

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 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：26660154

研究課題名(和文) 深海・地殻内生命圏における細菌群集の多様性を規定するプラスミドの網羅的機能解析

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of plasmids in the deep-sea benthic biosphere

研究代表者

吉田 光宏 (YOSHIDA, Mitsuhiro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・技術副主任

研究者番号：60565555

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、深海堆積物環境中の可動性遺伝因子プラスミド集団の全体像を明確化した。東北沖水深500 m下の表層堆積物サンプルより抽出した全プラスミドDNAに対して網羅的メタゲノム解析を行った。その結果、プラスミドメタゲノム配列ライブラリー中より、フィルミクテスやデルタ・ガンマタイプを含むプロテオバクテリアに関連する配列が主に検出された。これらの遺伝子配列の多くは、糖・アミノ酸・エネルギー等の代謝関連をはじめ、翻訳、シグナル伝達、膜輸送に關与する遺伝子をコードしていた。以上の結果から、プラスミドが多様な深海底生細菌群集内での遺伝子伝播および生物機能の強化に重要な役割を果たすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we characterized the metagenome of plasmids as mobile genetic elements in the deep-sea benthic ecosystem. The total plasmid DNA that was obtained from the deep-sea surface sediment sample from off Tohoku, Japan (water depth = 500 m) was used for the plasmid metagenomics analysis. The metagenomic sequences associated with Firmicutes and Proteobacteria, such as Deltaproteobacteria and Gammaproteobacteria, dominated the plasmid metagenomic library. In the plasmid metegenome, most of the identified gene sequences were associated with genes involved in various metabolisms (including carbohydrate, amino acid, and energy), translation, signal transduction and membrane transport. Thus, it suggests that plasmids play an important role in horizontal gene transfer and development in the diverse benthic bacterial community.

研究分野：環境微生物学

キーワード：深海 堆積物 極限環境 プラスミド メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

細菌の環境適応や生態機能の進化には、外来性遺伝子の水平伝播による新たな機能の獲得が重要な役割を果たす。こうした外来性遺伝子の多くは、可動性遺伝因子によって運ばれる。異種細菌間での水平伝播を担う可動性遺伝因子としてプラスミドやバクテリオファージ等があり、重金属・薬剤耐性や病原性、共生窒素固定、難分解物質分解などに関わる遺伝子(群)を持ち運ぶことが知られる。

可動性遺伝因子の研究は、陸域起源の病原細菌や海洋表層・土壌などの環境細菌を対象とするものがほとんどである。これまで申請者は、深海の海底環境中のウイルスメタゲノムを解析した結果、多様な新規ウイルス群集を発見し、海洋表層とは異なる独自の宿主との相互作用システムの存在を見出した(引用文献)。そこで今回、ウイルスと同様、“遺伝子伝播の担い手”として重要な因子であるが、メタゲノム研究が立ち後れているプラスミドに着目し、本課題を提案した。

2. 研究の目的

生命誕生の場として有力な深海底生命圏におけるプラスミド集団の全体像および宿主との相互作用を明らかにするために、本研究では、全プラスミドを対象とするメタゲノム解析を行い、プラスミド集団全体の遺伝子の特徴・多様性・機能を調べた。

3. 研究の方法

東北沖水深 500メートル下の深海表層堆積物(海底下 5-6 cm 層)試料からプラスミドの回収を試みた。約 20 g の各堆積物試料に対して滅菌人工海水を加え、ShakeMaster を用いて 1 分間攪拌を行い、懸濁液を調製した。この懸濁液をハンディーツニックにより 1 分間超音波処理した。700 × g で 5 分間遠心し、堆積物粒子を取り除いた上清を回収した。さらに 10,000 × g での遠心を 5 分間行い、微生物細胞ペレットを再度フレッシュな TE に溶解した。この細胞試料について、アルカリ・SDS 法とクロロホルム - イソプロパノール沈殿精製を組み合わせた手法に供し、プラスミド抽出を行った。Plasmid-Safe DNase および RNase 処理により、染色体ゲノム等の不要核酸を分解除去した。phi29 ポリメラーゼによる多重鎖置換増幅法を用いて、プラスミド試料の全ゲノム増幅を行った。Qubit を使用した蛍光定量法により、抽出プラスミドの核酸量を測定したところ、いずれの試料からも 1 マイクログラム程度のプラスミド増幅産物が認められた。このようにして、以降のメタゲノム解析への必要量を確保した。次世代シーケンサー-MiSeq を使用して大規模塩基配列データを取得し、BLAST 相同性検索結果に

