

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 温泉中の新規微生物およびそのRNA遺伝子の探索                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Sub Title        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Author           | 村上, 慎之介(Murakami, Shinnosuke)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Publisher        | 慶應義塾大学湘南藤沢学会                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Publication year | 2012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Jtitle           | 生命と情報 No.19 (2012. ) ,p.17- 28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Abstract         | <p>地球上には様々な環境が存在し,そこには多様な微生物が生息している。人類が実験室であらゆる地球環境を人工的に再現することは困難であり,故に多くの微生物は現代の技術で培養することが不可能である。そこで近年,様々な環境中に生息する難培養性微生物を対象とした遺伝子レベルの研究が盛んに行われるようになった。本研究では地中250〜1000mより直接に採取された湯野浜温泉(山形県鶴岡市)の源泉水(57°C, pH8.1)をサンプルとし,この環境に生息する微生物およびその遺伝子を得てこれを解析した。まず本環境に生息する微生物を調べるため,バクテリア・古細菌それぞれについて16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行った結果, ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms)とよばれるグループに属する新規古細菌と,βプロテオバクテリアに属する3種の新規バクテリアが本環境における最優勢種であることが示された。また,同環境から得られた低分子RNA分画を用いたメタトランスクリプトーム解析の結果, 64, 194本(20,057種)のcDNA配列が得られ,これらの90%はtRNA, rRNAまたはそれらのフラグメント(分解産物と考えられるもの)であった。残りの10%(2,181本)の塩基配列は新規sRNA候補であり,このうち14種は観測数も多く既知のnon-coding RNAと配列や二次構造の相同性が無かった。さらに,そのうちの6種については安定な二次構造を形成すると予測されたことから,新規機能性小分子RNAと考えられるものであった。また,本研究では多くのtRNAとtRNAフラグメントが得られたが,その解析からtRNAの種類と分解位置について特徴的な関係を示すことができた。バクテリアにおけるtRNA分解はこれまで大腸菌や放線菌のみで研究されており,さらにその対象となるtRNAの種類も限られていた。本研究では様々なtRNAに対してその分解位置を解析し,多くのtRNAがアンチコドン周辺で分解されることや,10種類のtRNAについては15塩基目と16塩基目の間で分解されやすいことなどを示した。</p> |
| Notes            | 慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集<br>修士論文ダイジェスト                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Genre            | Technical Report                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0017">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0017</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# 温泉中の新規微生物およびそのRNA遺伝子の探索

政策・メディア研究科 修士課程2年

村上 慎之介

## 要旨

地球上には様々な環境が存在し、そこには多様な微生物が生息している。人類が実験室であらゆる地球環境を人工的に再現することは困難であり、故に多くの微生物は現代の技術で培養することが不可能である。そこで近年、様々な環境中に生息する難培養性微生物を対象とした遺伝子レベルの研究が盛んに行われるようになった。本研究では地中250～1000mより直接に採取された湯野浜温泉（山形県鶴岡市）の源泉水（57℃, pH 8.1）をサンプルとし、この環境に生息する微生物およびその遺伝子を得てこれを解析した。まず本環境に生息する微生物を調べるため、バクテリア・古細菌それぞれについて16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行った結果、ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) とよばれるグループに属する新規古細菌と、βプロテオバクテリアに属する3種の新規バクテリアが本環境における最優勢種であることが示された。また、同環境から得られた低分子RNA分画を用いたメタトランスクリプトーム解析の結果、64,194本（20,057種）のcDNA配列が得られ、これらの90%はtRNA, rRNAまたはそれらのフラグメント（分解産物と考えられるもの）であった。残りの10%（2,181本）の塩基配列は新規sRNA候補であり、このうち14種は観測数も多く既知のnon-coding RNAと配列や二次構造の相同性が無かった。さらに、そのうちの6種については安定な二次構造を形成すると予測されたことから、新規機能性小分子RNAと考えられるものであった。また、本研究では多くのtRNAとtRNAフラグメントが得られたが、その解析からtRNAの種類と分解位置について特徴的な関係を示すことができた。バクテリアにおけるtRNA分解はこれまで大腸菌や放線菌のみで研究されており、さらにその対象となるtRNAの種類も限られていた。本研究では様々なtRNAに対してその分解位置を解析し、多くのtRNAがアンチコドン周辺で分解されることや、10種類のtRNAについては15塩基目と16塩基目の間で分解されやすいことなどを示した。

