

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650169

研究課題名（和文）海底下に存在する未知生命が有する機能と物質循環：基質誘導を鍵とした遺伝子機能探索

研究課題名（英文）Exploration of unknown genetic function in subseafloor biosphere by
Substrate-Induced Gene Expression approach

研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理

研究者番号：30421845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、地球表面積の7割を占める海洋の底のさらに下に広がる海底下地層に潜む微生物の未知遺伝子機能を探索することを目的とした。具体的には微生物の代謝基質となりうる物質を用いて遺伝子のスイッチがONとなるような遺伝子発現誘導を行い、膨大な環境中の遺伝子断片から発現が起こった遺伝子断片を効率的に取り出すことの出来る機能遺伝子発現解析（SIGEX：Substrate Induced Gene Expression）を応用した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to explore genetic function of microbial life inhabited in subseafloor biosphere. For searching unknown microbial genetic function, we employed substrate-induced gene expression (SIGEX) approach that relies gene expression induced by exposure of substrate.

研究分野：Microbial ecology

キーワード：Subseafloor biosphere Gene function

1. 研究開始当初の背景

培養技術の進展により、様々な「培養できない微生物たち」の培養例が報告・蓄積されているが、依然として環境中微生物の大半は培養できない微生物によって占められており、そ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没しているとも考えられている^(1, 2)が、リボソームRNA遺伝子配列による分子系統解析によると、海底下には未だ分離・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おり⁽³⁾、現代に未だ残る自然界の最後の秘境ともいえる環境である。

このような未培養系統微生物の生態を解明するために行われたメタゲノム解析では、通常実施される相同性検索による機能推定が適用されたが、海底下試料から得られた配列のうち8割程度が機能未知という結果に終わっている⁽⁴⁾。その後、未知アーキア細胞由来のシングルセル増幅ゲノム配列の解読結果から、海底下の生命が死細胞由来のタンパク質を分解する機能を有し、乏しい栄養を補給する手段としていることも提案された⁽⁵⁾。しかし細胞ごとの解析では膨大な微生物群集の一部が見えるに過ぎず、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。一方で、この結果は裏返すと海底下が地球最大の未知遺伝機能の宝庫であることを示しているとも言え、手段さえ整えば地球規模での物質循環プロセスに果たす役割についてだけでなく、遺伝子資源としても有用な知見が得られる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では未知微生物の生態解明と未知遺伝資源の開拓のため、海底下試料から採取した遺伝子断片中に存在する未知機能遺伝子の機能推定に有用な知見を得ることを目的とした。

環境試料からDNAを抽出しランダムに塩基配列を決定して、存在する微生物の16S rRNA遺伝子や機能遺伝子を同定して微生物の機能推定を行うメタゲノムなど、培養によらない分子生物学的手法は純粋分離の死角を補い飛躍的に発展を遂げた。一方で、これまで同定された遺伝子配列データベースとの類似性で機能を推測する上記手法は、前述のように未知微生物(群)が多く含まれる環境の場合同定不可遺伝子の割合が8割を超える場合がある⁽⁴⁾など、違った角度からのアプローチが必要とされている。

本研究では、機能推定的手段としてSIGEX (Substrate Induced Gene Expression) 法を応用した⁽⁶⁾。この方法は、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し、これをFACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)によって高速選別、調節領域下

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。本法はその遺伝子選別において配列、機能のデータベースに依存しない。従って未知遺伝子が8割を占める海底下微生物ゲノムの機能特定の新アプローチにもなり得るもので、海底下環境で繰り広げられる生物の代謝活動、海底資源のライフサイクルに関与する微生物機能の特定のほか、空間的広がりでは好気的環境を凌駕する他の嫌気的環境に生息する微生物の生態解明にもつながる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究は、当初平成26年度と平成27年度の2カ年度で実施を計画したが、研究計画の根幹をなすクローニング用ベクターの構築において、受託企業の生産終了により研究期間の途中で実施できなくなった。その為、延長申請を行い平成28年度まで研究期間を延長して実施した。

SIGEX法の概要を下記の図1で示す。研究期間の冒頭では、ゲノムライブラリーの構築法を含めた基礎的な技術の検討を行った。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注意を払いながら実施した。