基づく全プラスミド遺伝子の集団構造および機能解析を行った。

4. 研究成果

深海表層堆積物試料より回収した全プラスミド集団についてメタゲノム解析を行った結果、167,399 の塩基配列(リード)量を得ることが出来た。NCBI_nr データベースに対して BlastX による相同性検索を行った。E-value が 10⁻⁵ 以下でヒットした配列を集計したところ(図 1)、Firmicutes に関連する配列が最も多く、以下、delta/epsilon subdivisions、Gammaproteobacteria、Alphaproteobacteria、Actinobacteria、Betaproteobacteria、Bacteroidetes/Chlorobi group、Planctomycetes、Chloroflexi と続いた。

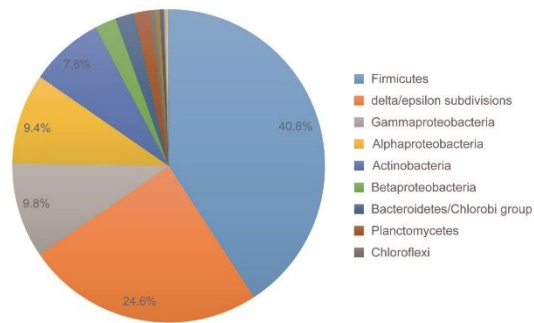


図 1. 深海堆積物表層環境におけるプラスミドメタゲノム配列の生物分類。

一方、リボソーム小サブユニット(SSU)のタグシーケンス解析データ(論文投稿中)では、Deltaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Planctomycetes、Bacteroidetes、Chloroflexi、Acidobacteria の順に SSU 配列が多かった。このように、双方の群集組成は非常に良く似ており、取得したプラスミドメタゲノム配列について生息する細菌群集との関係性を確認できた。また、Firmicutes、Actinobacteria、Betaproteobacteria に関連する SSU 配列が認められなかったことから、これらの分類群については、プラスミドによる遺伝子交換をより活発に行うと考えられた。

得られたプラスミドメタゲノム配列に対して、KEGG による遺伝子機能の分類を行った(図 2)。その結果、Carbohydrate Metabolism、Amino Acid Metabolism、Energy Metabolism といった代謝遺伝子に関連する配列が上位に入り、以下、Translation、Metabolism of Cofactors and Vitamins、Nucleotide Metabolism、Signal Transduction、Membrane Transport、Lipid Metabolism、Folding、Sorting and Degradation、Metabolism of Other Amino Acids、Glycan Biosynthesis and Metabolism と続いた。本プラスミドメタゲノムは、糖・アミノ酸・エネルギーの代謝に関する遺伝子をはじめ、翻訳、

シグナル伝達、膜輸送に関わる遺伝子を主に保有した。

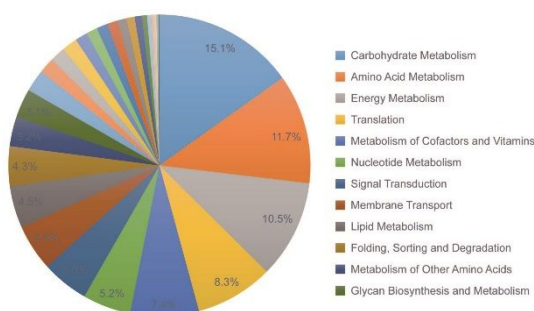


図 2. 深海堆積物表層環境におけるプラスミドメタゲノム配列のKEGG分類。

以上より、プラスミドが深海底生命圏における多様な異種細菌群集間の遺伝子伝播および生物機能の多様化・進化の促進に寄与することを示すデータを収集できた。

< 引用文献 >

Yoshida M, Takaki Y, Eitoku M, Nunoura T, Takai K (2013) Metagenomic analysis of viral communities in (had)pelagic sediments. *PLoS ONE*, 8(2): e57271. DOI: 10.1371/journal.pone.0057271

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件, 全て査読有)