キーワード：温泉，微生物，16S rRNA，sRNA，tRNA

## 1. 序論

地球上には実に多様な環境が存在している。人類が生活可能な環境はそのごく一部であるが、一般的に「微生物」とよばれる原核生物は地球上のあらゆる環境に生息している。例えば深さ数千メートルの深海や、100°Cを超える温泉、南極の氷の中など、人類が到底生活することのできないような環境を好んで生息しているものもある。人類は研究のために微生物の培養を試みてきたが、これらの多様な環境に生息する微生物の全てを培養することは現在の技術では困難である。地球上に生息する99%以上の微生物は単離・培養ができないと考えられており、これまでもたらされたバクテリアやアーキアの種類や分布、またそれらの遺伝情報に関する知見は地球規模で考えればほんのわずかにすぎない。培養を介して調べることのできなかった多様な微生物やそれらが持つユニークな遺伝子を明らかにするためには、これまで研究されてこなかった難培養性の微生物を研究対象として扱う必要がある。そこで近年、難培養性微生物についても遺伝子レベルで研究を行う「メタゲノム解析」や、環境中で実際に発現している遺伝子情報を得る「メタトランスクリプトーム解析」が行われるようになり、培養を介さずとも分子生物学的に有益な研究を行うことが可能になってきた。今後の微生物研究にとって、様々な環境中に生息する難培養性微生物やその遺伝子情報を収集することは非常に重要であると考え、本研究では湯野浜温泉（山形県鶴岡市）源泉中の微生物群に対するメタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析を行った。

トランスクリプトーム解析では多様なRNA分子を得ることができるが、本研究ではSmall noncoding RNA (sRNA) に注目した。sRNAは細胞内に存在する低分子RNAで、原核生物においてmRNAの転写や翻訳を制御する機能があると考えられている (Tang *et al.*, 2002; Gottesman, 2005; Jost *et al.*, 2011)。他にも細胞内に存在する小さなRNA分子として、大腸菌やストレプトマイセスでは多くのtRNAフラグメント（断片化されたtRNA）が検出されている (Kawano *et al.*, 2005; Haiser *et al.*, 2008; Shinhara *et al.*, 2011)。大腸菌においてはプラスミドにコードされた酵素である「コリシン」の一部がファージの感染に応答して特定のtRNAを切断することが知られており (Masaki *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2006)、真核生物においては、tRNAの断片化がストレス応答に関与しているとの報告や (Thompson *et al.*, 2008; Emara *et al.*, 2010)、ガンや加齢に伴ってtRNAの断片化の様子が異なるとの報告もある (Lee *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2011)。

一方で、これまでに行われたsRNA研究の大部分はモデル生物を対象にしたものであり、環境中に存在する多くの難培養性微生物が持つsRNAについては研究が及んでいない。近年盛んに行われるようになってきたメタゲノム解析は、培養を介さず直接に環境中の微生物由来のDNA配列を得ることが可能なため、培養が難しいと考えられていた種を含む環境中微生物のプロファイルや、それらの系統学的な位置を明らかにすることができる。これまでに海 (Venter *et al.*, 2004)、温泉 (Barns *et al.*, 1994; Kvist *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2008; Inskoop *et al.*, 2010)、熱水噴出孔 (Xie *et al.*, 2011)、金山 (Nunoura *et al.*, 2005; Nunoura *et al.*, 2011)、ヒトの皮膚 (Grice *et al.*, 2009)、ヒトの腸管 (Arumugam *et al.*, 2011) など様々な環境でメタゲノム解析が行われ、微生物の多様性やそれらが持つ遺伝子配列が明らかになってきた。しかしメタゲノム解析では、実際にその環境で発現している遺伝子の種類や量を調べることはできず、環境中における個々の微生物の役割や相互作用を調べることは困難である。この問題を解決するためには、環境中から直接にRNA分子を抽出し、網羅的に塩基配列を決定するメタトランスクリプトーム解析を行う必要があり、こちらも近年重要視されるようになってきた (Shi *et al.*, 2009; Warnecke *et al.*, 2009; Bomar *et al.*, 2011)。近年の報告では海水中から大きな構造を持つ特殊なnon-coding RNAや (Weinberg *et al.*, 2009)、深さ特異的に発現しているsRNAの存在が示されていることから (Shi *et al.*, 2009)、環境中のsRNAはそこに生息する微生物がその環境に適応するために必要な遺伝子である可能性があり、非常に重要な研究対象であると考えられる。しかし、メタトランスクリプトーム解析だけでは環境中に生息する微生物の種を調べることは難しく、従ってメタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析を組み

