれていた。

表1. 地熱水の化学分析結果

| Site | T (°C) | Eh (mV) | DO (mg/L) | Alk (mM) | H ₂ S (μ M) | Ca ²⁺ (mg/L) | Mg ²⁺ (mg/L) | Na ⁺ (mg/L) |
|-------------|--------|---------|-----------|----------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Sample 1-1 | 62.6 | -137 | 0.69 | 18.45 | 202.8 | 284.3 | 75.8 | 98.9 |
| Sample 1-2 | 61.2 | -114 | 1.75 | 17.60 | 113.5 | 274.3 | 79.2 | 95.68 |
| Sample 1-3 | 58.0 | -58 | 1.78 | 14.20 | 13.1 | 175.9 | 72.4 | 100.1 |
| Sample 1-4 | 49.6 | 138 | 3.79 | 12.80 | 0.2 | 145.2 | 81.4 | 100.3 |
| Sample 2V | 62.8 | -130 | 0.00 | 17.85 | 165.7 | 268.0 | 109.2 | 262.2 |
| Sample 2N-1 | 60.7 | -89 | 0.53 | 17.35 | 32.7 | 209.5 | 108.7 | 255.4 |
| Sample 2N-2 | 55.2 | -5 | 2.44 | 13.35 | 5.3 | 168.7 | 112.6 | 264.5 |
| Sample 2N-3 | 53.5 | 127 | 3.94 | 12.00 | 0.5 | 151.6 | 110.6 | 245.9 |
| Sample 2E-1 | 60.4 | -91 | 0.35 | 17.40 | 35.5 | 229.8 | 96.3 | 239.2 |
| Sample 2E-2 | 58.4 | -56 | 1.35 | 16.50 | 15.2 | 162.1 | 92.6 | 220.5 |
| Sample 2E-3 | 58.1 | -43 | 1.76 | 15.55 | 8.6 | 159.0 | 103.5 | 223.9 |
| Sample 2E-4 | 57.1 | -35 | 2.34 | 15.10 | 5.6 | 155.0 | 103.1 | 295.9 |
| Sample 2E-5 | 50.5 | 105 | 4.15 | 12.10 | 0.7 | 131.1 | 102.8 | 242.6 |
| Sample 2S-1 | 59.7 | -81 | 0.32 | 16.95 | 30.3 | 205.3 | 104.1 | 233.9 |
| Sample 2S-2 | 57.0 | -29 | 1.60 | 15.75 | 14.5 | 154.3 | 95.5 | 217.8 |
| Sample 2S-3 | 55.2 | 16 | 2.73 | 15.10 | 3.5 | 143.0 | 94.7 | 218.3 |

この試料を使って得られた解釈が、その他の試料で得られた結果も良く説明していたため、本報告書ではDolok Tinggi Raja からの結果のみ報告する。

(4) 微生物群集組成

16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析の結果、Dolok Tinggi Raja では、源泉

から流出後、下流に向かうにつれ、優占する微生物が異なっていた。これは、トラバーチン表面で発達する微生物マットの色の違いも反映していると考えられる。源泉中から検出された微生物は Hydrogenothermaceae に近縁な硫黄酸化細菌であったが、それを除く試料では Halothiobacillaceae が硫黄酸化細菌の優占種であった。中流の赤色のマットが発達するところでは紅色硫黄細菌である Chromatiaceae が、黄緑色のマットでは、緑色非硫黄細菌の Chloroflexi が見られた。下流になるとシアノバクテリアや緑色硫黄細菌 Chlorobi が見られるようになった(図3)。こうした一連の微生物群集の変化は、このサイト近傍の複数の試料からの解析結果も大まかに支持された(図4)。