- (1) Yoshida M, Yoshida-Takashima Y, Nunoura T, Takai K (2015) Identification and genomic analysis of temperate *Pseudomonas* bacteriophage PstS-1 from the Japan Trench at a depth of 7000 m. *Research in Microbiology*, 166(9): 668-676. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.05.001
- (2) Urayama S, Yoshida-Takashima Y, Yoshida M, Tomaru Y, Moriyama H, Takai K, Nunoura T (2015) A new fractionation and recovery method of viral genomes based on nucleic acid composition and structure using tandem column chromatography. *Microbes and Environment*, 30(2): 199-203. DOI: 10.1264/jjsme2.ME14174
- (3) Yoshida M, Yoshida-Takashima Y, Nunoura T, Takai K (2015) Genomic characterization of a temperate phage of the psychrotolerant deep-sea bacterium *Aurantimonas* sp. *Extremophiles*, 19(1): 49-58. DOI: 10.1007/s00792-014-0702-5

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 吉田光宏, 望月智弘, 浦山俊一, 吉田(高島)ゆかり, 西真郎, 高木善弘, 布浦拓郎, 高井研. 一本鎖 DNA ウイルス群を標的と

する定量的メタゲノミクス. 日本微生物生態学会第31回大会, 横須賀市文化会館(神奈川県横須賀市), 2016/10/23 ~ 2016/10/25.

- (2) 吉田ゆかり, 吉田光宏, 西真郎, 高木善弘, 高井研. イプシロンプロテオバクテリアが産生する細胞外膜小胞の形態学的・遺伝学的特徴. 日本微生物生態学会第31回大会, 横須賀市文化会館(神奈川県横須賀市), 2016/10/23 ~ 2016/10/25.
- (3) 吉田光宏, 望月智弘, 浦山俊一, 吉田(高島)ゆかり, 西真郎, 高木善弘, 布浦拓郎, 高井研. 一本鎖 DNA ウイルス群を標的とする定量的メタゲノミクス. フェージ・環境ウイルス研究合同シンポジウム, 海洋研究開発機構・横須賀本部(神奈川県横須賀市), 2016/10/21.
- (4) Yoshida M, Yoshida-Takashima Y, Nunoura T, Takai K. Genomic characterization of a temperate phage of the piezotolerant and psychrotolerant *Pseudomonas* sp. from the Japan Trench at a depth of 7,000 m. 第11回国際極限環境生物学会, 京都大学・百周年時計台記念館(京都府京都市), 2016/09/13.
- (5) Yoshida M, Yoshida-Takashima Y, Nunoura T, Takai K. Identification and genomic analysis of temperate *Pseudomonas* bacteriophage PstS-1 from the Japan trench at a depth of 7000 m. 日本微生物生態学会第30回大会, 土浦市亀城プラザ(茨城県土浦市), 2015/10/19.
- (6) Urayama S, Yoshida-Takashima Y, Yoshida M, Takai K, Nunoura T. Fractionation of four types of viral nucleic acids by using hydroxyapatite and cellulose chromatography. 第34回アメリカウイルス学会(オンタリオ州ロンドン市, カナダ), 2015/07/10.
- (7) 吉田ゆかり, 高木善弘, 吉田光宏, 布浦拓郎, 高井研. 極限環境におけるウイルスのゲノム解析. NGS 現場の会 第四回研究会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2015/07/01.
- (8) 浦山俊一, 吉田ゆかり, 吉田光宏, 高木善弘, 高井研, 布浦拓郎. ウイルス核酸種4種の同時分画及び dsRNA メタゲノム手法の確立. 第9回日本ゲノム微生物学会年会, 神戸大学(兵庫県神戸市), 2015/03/06 ~ 2015/03/07.

〔図書〕(計1件)

- (1) 浦山俊一, 吉田光宏, 吉田(高島)ゆかり (2015) 地球最大のウイルス貯留池: 海洋: 遺伝資源としての海洋ウイルス利用を目指して (生物の科学遺産 特集 環境ウイルス: 生物の進化と生態のカギを握る微小生命体). エヌ・ティー・エス, 69(4): 100p (pp.272-277).

〔その他〕

JAMSTEC 機関リポジトリのホームページ:
http://www.jamstec.go.jp/jir/infolib/meta_pub/G000002REP

(JAMSTEC 機関リポジトリ: 海洋研究開発機構で生み出された学術雑誌論文、紀要論文、会議発表用資料、図書等の知的生産物を電子的な形態で保存し、公開するシステム。)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 光宏 (YOSHIDA, Mitsuhiro)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・技術副主任
研究者番号: 60565555