合わせて行うことが重要であると考えられる。

本研究ではメタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析を組み合わせ、温泉水中に生息する微生物群と、それらが持つsRNAを網羅的に探索した。その結果、興味深い古細菌やバクテリアを発見することができ、またそれらが持つ新規sRNA候補を提示することができた。tRNAの分解についてもこれまで報告されていなかった新規知見が得られたため、ここに報告する。

## 2. 対象と手法

ページ数の関係で割愛する。詳細は修士論文参照のこと。

## 3. 結果と議論

「資料不掲載」の部分および詳細は修士論文参照のこと。

### 3.1. 湯野浜温泉源泉水中の微生物コミュニティ

本研究はメタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析を組み合わせ、湯野浜温泉源泉水中の微生物コミュニティとその生息する微生物が持つsRNAを明らかにすることを目指した。まず、微生物コミュニティを明らかにするために16S rRNA遺伝子をPCRにて増幅し、塩基配列を決定した。古細菌の16S rRNA遺伝子はバクテリアに比べて多様性に富んでいることと、古細菌は近年次々に新たな種のゲノムが解読されていることから、なるべく多くの種の遺伝子配列を考慮した最新のプライマーを用いることが望まれる。2011年にGantnerらによって報告された古細菌の16S rRNA遺伝子プライマー (Gantner *et al.*, 2011) は、3種類の環境サンプルを用いて多様な古細菌を検出できることを示しているものであり、本研究ではこれを用いた。得られたPCR産物をクローニングし、シーケンスを行ったところ、87クロンの塩基配列を得ることができた。既知の古細菌の16S rRNA遺伝子と合わせて系統樹を描画し、系統解析を行った結果 (資料不掲載)、各クロンは遺伝子的にArchaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms (ARMAN) (Baker *et al.*, 2006)、Methanococcales, miscellaneous crenarchaeotic group (MCG) (Nunoura *et al.*, 2005)、South African Gold Mine Crenarchaeotic Group (SAGMCG) (Takai *et al.*, 2001) と近縁であることがわかり、そのうちARMANの近縁種とみられるものが58クロンと最多であった (図1A)。

また、本研究ではより多様な古細菌を検出するために独自に設計したプライマーも用いた。その結果、最も多く検出されたものはARMANの近縁種であり、これは先述のプライマーで得られたクロンと完全に相同な塩基配列であった。しかし、他にも先のプライマーでは検出できなかったMarine Group (Massana *et al.*, 1997)、Hot Water Crenarchaeotic Group (HWCG) I (Nunoura *et al.*, 2005)、Ancient Archaeal Group (AAG) (Takai *et al.*, 1999)、Forest Soil Crenarchaeotic Group (FSCG) (Jurgens *et al.*, 1999)、Thermoplasmatalesの近縁種に由来すると考えられる塩基配列も得られた (資料不掲載)。この結果は広範な種の古細菌を検出するためには様々なプライマーを並行して用いることが重要であることを示している。

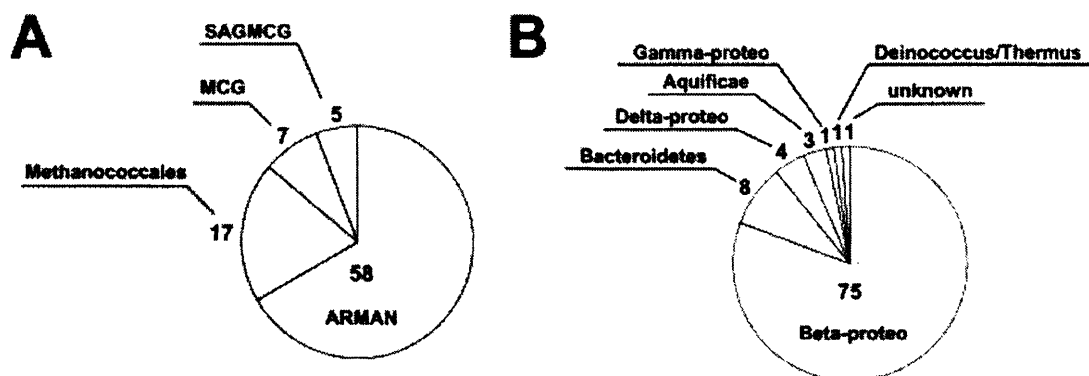


図1：湯野浜温泉源泉水より検出された古細菌とバクテリアの分類群およびその割合

(A) 本研究にて古細菌特異的なプライマーを用いて得られた87クローンの16S rRNA遺伝子配列について、系統樹（資料不掲載）を描いて最も近縁な分類群を推定し、その結果を円グラフに示した。(B) 本研究にてバクテリア特異的なプライマーを用いて得られた93クローンの16S rRNA遺伝子配列について、系統樹（資料不掲載）を描いて最も近縁な分類群を推定し、その結果を円グラフに示した。図中の数字は対応するクローン数を示している。

