

研究課題別評価書

1. 研究課題名

モデル共生系における創発的機能発現メカニズムの解明

2. 氏名

高坂 智之

3. 研究のねらい

本研究では、生命システムを理解する為に、実際の自然界の共生のモデルとなり得る嫌気的なプロピオン酸酸化共生系に着目し、この共生に関わる2つの微生物、プロピオン酸酸化共生細菌及び水素資化性メタン生成アーキアがどのように共生を構築して行くのかを分析する事により、異なる2つの生命システムが1つのシステムを作り上げ、そして一つのシステムとして新しい機能を獲得して行く過程を明らかにする事を目的とする。

4. 研究成果

a. プロピオン酸酸化共生系の解析

我々はまず、プロピオン酸酸化共生細菌である *Pelotomaculum thermopropionicum* SI 株 (SI 株) と水素資化性メタン生成アーキア *Methanothermobacter thermautotrophicus* delta H 株 (delta H 株) をそれぞれ単独培養から再共生させる系の構築に取り組んだ。単独から共生させ、共生して行く過程を解析して行くことが重要であると考えたためである。しかし、様々な培養条件を試して実験を試みたが、我々の系では単独培養した SI 株と delta H 株を単純に混ぜあわせてもプロピオン酸を基質とした増殖が観察されないことが明らかとなった。また、我々が保有するプロピオン酸酸化共生系は凝集を形成するのに対し (Fig. 1A)、単独から混ぜあわせた共生系は凝集しないことが明らかとなった (Fig. 1B)。

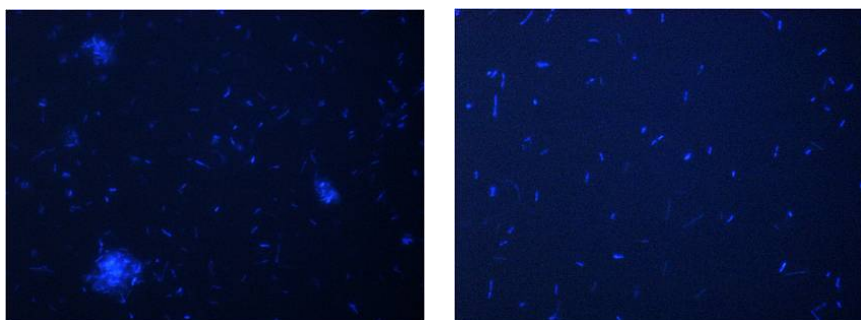


Fig. 1 A, 凝集体を形成する coculture; B, 凝集体を形成しない coculture

そこで我々は、プロピオン酸を基質に共生出来る共生系と単独培養の各菌株の違いを明らかにする為、共生系中のプロピオン酸酸化共生細菌及び水素資化性メタン生成アーキアの全ゲノム配列を解読した。その結果、SI 株をリファレンスとした解析では、得られた配列でリファレンス配列の全領域をカバーする結果が得られた (Fig. 2 左)。この事から、共生系のプロピオン酸酸化共生細菌は SI 株とほぼ同一のゲノム配列を持つ事が示された。一方、delta H 株をリファレンスとした解析では、ある程度の部分では配列と一致が見られたが、全領域をカバーする事が出来なかった。特にゲノムの複製に関わると考えられる ori 領域付近の配列が大きく異なっており、この領域に関してはほとんど塩基配列の一致が見られなかった (Fig. 2 右)。

