

大規模ゲノム情報を活用した深海バイオリソース研究

課題責任者

平岡 聡史

海洋研究開発機構 海洋機能利用部門 生命理工学センター

著者

平岡 聡史*¹, 西村 陽介*¹, 高木 善弘*²*¹ 海洋研究開発機構 海洋機能利用部門 生命理工学センター, *² 海洋研究開発機構 超先鋭研究開発部門 超先鋭研究開発プログラム

キーワード：深海バイオリソース, メタゲノム解析, バイオインフォマティクス, 海洋微生物

1. 背景

バクテリアやアーキア、ウイルスといった微生物は、土壌や大気、海洋など、地球表層のあらゆる環境に生息している。特に海洋では、光合成による一次生産が活発な海洋表層（水深 0–200 m）、暗黒・低温・高圧環境である深海（水深 200–約 11,000 m）、摂氏数百度にも達する熱水が吹き出す熱水噴出孔など、多様な環境が存在し、そこに生息する微生物は陸上環境とは大きく異なる群集構造や微生物学的特徴を持つことが知られている。しかしながら、特に深海環境における微生物試料の採取には高度な探査技術が必要であり、国際的にも実施可能な研究機関は限られている。そのため、深海微生物生態系の研究例は他環境と比較して遥かに少なく、全容はほとんど分かっていない。このことは、微生物を含む海洋生態系や、微生物が駆動する地球規模での物質循環の理解を困難にしているのみならず、産業利用を志向した深海微生物の遺伝子資源の開拓を進める上で大きな障害となっている。

微生物の大半は、実験室環境下での分離培養が困難である。そのため、環境微生物を理解し利用するためには、分離培養株を用いた実験的な観測や操作に加えて、培養実験に依存しない解析を実施する必要がある。今日、非培養的な微生物解析のために、様々なゲノムベースの手法が考案され、広く利用されている。例えば 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により、微生物叢を構成する原核生物系統の相対存在量を推定可能である。またメタゲノム解析では、微生物叢から直接 DNA を抽出しシーケンス解析を実施することで、微生物ゲノム情報に直接アプローチ可能である[1]。さらに、近年登場し発展してきたロングリードシーケンシング技術をメタゲノム解析に応用することで、一般的なショートリードシーケンシングよりも高品質な微生物ゲノムの再構築や DNA 化学修飾（エピゲノム）解析が実施できる[2]。このような非培養的・網羅的なゲノム解析から得られたデータをもとに、詳細なバイオインフォマティクス解析を進めることで、環境微生物の生理生態の解明や有用な遺伝子資源の探索することが可能である。

そこで課題責任者の所属グループ（海洋機能利用部門 生命理工学センター 深海バイオリソース研究グループ）では、中長期計画「海洋資源の持続的有効利用に資する研究開発」の一環として、海洋環境に生息する原核生物やウ

イルスを対象とした培養・非培養ベースの研究を広く展開している[3,4]。本申請課題では、地球シミュレータシステムを活用し、特に海水や堆積物を中心とした試料を利用して得られたアンプリコン配列・メタゲノム配列情報を対象に、幅広いバイオインフォマティクス解析を実施してきた。

2. 深海堆積物中の微生物叢を対象とした大規模メタゲノム解析

北西太平洋海域の様々な海域（日本海溝、伊豆・小笠原海溝、マリアナ海溝、南海トラフ、琉球海溝、沖縄トラフ、相模湾、駿河湾など）において独自に採取された海底堆積物コアを利用して得られた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン配列・メタゲノム配列の大規模なデータ解析を実施した。具体的には、異なる堆積物深度からサブサンプリングされた 100 以上の試料を対象に、Illumina MiSeq や HiSeq を用いたショートリードシーケンスを行い、得られたリード配列から菌叢構造を推定した。さらに、特に炭素代謝や窒素循環に関わる機能遺伝子の予測と分布評価を実施したほか、栄養塩濃度などの環境情報を考慮した統合的解析を実施した。

そして、この堆積物メタゲノムデータを活用し、遺伝子配列の網羅的探索と微生物ゲノムの再構築（metagenome assembly）を実施し、海洋微生物が持つ遺伝子配列やゲノム配列（Metagenomic assembled genome; MAG）を大量に取得した。得られた配列はデータベースとして纏めており（図 1）、空間分布評価や進化系統解析、新規酵素探索などの複数の解析へと展開中である。