両プライマーを用いた結果で共に最多のクローンが得られたARMANであるが、このグループに属する古細菌はこれまで酸性の環境からしか発見されていなかった (Baker *et al.*, 2010)。しかし、本研究で扱った湯野浜温泉源泉水はpHが8.1の弱アルカリ環境であり、本研究で発見したARMANは酸性環境以外で発見された初めてのARMANの近縁種といえる。また、本研究で見つかったARMANの近縁種は、16S rRNA遺伝子中にリピート配列のような介在配列を有していた（資料不掲載）。これは過去に報告されているARMANの遺伝子中には見つからない塩基配列で、さらに2ヶ所（既知のARMANの677塩基目と817塩基目の位置）に同様の配列が見つかったことから、湯野浜温泉源泉という地中深くの外界と接触が無い環境の中に生息する微生物間で、塩基配列の移動や挿入が起こった結果かもしれない。

ARMAN以外の古細菌に注目すると、AAGも興味深い種である。この種は古細菌の系統樹の根元付近から分岐しており、深海の熱水噴出孔のみで見つかつていた (Takai *et al.*, 1999)。ARMANもAAGもこれまでは限られた環境に生息していると考えられていたが、本研究の結果によりこれらの種（またはその近縁種）がより広範な環境に生息可能である可能性を示すことができた。

本研究ではAAG, Marine Group, Thaumarchaeota門の古細菌など、これまで海で見つかつていた古細菌が多数発見された。湯野浜温泉は海沿いに位置していることから、地下深くでは海水が土壤中に侵入している可能性がある。従って、海水とともに海水中の古細菌も土壤中へ侵入していると考えれば、この結果を説明することができる。

HWCG Iは鹿児島県の菱刈金山で発見された古細菌群である。その中の1種は近年メタゲノム解析によってゲノム再構成が行われ、*Caldiararchaeum subterraneum* (Nunoura *et al.*, 2011) という種が報告されている。菱刈金山の環境はpHが6.19~6.80、温度が71.5~85.0°Cと報告されており、湯野浜温泉源泉水とは異なる環境であるが、同じグループに属する古細菌が発見されたことは興味深い。また、Gantnerらが報告したプライマーによって検出されたMCGやSAGMCGも、菱刈金山で発見されている (Nunoura *et al.*, 2005)。これらの結果より、HWCG I, MCG, SAGMCGは日本の地下環境に共通して生息する古細菌である可能性がある。

古細菌と同様に、湯野浜温泉源泉中に生息するバクテリアについても、16S rRNA遺伝子配列を得て解析を行った。プライマーはWilmsらによって報告されているユニバーサルプライマー (Wilms *et al.*, 2006) を用いた。PCR産物をクローニングし、シークエンスを行ったところ、93クローンの塩基配列が得られた。BLASTによる相同性検索の結果、データベースに登録されている難培養性バクテリアの16S rRNA遺伝子配列と完全に一致するクローンが1つ得られたが、その他は完全に一致するものはなかった。既知のデータベースと最も類似性が低かったクローンは東濃ウラン鉱床で発見された難培養性のバクテリア (Miyoshi *et al.*, 2005) と83%一致したものであったが、16S rRNA遺伝子の塩基配列が17%も異なるとなれば、これは全くの別種（新種）であると考えられる。残りの塩基配列はβ-Proteobacteria, Bacteroidetes, Aquificae, Deinococcus/Thermus, δ-Proteobacteria, γ-Proteobacteriaに属するバクテリアに由来するものと推定された (図1B)。

本研究ではβ-Proteobacteriaに属すると考えられるバクテリアの塩基配列が3種得られ、その合計は81%に上った (93クローン中75クローン)。従って湯野浜温泉源泉水中のバクテリアのコミュニティは、β-Proteobacteriaに属するバクテリアが最優勢であると考えられる。中でもそのうちの1種は系統樹上でβ-Proteobacteriaの中で最も根本に近い位置で分岐している興味深い種であった (資料不掲載)。