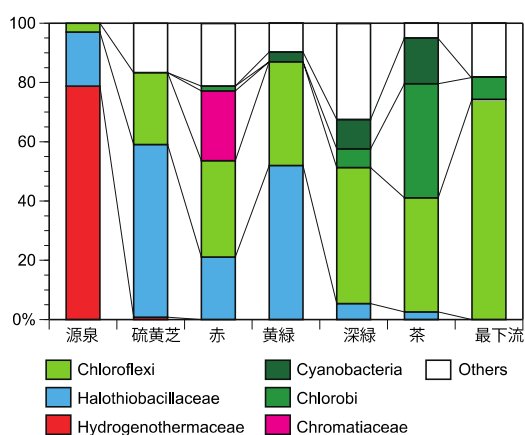


図3. 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造。

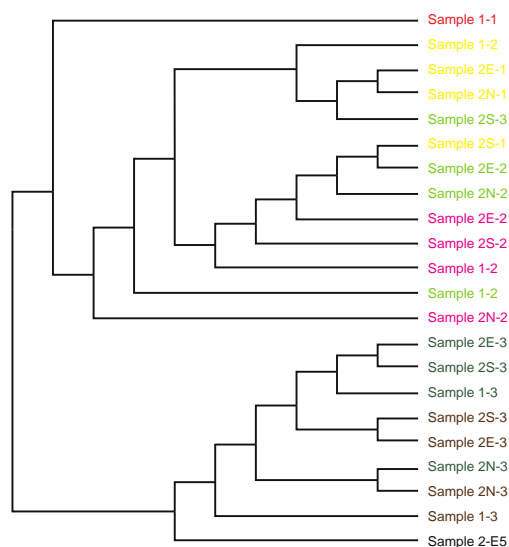


図4. Dolok Tinggi Raja における複数試料における微生物群集構造を対象に、クラスター解析による類似度評価。サンプル名の色については、赤は源泉、黄色は硫黄芝サイト、ピンク、黄緑、深緑、茶はそれぞれの微生物マットの色を反映した。

(5) DNA 取り込み能の測定

核酸染色を施した DNA と環境試料を一定時間培養したところ、環境の違いを問わず、

ほとんどの試料でラベル DNA の取り込みが見られなかった。このことは、環境中では多くの場合外来 DNA の取り込みは起こっていないことを示唆していた。しかし、温泉水最下流の試料では、ラベル DNA の取り込みの影響とみられるシグナルがわずかに検出された(図5)。その割合は全微生物細胞の 10^{-5} 程度と極めて少なかった。しかし、このシグナルは極めて微弱あることに加え、この試料における全微生物細胞数が 5×10^4 cells/ml であることから、シグナルが外来 DNA を取り込んだ細胞に由来することの証明は困難であった。

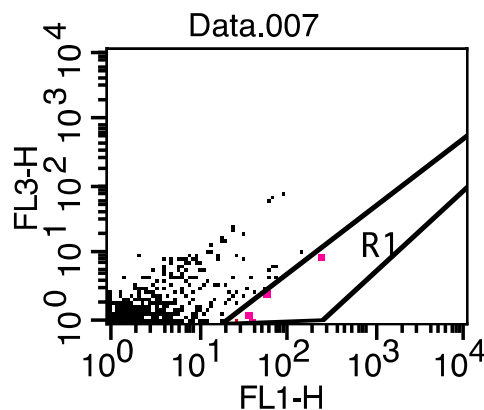


図5. 地熱水最下流からの試料には、細胞外 DNA を取り込んだ微弱な蛍光が得られた(赤色)。

この試料については、温度や重金属濃度などの物理化学因子が与える影響についても検討したが、DNA 取り込み実験の結果、取り込みが期待される集団の割合は極めて低く(時に検出限界以下)、系統的な変化を見出すことは困難であった。なお、取り込みが確認される細胞は、数時間以上の培養を経ると全く確認されなくなることから、この取り込みは一時的なものであり、長時間保持・定着するものではないことが示唆された。さらなる検証実験でこれらの結果を再確認し、外来 DNA の獲得における環境因子の影響を解明していくことは、今後の課題であると考えている。

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 1 件)

杉原千耶, 高島千鶴, 柳川勝紀, 森大器, 奥村知世, Agung Harijoko. 2015 スマトラ島北部の温泉に発達する多様な微生物マット. 地球科学. 69 巻, 141-142. (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

柳川勝紀. 深海熱水噴出孔で生命の起源を探る. 第 68 回地団研九州総会. 2014 年 8 月 22 日. 佐賀大学.(招待講演)

杉原千耶, 狩野彰宏, 柳川勝紀, 高島千鶴, 奥村知世. スマトラ島北部のトラバーチンに見られる微生物群集遷移. 日本古生物学会. 2015年1月30日-2月1日. 豊橋市自然史博物館.

杉原千耶, 柳川勝紀, 狩野彰宏, 高島千鶴, 奥村知世, Agung Harijoko. トラバーチンみられる微生物分帯: スマトラ島北部の例. 地球惑星科学関連合同学会. 2015年5月20日. 幕張メッセ.

柳川勝紀, 井尻暁, Anja Breuker, 酒井早苗, 三好陽子, 川口慎介, 野口拓郎, 平井美穂, Axel Schippers, 石橋純一郎, 高木善弘, 布浦拓郎, 高井研. 熱水噴出孔下に存在する生命圏の限界. 日本地球化学会第62回年会. 2A01. 2015年9月17日. 横浜国立大学.(招待講演)

杉原千耶, 柳川勝紀, 狩野彰宏, 奥村知世, 高島千鶴. 北部スマトラ島の縞状トラバーチンと硫黄細菌. 地質学会西日本支部. 2016年2月20日. 熊本大学.

Sugihara, C., Kano, A., Yanagawa, K., Okumura, T., Takashima, C., Transition of microbial communities and laminated structures in travertines: a case study in northern Sumatra, Indonesia. 日本地球惑星科学連合2016年大会. 2016年5月22日. 幕張メッセ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 勝紀 (Katsunori YANAGAWA)

九州大学大学院比較社会文化研究院・学術研究員

研究者番号: 50599678