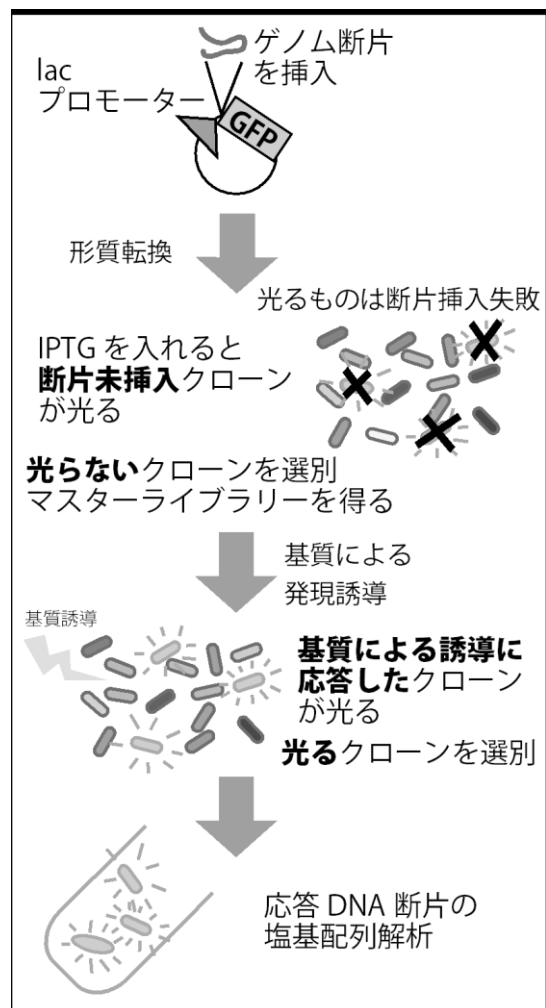


図1 : SIGEX 法のフロー

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、を実施したうえで(2)好気用ゲノムライブラリーの作成を行い、並行してベクターへの新規遺伝子導入による嫌気仕様へのアップグレード手法の開発を実施した。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

既報論文のやり方を踏襲し試験的に実施したSIGEX用ゲノムライブラリーの構築では、ベクターへの遺伝子断片挿入効率が低く、クローンのバリエーションが100-1000種類程度に留まり、得られたライブラリーへの総挿入断片長が1-10Mbpを下回ってしまう結果が頻発した。これは大腸菌程度のゲノムを持つ微生物で多くても数細胞分程度であり、数種の微生物ゲノム分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現実的ではない。この問題を解決する方法として本研究ではベクター中にDNA異性化酵素であるトポイソメラーゼ(TOPO)により末端が修飾され、かつ直鎖状ベクターの両5'末端にTのオーバーハングを持つTOPO-TAベクターを利用することとした。SIGEX法の試行において、ベクターの自己環状化、つまり、断片未挿入のクローンの割合が多かったことは大きな問題の一つであった。元々、配列未知のDNA断片をクローニングすることを目的としていたSIGEX法では、平滑末端を有するDNA断片を挿入する手法を取っていた。しかし、この方法では、ベクターの自己環状化を防ぐのは非常に困難、かつ挿入されるDNA断片が長鎖になればなるほど効率が低下するという問題を抱えていた。一方、TAベクターにおいては、前述のようにベクターの両5'末端にT-overhangが突き出た構造を持つ。両端にTが突き出ていることで塩基の不对合が起り、自己環状化の確立を減じることが出来る。さらに、TOPOベクターというのはベクターの両端にトポイソメラーゼを修飾したものである。通常のクローニングにおいては、反応溶液中でベクターと挿入断片が適切な状態で出会い、さらにそこにDNA結合酵素(リガーゼ)が作用しなくてはならない。TOPOベクターにおいては末端にDNA異性化酵素(トポイソメラーゼ)が化学修飾されており、この酵素がベクターと挿入断片を結合するためにリガーゼを必要とせず、さらに、挿入断片が結合するベクターの末端に酵素が常に存在しているために断片挿入の効率が高くなる。市販されているTOPO-TAベクター(pCR2.1-TOPO)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。

(2)好気用ゲノムライブラリーの作成、及びベクターへの新規遺伝子導入による嫌気仕様アップグレード

次に、ゲノムライブラリーの作成を行うため、*gfp* 遺伝子を *lac* プロモーターの下流に持つベクターを設計・構築した。これをベースにDNA断片挿入部位にトポイソメラーゼ、及びT-overhangの化学修飾結合を委託により行い、pK18GreenTIR-TOPOを構築した。このベクターを用いて、統合国際掘削計画(IODP)第316次航海によって採取され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。PCR等に用いるDNAポリメラーゼによって末端にA-overhangを付加したDNA断片をpK18GreenTIR-TOPOに挿入し、エレクトロポレーションを用いて形質転換したところ、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。しかし、TOPO-TA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、新たな問題点も顕在化した。このライブラリーについて、図1にあるように、IPTGを作用させて*lac*プロモーターによる下流遺伝子の発現を促進させ、断片未挿入、または超短鎖の断片が挿入されたクローンがGFPによる緑色蛍光を発する状態にした。DNA断片が挿入されているクローンはGFPの蛍光を示さないため、それら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。