以上が湯野浜温泉源泉水中に生息すると考えられる微生物の概要であるが、古細菌、バクテリ

ア共に興味深い新種が多数発見され、本環境は微生物研究の資源として非常に価値の高いものと言えるだろう。

### 3.2. sRNAのメタトランスクリプトーム解析

先の項で湯野浜温泉源泉水中に生息する微生物について明らかにしてきた。本研究では同時にメタトランスクリプトーム解析を行うことで、それらの微生物が実際に発現している遺伝子も明らかにしたいと考えた。中でも近年注目されている小分子RNAに注目し、環境中から200塩基以下のRNAを抽出して網羅的に塩基配列を決定した。RNAは57°Cの環境から直接に抽出したものであるが、電気泳動の結果分解している様子はなく、tRNAと考えられる70塩基付近に単一のバンドを確認することができた。5', 3'の両端にアダプター配列を結合させ、逆転写を行いcDNA化した後の電気泳動の結果から、tRNAを中心とするcDNAライブラリーを構築できている様子を伺うことができた（資料不掲載）。

シーケンスの結果、86,236リードの塩基配列を得ることができた。cDNA化されたリードだけを解析に用いるため、両端にアダプター配列が現れないものは除去した。また、完全に相同な塩基配列は1つにまとめ、11~197塩基（平均62塩基）の重複の無い20,057種類の塩基配列を得た。これらの塩基配列がどのような遺伝子であるか調べるために、種々の類似性検索に基づきsRNAの分類を行った（表1）。

表1：各種sRNAのリード数と割合

| Small RNA type      |                          | Nonredundant (%) |               | Redundant (%) |               |
|---------------------|--------------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| tRNA                | Mature                   | 8,069 (40.2)     | 10,132 (50.5) | 43,092 (67.1) | 47,576 (74.1) |
|                     | Fragment                 | 2,063 (10.3)     |               | 4,484 (7.0)   |               |
| rRNA                | Mature 5S                | 532 (2.7)        |               | 2,036 (3.2)   |               |
|                     | 5S Fragment              | 320 (1.6)        | 7,698 (38.4)  | 673 (1.0)     | 13,482 (21.0) |
|                     | 16S Fragment             | 3,499 (17.4)     |               | 5,640 (8.8)   |               |
|                     | 23S Fragment             | 3,348 (16.7)     |               | 5,133 (8.0)   |               |
| Other noncoding RNA | SRP bact <sup>(1)</sup>  | 36 (0.18)        |               | 66 (0.10)     |               |
|                     | TPP <sup>(2)</sup>       | 4 (0.02)         | 45 (0.22)     | 4 (0.01)      | 76 (0.12)     |
|                     | 6S RNA                   | 4 (0.02)         |               | 4 (0.01)      |               |
|                     | Alpha RBS <sup>(3)</sup> | 1 (0)            |               | 2 (0)         |               |
| Unclassified        | SURFY (≥ 10 reads)       | 50 (0.25)        | 2,181 (10.9)  | 186 (0.29)    | 3,060 (4.8)   |
|                     | Others (< 10 reads)      | 2131 (10.6)      |               | 2874 (4.5)    |               |
| Total               |                          | 20,057           |               | 84,194        |               |

(1) Bacterial signal recognition particle RNA.

(2) TPP riboswitch (THI element) .

(3) Alpha operon ribosome-binding site.

先述のメタゲノム解析の結果から、湯野浜温泉源泉水中には非常に興味深い古細菌が多数生息しているようである。しかし、メタトランスクリプトーム解析で得られた塩基配列は、tRNAに関する解析の結果から全てバクテリア由来のものであることが示唆された（3.3.に詳述）。従って、古細菌に由来する転写物の塩基配列は得られていない可能性が高い。古細菌由来の塩基配列が得られなかったことはある意味で残念な結果であるが、裏を返せば湯野浜温泉源泉水中の細胞比率は圧倒的にバクテリアが多いことを示唆しているとも考えられる。16S rRNA遺伝子はドメイン特異的なプライマーを用いて増幅しているため、古細菌の細胞数がバクテリアに比べて極端に少なかったとしても検出することは可能である。

cDNA配列を解析した結果、最終的に88.9%（17,831リード）の塩基配列はtRNA, rRNA, またはそれらのフラグメントであった。0.2%（45リード）の塩基配列のみが既知のnon-coding RNA（bacterial signal recognition particle RNA（Regalia *et al.*, 2002）, 6S RNA（Wassarman *et al.*, 2000）, および既知のRNAエレメント（thiamine pyrophosphate（TPP）リボスイッチ（Winkler

*et al.*, 2002),  $\alpha$  operon ribosome-binding site (Schlax *et al.*, 2001)) であった。近年、ハワイ近郊の海水をサンプルとしたメタトランスクリプトーム解析が行われ (Shi *et al.*, 2009), signal recognition particle RNAや6S RNAなど、本研究で得られたものと類似のRNAが検出されている。また、メタゲノム解析によって得られた様々な環境由来の塩基配列の比較から、多数のリボスイッチが発見された報告もある (Weinberg *et al.*, 2010)。これらの結果から、本研究において上述のようなnon-coding RNA候補が発見されたことは妥当な結果であると考えられる。