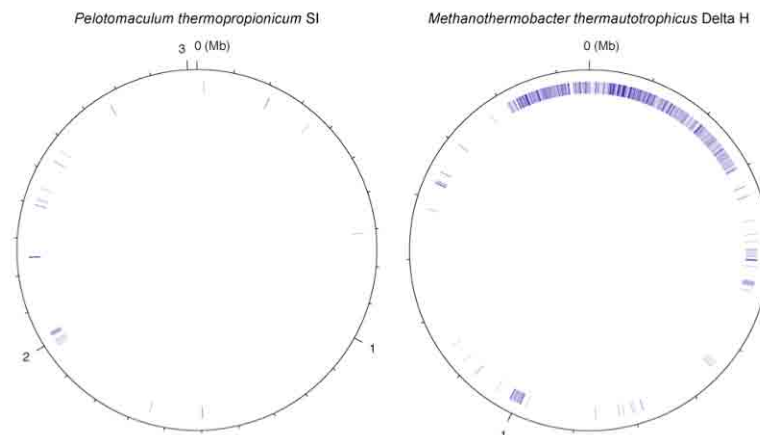


Fig. 2. 共生系の全ゲノム配列解析結果(左: プロピオン酸酸化共生細菌、右: メタン菌)
黒線で示す円が reference 配列。青線の部分が reference 配列と一致しなかった部分。

この結果から、プロピオン酸共生系のメタン菌はそのゲノムが delta H 株とは大きく異なる可能性が示唆された。我々はこの共生系よりメタン菌を分離し、その菌株の名前を *Methanothermobacter thermautotrophicus* CaT2 株 (CaT2 株) と名付けた。この CaT2 株は delta H 株に比べ凝集体を形成しやすい事が明らかとなった (Fig. 3)。

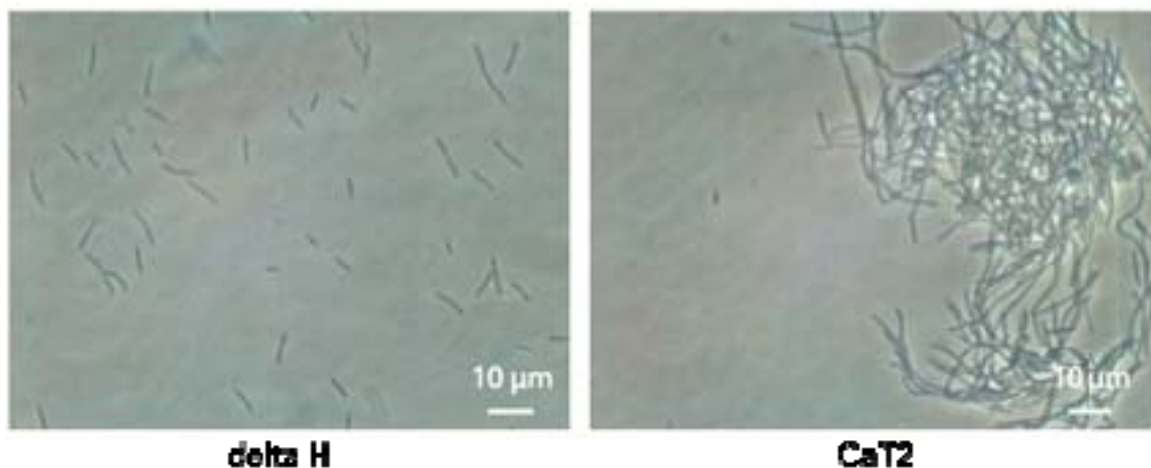


Fig. 3. メタン菌の光学顕微鏡観察

また、培養法を検討することによって、SI 株と CaT2 株及び SI 株と delta H 株を単独培養からプロピオン酸を基質に共生させることに成功した。

b. CaT2 株の全ゲノム解析

我々は、CaT2 株の分子基盤を強化し、プロピオン酸酸化共生細菌との共生過程を解析しやすくするために、CaT2 株の全ゲノムをコンプリートした。その後アノテーション解析を完了し、1.71 Mbp のゲノム配列上に 1759 の遺伝子を同定した。また、11 kbp のプラスミド上に 11 の遺伝子を同定した。このデータを基に、CaT2 株のゲノム情報と delta H 株のゲノム情報を比較した (エラー! 参照元が見つかりません。)