一方、オリジナルのSIGEX法ではGFPをレポータータンパク質として利用しているが、このGFPは四量体を形成して初めて蛍光を持つことが知られており、成熟型へのフォールディングは分子状酸素の存在下でのみ起こる(7)。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(7)が、実際に常時*gfp* 遺伝子が発現するよう形質転換した大腸菌クローンを用いて試験を行ったところ、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%未満であることが判明した。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。基質誘導が起こったクローンの検出を緑色蛍光に頼るSIGEX法にとって、発現クローンの1%未満しか検出できないというのは致命的な欠点であるため、分子上酸素が存在しない嫌気環境の遺伝子発現に用いるために、嫌気状態のままに蛍光を発するタンパク質 evoglow⁽⁸⁾を改良型のレポータータンパク質として導入した。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。

(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

作成した南海トラフ掘削試料由来のゲノムライブラリーについて、ニッケル、コバルト、モリブデン、ガリウムの各金属イオン (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mo^{6+} , Ga^{3+}) に対する応答特性の測定、および遺伝子応答陽性クローンの取得を行った。南海トラフ掘削サイトである C0001、および C0002 (図 2) それぞれから作成したライブラリーに金属イオンを作用させたところ、コバルトとモリブデンでは緑色蛍光を示すクローンが両ライブラリーについて見られなかったものの、C0002 ではニッケル、C0001 ではニッケルとガリウムの各イオンにおいて緑色蛍光クローン割合の上昇が見られた。

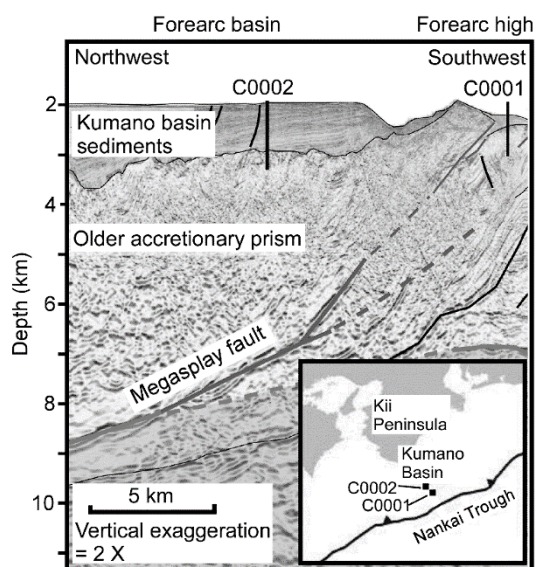


図 2: ライブラリー作成に用いた試料の掘削サイト

C0001 掘削試料由来のライブラリー(以下 C0001 ライブラリー)で金属イオンへの応答がより頻繁に見られたため、C0001 ライブラリーからニッケルおよびガリウムの各イオンに発現応答を示すクローンの単離を試みた。ニッケル、ガリウムそれぞれのイオンによる遺伝子発現誘導を行った C0001 ライブラリーから 192 ずつの緑色蛍光を有するクローンをセルソーターにより単離・培養し、それぞれ単離に用いた金属イオンでの応答をクローンごとに精査、最終的にニッケルで 3 クローン、ガリウムで 4 クローンを得た。

これらのクローンについて、各種金属イオンに対する応答特異性、およびクローンに挿入されている DNA 断片の配列解析を実施したところ、クローンの中にはニッケル、ガリウムそれぞれに特異的な応答を示すクローンが存在したほか、単離に用いた金属イオン以外のイオンに対して応答を示すものが存在することが分かった。また、塩基配列解析、およびその後の配列データベースまたはプロモーター探索ツールなどによる解析の結果、それぞれのクローン中には遺伝子発現を調節するプ

ロモーター領域やリボスイッチと呼ばれる配列そのものが調節装置として働く部位が存在していることが推定された。しかし、それらの大部分において、金属イオンに対する遺伝子応答を示す情報はこれまでに報告されておらず、従来のデータベース検索で得ることが出来ない情報を SIGEX 法がもたらしうることを実証することができた。