残りの10.9% (2,181リード) はここまでの解析で既知のsRNAに分類することができなかったもので、「Unclassified」と表記した (表1)。これらの中にはリード数が少なく何らかの遺伝子の分解産物と考えられるものや、シーケンスエラーの影響で既知の遺伝子群に分類できなかったものも含まれている可能性があるため、信頼性の高い解析を行うためにこれらの中から95%以上の塩基配列が一致する配列は1つにまとめて後の解析を行った。Unclassifiedとなった塩基配列のうち、79.8%にあたる1,574種は1度しかシーケンスされなかったものである。これらは実際に発現していた遺伝子かどうか疑わしい部分もあるが、残りの20.2%にあたる398種は2回以上 (最高で19回) 同じ塩基配列が得られたものである。10回以上シーケンスされた塩基配列について、これらは確かに本サンプルの環境中で発現していた遺伝子と考えられることから、新規機能性non-coding RNA候補としてsmall unique RNAs from Yunohama (SURFY) と名付けた。得られたリード数の多いものから15種のSURFYについて (平均60塩基, 平均GC含量58%) さらに解析を行うこととした。Non-coding RNAは二次構造がそのRNAの機能にとって非常に重要であると言われていることから (Washietl *et al.*, 2005), SURFYについてSfoldを用いて二次構造と自由エネルギー (平均-20 kcal/mol) を予測した。代表的なSURFYの二次構造を図2に示す。また相同性検索の結果、15種のSURFYのうちSURFY03だけは亜硝酸菌*Nitrosococcus halophilus*のelongation factor (EF-Tu) と91%の類似性がみられたが、その他の14種についてはNCBIのデータベースに登録されているものの塩基配列とも相同性がみられなかった。これらのSURFYの機能は今のところ未知であるが、強固な二次構造を形成できる点と、10本以上のリードが得られている点を考慮すると、何らかの機能を持って湯野浜温泉源泉水という環境中で発現している新規機能性non-coding RNAであると言えるだろう。近年、様々な環境中から特徴的なsRNAが発見される例があり (Shi *et al.*, 2009; Weinberg *et al.*, 2010), 特に海洋環境では深さ特異的に観測されるsRNAが見つかったことから (Shi *et al.*, 2009), それらのsRNA遺伝子は環境に適用するために重要な機能を有しているのではないかと考察されている。湯野浜温泉は海岸に位置する温泉であるが、これは世界的に見て珍しい環境である。また本研究で用いたサンプルは地下250~1000mという外界と隔離された環境から得られたことを考慮すると、SURFYはこのような環境に適用するために重要な分子なのではないだろうか。

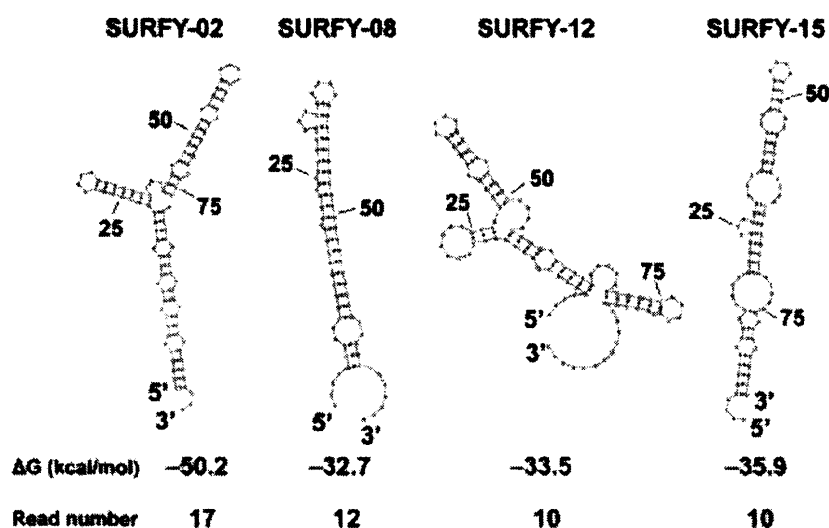


図2：新規機能性sRNA候補の代表例

本研究で得られた新規機能性sRNA候補（SURFY）の中からリード数の多かった4つを代表例として、その塩基配列と二次構造を示した。二次構造と自由エネルギーはSfoldを用いて推定した。