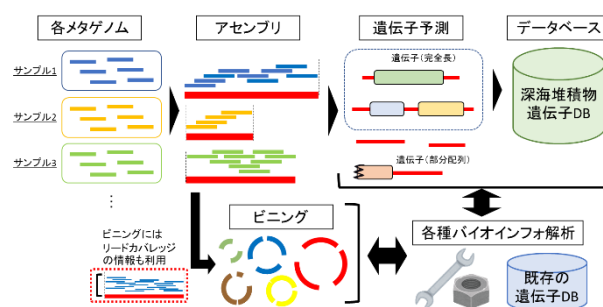


図 1 メタゲノム解析ワークフローのスキーム図

3. 新規糖質分解酵素探索

糖質の代謝に関わる酵素は糖質関連酵素 (CAZyme) と呼ばれており、その機能やタンパク質配列、構造などの情報は CAZY データベースで体系的に整理されている。その中でも、糖質分解酵素 (Glycoside Hydrolases; GH ファミリー) は、様々な糖質を分解しその構成要素を生物学的に再利用する重要な酵素群として、長年注目されてきた。今日まで、特に陸上に生息する様々な生物・微生物・環境メタゲノムを対象に CAZyme 探索が進められてきたが、GH ファミリーを含む CAZyme の全体像はまだ未知である。特に、深海環境に生息する微生物は、長年にわたり研究対象とされてこず、研究報告例もほとんどない。そこで本研究では、GH123 (β -N-acetylgalactosaminidase; β -NGA) ファミリー酵素に着目し、深海堆積物のメタゲノム配列から新規酵素の探索を行った。その結果、既知酵素とアミノ酸配列が大きく異なる配列が得られ、大腸菌を用いた酵素学的実験からその活性を実証した。さらに、この新規酵素から得られた知見を元に公共遺伝子配列データベースを検索したところ、多数の新規 β -NGA 候補配列が得られた。これらの配列は系統的に既知 GH123 酵素遺伝子とは異なるクレードに分類され、各クレードの酵素は GH123 と異なる基質特異性やタンパク質立体構造の特徴を持つことを実験的に明らかにした (図2) [5]。

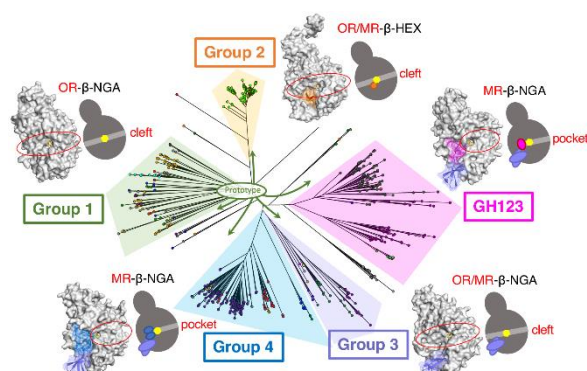


図2 β -NGA 酵素遺伝子の系統樹とファミリー分類

4. 制限修飾系関連酵素の活性測定系の開発

微生物が持つウイルス感染防御システムの一つとして、制限修飾系が知られている。一般に制限修飾系には、制限酵素と DNA メチル化酵素という2種類が必要であり、それらの活性や配列特異性を調べるために、DNA 電気泳動による煩雑な検証実験が長年行われてきた。本研究では、任意の制限酵素・DNA メチル化酵素を対象とする、無細胞系によるタンパク質発現と蛍光ベースでの活性検出を組み合わせた *in vitro* の新規測定手法を開発した。そして、海洋性バクテリオファージがコードする DNA メチル化酵素を対象とした検証から、エピゲノム解析により事前に予測されていた認識モチーフ配列が正確なものであることを実験的に証明した[6]。

5. amoA 遺伝子プローブキャプチャシーケンス法の開発

アンモニア酸化細菌 (AOB) や古細菌 (AOA) と呼ばれる微生物は、アンモニア (NH_4^+) を酸化して亜硝酸 (NO_2^-) にする機能を持ち、地球上の窒素循環を理解する上で重要な生物群である。AOA/AOB の系統分類や環境分布を調べる上で、amoA (ammonia monooxygenase subunit A) 遺伝子がバイオマーカーとして広く利用されている。ところが、この遺伝子には系統間での配列保存性が低く、全ての AOA/AOB をカバーする汎用 PCR プライマーの設計が困難であるという本質的な問題が存在する。一方で、amoA 遺伝子は環境中での存在量が低いため、メタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析といったコミュニティ網羅的な解析手法であっても、現実的なシーケンス量では十分な解析が困難である。