本研究では、データベース検索による遺伝子機能の推定の死角を補完しうる技術として、SIGEX 法を未知微生物が多く存在するといわれる海底下堆積物に適用するための基礎技術開発、および金属イオンに対する応答 DNA 配列の取得に成功した。得られたクローンに含まれていた DNA 断片配列の解析結果は、2004 年の原著論文から目立った応用例が殆ど見られない SIGEX 法が実際に未知の遺伝子機能を掘り起こすためのツールとして有用であることを示しており、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。

一方で、技術開発の段階で、依然としてベクターへの断片挿入時に未挿入クローンの割合が比較的高いなどの問題が存在している点も明らかになった。今後は、多種多様な微生物によって構成される環境微生物群の機能を一定レベルで網羅できるようなライブラリーサイズの拡大に努めるほか、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、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りたい。

<引用文献>

- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. PNAS 95:6578-6583.
- Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari R, Smith D, D'Hondt S. 2012. PNAS 109:16213-16216.
- Inagaki F, Nakagawa S. 2008. p. 135-158. In Dilek Y (ed.), Links Between Geological Processes, Microbial activities & Evolution of Life.
- Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE, House CH. 2008. PNAS 105:10583-10588.
- Lloyd K, Schreiber L, Petersen D, Kjeldsen K, Lever M, Steen A, Stepanauskas R, Richter M, Kleindienst S, Lenk S, Schramm A, Jørgensen B. 2013. Nature 496:215-218.
- Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K. 2005. Nat Biotech 23:88-93.
- Zhang C, Xing X-H, Lou K. 2005. FEMS Microbiology Letters 249:211-218.
- Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krausz U, Guterl J-K, Wendorff M, Losi A, Gartner W, Jaeger K-E. 2007. Nat Biotech 25:443-445.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Zhang X, Morono Y, Inagaki F, Wang F. 2016. A modified SDS-based DNA extraction method for high quality environmental DNA from seafloor environments. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, 7:986. DOI:10.3389/fmicb.2016.00986
2. Inagaki F, Hinrichs K-U, Kubo Y, Bowles MW, Heuer VB, Hong W-L, Hoshino T, Ijiri A, Imachi H, Ito M, Kaneko M, Lever MA, Lin Y-S, Methé BA, Morita S, Morono Y, Tanikawa W, Bihan M, Bowden SA, Elvert M, Glombitza C, Gross D, Harrington GJ, Hori T, Li K, Limmer D, Liu C-H, Murayama M, Ohkouchi N, Ono S, Park Y-S, Phillips S C, Prieto-Mollar X, Purkey M, Riedinger N, Sanada Y, Sauvage J, Snyder G, Susilawati R, Takano Y, Tasumi E, Terada T, Tomaru H, Trembath-Reichert E, Wang DT, Yamada Y. 2015. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, 査読有, 349:420-424. DOI:10.1126/science.aaa6882
3. Morono Y, Terada T, Yamamoto Y, Xiao N, Hirose T, Sugeno M, Ohwada N, Inagaki F. 2015. Intact preservation of environmental samples by freezing under an alternating magnetic field. *Environ. Microbiol. Rep.* 査読有, 7:243-251. DOI:10.1111/1758-2229.12238

〔学会発表〕（計 11 件）

1. 諸野 祐樹、寺田 武志、伊藤 元雄、稲垣 史生, Technological breakthroughs in search of the deep seafloor biosphere, Japan Geoscience Union Meeting 2016 (招待講演), 2016年05月22日, 幕張メッセ (千葉県千葉市)
2. Morono Y., 2015, Technical developments to explore sedimentary biosphere: current status, limitation, and future perspectives, CDEBI Sediment Workshop (招待講演) (国際学会), 2015年06月25日, University of Southern California (USA)
3. Morono Y., 2014, Intact preservation of environmental samples by freezing under an alternating magnetic field, Fourth C-DEBI Annual Meeting (招待講演), 2014年10月03日, Marina, California (USA)
4. 諸野祐樹, 2014, 海底下に広がる生命圏, 統合国際深海掘削計画10年の成果一般

公開シンポジウム、深海を掘る（招待講演）, 2014年04月06日, 国立科学博物館（東京都台東区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸野 祐樹 (MORONO, Yuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・グループリーダー代理

研究者番号：30421845