### 3.3. 環境中のtRNAとtRNAフラグメント

湯野浜温泉源泉水中から採取された低分子RNAのうち、71.4%はtRNAおよびそのフラグメントであった（表1）。これらについて詳細な解析を進めるため、まず8,069種（43,092リード）のtRNAを、誘導するアミノ酸ごとに分類した。セレノシステインやピロリジンを誘導するタイプのtRNAは見つからなかったが、その他一般的な20種のアミノ酸を誘導するtRNAは全て本環境から検出することができた。これらのtRNAと類似のtRNAを持つ生物種を特定するためにgenomic tRNA database (GtRNAdb) に登録されているtRNAをデータベースとして相同性検索を行った。その結果、本研究で得られたtRNAの塩基配列はほぼ全てバクテリア由来であることがわかった（図3）。16S rRNA遺伝子の解析から興味深い古細菌が多数見つかったが、この結果から実際に環境中に発現している遺伝子の量（細胞数とおおまかに比例すると考えられる）は圧倒的にバクテリアが多いのだと考えられる。また、多くのタイプのtRNAは80%程度がβ-Proteobacteriaに由来するもので（図3）、このグループに属する微生物が本環境の優勢種であると考えられる。これはバクテリアの16S rRNA遺伝子の解析（図1B）とも矛盾のない結果である。しかし、グルタミン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシンの4種のアミノ酸を誘導するtRNAだけはγ-Proteobacteriaやα-Proteobacteriaに由来すると考えられるtRNAが最も多く、その理由は現在のところ不明である。

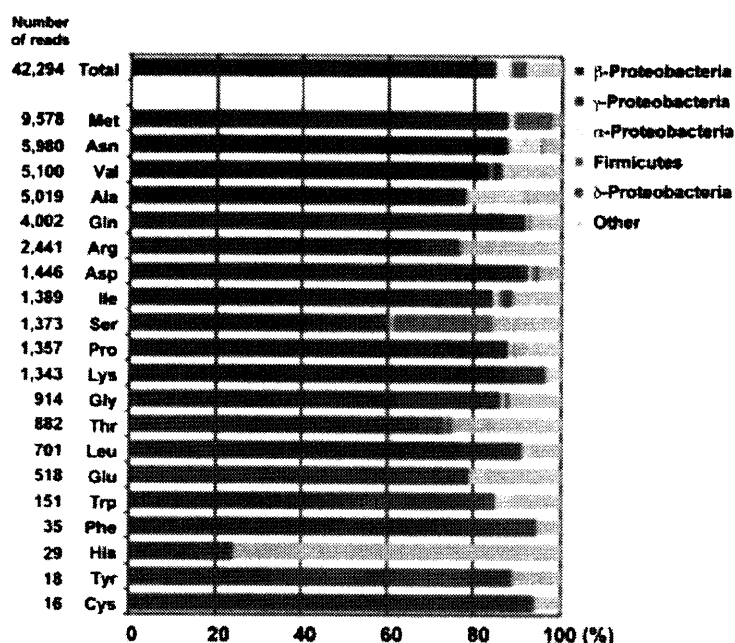


図3：湯野浜温泉源泉水から得られたtRNA

tRNA<sup>Ascen</sup>-SEによってtRNAと判断された42,294リードを誘導するアミノ酸ごとに分類し、その数と最も近縁な分類群を棒グラフで示した。Suppressor tRNA（終止コドンに対応するtRNA）とpseudo tRNAs（tRNA<sup>Ascen</sup>-SEでアンチコドン予測できなかったtRNA）はグラフから除いた。分類群はgenomic tRNA database をデータベースとしてBLASTを用いて推定した。青：β-Proteobacteria, 赤：γ-Proteobacteria, 緑：α-Proteobacteria, オレンジ：Firmicutes, ピンク：δ-Proteobacteria, グレー：その他。

本研究ではクローバーリーフ構造を形成可能なtRNA（成熟型tRNA）だけでなく、そのようなtRNAが分解されて生じたと考えられるtRNAフラグメントの塩基配列も2,063種（4,484リード）得ることができた。これらは本研究で得られた成熟型tRNAの一部と相同な塩基配列であるが、クローバーリーフ構造を形成できない短いDNA断片である。これらはサンプリング時のRNA抽出の過程において、自然分解が起こって生じた可能性もある。しかし、成熟型tRNAのリード数と、それから生じたと考えられるtRNAフラグメントのリード数は全く比例関係に無い（資料不掲載）。もしtRNAの分解が自然に起こったランダムな事象であれば、「たくさん存在するtRNAほどたくさん壊れる」という状況が生じると考えられる。しかし結果はそうになっていないため、本研究で扱うtRNAフラグメントは何らかの能動的なはたらきによって分解されたものであると考えられる。