そこで本研究ではプローブキャプチャ法と呼ばれる実験手法を用いて amoA 遺伝子をコードする DNA ライブラリを選択的に濃縮し、シーケンスと配列データ解析を行う、一連の実験・解析手法を構築した。そして、本手法を用いて複数の海洋水サンプルを解析し、一般的なアンプリコン解析やショットガンシーケンシング解析よりも遥かに低バイアス・高効率・高解像度に amoA 遺伝子配列解析をできることを示した (図3) [7]。

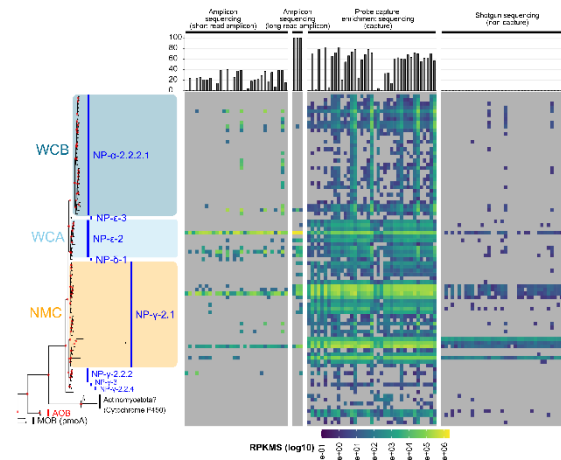


図3 アンプリコン配列解析、プローブキャプチャ法、ショットガンシーケンシングの3手法により推定された AOA/AOB の存在量の比較

謝辞

これらの研究は、海洋研究開発機構の地球シミュレーションシステムを利用してパイオインフォマティクス解析の一部を実施した。また、これらの研究は JSPS 科研費 (JP20K15444, JP21K18156, JP22K05398, JP23K18015)、JST 戦略的創造研究推進事業 ACT-X (JPMJAX22BK) の助成を受けた。

文献

- [1] S. Hiraoka, C.-C. Yang, and W. Iwasaki, "Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: Current status and beyond," *Microbes and Environments*, 31(3), 204-212, (2016)
- [2] S. Hiraoka, Y. Okazaki, M. Anda, A. Toyoda, S. Nakano, and W. Iwasaki, "Metaepigenomic analysis reveals the unexplored diversity of DNA methylations in an environmental prokaryotic community," *Nature Communications*, 10, 159, (2019)
- [3] S. Hiraoka, M. Hirai, Y. Matsui, A. Makabe, H. Minegishi, M. Tsuda, Juliarni, E. Rastelli, R. Danovaro, C. Corinaldesi, T. Kitahashi, E. Tasumi, M. Nishizawa, K. Takai, H. Nomaki, and T. Nunoura, "Microbial community and geochemical analyses of trans-trench sediments for understanding the roles of hadal environments," *The ISME Journal*, 14, 740–756, (2020)
- [4] S. Hiraoka, T. Sumida, M. Hirai, A. Toyoda, S. Kawagucci, T. Yokokawa, and T. Nunoura, "Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities," *Nucleic Acids Research*, 50, 1531-1550, (2022)
- [5] T. Sumida, S. Hiraoka, K. Usui, A. Ishiwata, T. Sengoku, K. A. Stubbs, K. Tanaka, S. Deguchi, S. Fushinobu, and T. Nunoura, "Genetic and functional diversity of beta-N-acetylgalactosamine residue-targeting glycosidases expanded by deep-sea metagenome," *Nature Communications*, 15, 3543, (2024)
- [6] Y. Zhang, Y. Takaki, Y. Yoshida-Takashima, S. Hiraoka, K. Kurosawa, T. Nunoura, and K. Takai, "A sequential one-pot approach for rapid and convenient characterization of putative restriction-modification systems," *mSystems*, 8(6), e00817-23, (2023)
- [7] S. Hiraoka, M. Ijichi, H. Takeshima, Y. Kumagai, C.-C. Yang, Y. Makabe-Kobayashi, H. Fukuda, S. Yoshizawa, W. Iwasaki, K. Kogure, and T. Shiozaki, "Probe capture enrichment sequencing of amoA genes discloses diverse ammonia-oxidizing archaeal and bacterial populations," *bioRxiv*, 10.1101/2023.04.10.536224, (2023)