Table 1. CaT2 株と delta H 株のゲノム比較

○ CaT2 と delta H のゲノム比較	CaT2 株	delta H 株
ゲノムサイズ	ca. 1.71 Mbp	ca. 1.75 Mbp
プラスミド	有	無
遺伝子数 (プラスミド内)	1759 (11)	1854
特有遺伝子	88	212
内 hypothetical protein (HP)	54	156
HP 以外遺伝子	34	56

その結果、delta H 株と比較して CaT2 株に特異な遺伝子として 88 の遺伝子が見いだされ、その中には CaT2 株の特徴であるギ酸資化に関わるギ酸デヒドロゲナーゼの一群の遺伝子が含まれていた。このことから、CaT2 株の有するギ酸資化能が裏付けられた。また、特異的遺伝子の中には糖転移酵素が見いだされ、これら遺伝子の CaT2 株の凝集能への関与が示唆された。

5. 自己評価

この課題スタート時には単独の状態から共生させることができなかったが、共生状態の微生物のゲノム解析を行うことで、想定していた微生物とは異なる微生物が共生していたことや、培養法に問題があったことを明確にすることが出来、単独の状態からスムーズに再共生出来るようになった。また、共生微生物のゲノム解析を行うことができ、共生微生物の情報基盤を強化することができた。さらに、共生系から経時的に RNA の抽出を行い解析を行う一連の解析系が構築出来た。

6. 研究総括の見解

異なる2つの微生物を共生させ、それぞれの微生物から経時的に転写解析を行うための RNA を抽出し、そしてそれ分析するためのマイクロアレイの構築を行ない、共生させる微生物のゲノム解析を行うことができ、共生微生物の情報基盤を強化することができたことは、評価できる。これらのデータを活かし、今後の発展を期待したい。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①論文

1. Kosaka T, Kato S, Shimoyama T, Ishii S, Abe T, Watanabe K(2008) The genome of *Pelotomaculum thermopropionicum* reveals niche-associated evolution in anaerobic microbiota. *Genome Research*, 18, 442~448.

②学会誌への発表

1. 高坂智之、渡邊一哉 (2009)、ゲノム情報を基に微生物共生のメカニズムを探る、日本バイオインフォマティクス学会ニュースレター19号p4-5

③学会発表

1. 高坂智之、藤英博、豊田敦、藤山秋佐夫、花田智、織田雅直(2009). 高温性水素資化性メタン生成菌の凝集性に関する解析. 第23回日本微生物生態学会大会. 広島県東広島市.
2. 高坂智之、花田智(2009). 凝集性を示す高温の水素資化性メタン生成アーキア. 日本農芸化学会2009年度大会. 福岡県福岡市.
3. Kosaka T, Kato S, Watanabe K, Hanada S, Nakamura K(2008). The existence of coaggregates seriously affects on syntrophic propionate oxidation. The 12th International Symposium on Microbial Ecology. Cairns, Australia.
4. 高坂智之、加藤創一郎、下山武文、石井俊一、阿部貴志、渡辺一哉(2008). 生育環境に適応し進化した *Pelotomaculum thermopropionicum* のゲノム. 第2回日本ゲノム微生物学会. 大阪府吹田市

【 B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Kato S, Kosaka T, Watanabe K(2009). Substrate-dependent transcriptomic shifts in *Pelotomaculum thermopropionicum* grown in syntrophic co-culture with *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Microbial Biotechnology, 2, 575～584.
2. Habe H, Kobuna A, Hosoda A, Kosaka T, Endoh T, Tamura H, Yamane H, Nojiri H, Omori T, Watanabe K(2009) Identification of the electron transfer flavoprotein as upregulated enzyme in the benzoate utilization of *Desulfotignum balticum*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 1647～1652.
3. Kato S, Kosaka T, Watanabe K(2008) Comparative transcriptome analysis of responses of *Methanothermobacter thermautotrophicus* to different environmental stimuli. Environmental Microbiology, 10, 893～905.