そこで、この「能動的なはたらき」が何であるか考察するために、得られたtRNAフラグメントに基づいて各tRNAが切断されている位置を数えてみることにした。しかし、成熟型tRNAの中には酷似した塩基配列を持つものが多く、tRNAフラグメントと同じ塩基配列を持つ成熟型tRNAが複数存在するケースも見られた。つまり、あるtRNAフラグメントについて考えた場合に、それがどの成熟型tRNAに由来するか特定することができず、その結果「切断された回数」を数えることができないのである。そこで、そのようなtRNAフラグメントは「由来となりうる成熟型tRNAの候補の数」で1を割った回数分切断されたことにして標準化した（あるtRNAフラグメントに対して、分解される前の成熟型tRNA候補が20種類あった場合、20種の成熟型tRNAそれぞれが0.05回切断されたことにした）。このようにtRNAの切断部位を観察し、tRNAの種類（誘導するアミノ酸）ごとに切断されやすい場所に順位をつけて図に示した（図4）。その結果、多くのtRNAがアンチコドンループ内で切断されている様子が示されたが、これは既存の知見と一致する（Masaki *et al.*, 2002）。

本研究の結果からは、15/16（15塩基目と16塩基目の間：以後同様の表記）というDループ内の位置にもtRNAが切断されやすい部位があることを示している。Ile-tRNA, Lys-tRNA, Asp-tRNA,

Asn-tRNA, Val-tRNAはこの位置で切断されやすいようであり, Lys-tRNAについては切断されやすい場所TOP 3が全てDループ内に存在する. 15/16の位置はtRNAの3次元構造的に表面にむき出しになっている部分であることから, 未知のRNaseがこの位置を狙って切断している可能性を想像することができる.

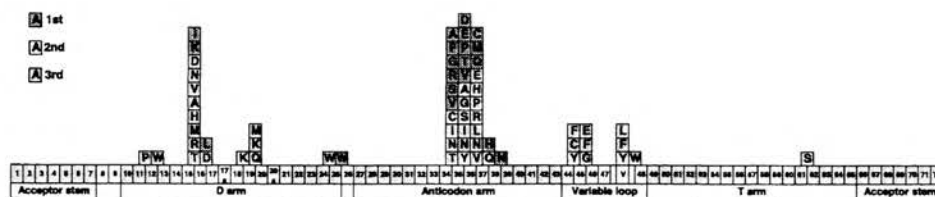


図4: tRNAフラグメントの切断部位のまとめ

断片化されたtRNAの切断部位を, tRNAの種類(誘導するアミノ酸)ごとに集計してマッピングした. 1~72の数字は教科書的なtRNAの基本構造(Marck *et al.*, 2002)に基づいて塩基位置を示している. バリアブルアームは「●」で示した. 数字の背景色がグレーの塩基はステムを形成するもの, 白の塩基はループ部位のものである. アルファベットはtRNAが誘導するアミノ酸を略号で示したものであり, その背景色は切断されやすい部位の上位3ヶ所の順位を示している(ピンク: 1位, 黄色: 2位, 緑: 3位). 例えば34と35の間に位置するピンクの「A」は, アラニンを誘導するtRNAは34塩基目と35塩基目の間で切断されていたものが最も多かったことを示している. アスパラギンとフェニルアラニンを誘導するtRNAはそれぞれ同率3位が2ヶ所あったため, 緑色のボックスが2ヶ所ある. チロシンを誘導するtRNAは断片化された塩基配列が2種類しか見つからず順位をつけられなかったため, その位置を白背景で示している.

ここまでの結果はtRNAを誘導するアミノ酸ごとに分類して切断位置を集計したものであるが, さらに詳細な解析としてtRNAをアンチコドンごとに分類してその切断位置を集計した(図5). その結果, 非常に興味深いことに, 34/35で切断されるtRNAの34塩基目(アンチコドンの1塩基目)はプリン塩基(AまたはG)になっており, アンチコドンループ以外で切断されやすいtRNAの34塩基目はピリミジン塩基(CまたはU)になっている. この結果から想像するに, tRNAを切断する酵素は複数存在し, tRNAのアンチコドンの1塩基目を見分けて切断の様式を使い分けている可能性がある. 先の15/16を切断するRNaseと共にこれを行なっているヌクレアーゼは不明なままであるが, 湯野浜温泉源泉水中の最優勢種であるβ-Proteobacteriaに属する新規微生物が保有している酵素であると考えられる.

|                       |           | 2nd base of anticodon |                  |           |           |   |
|-----------------------|-----------|-----------------------|------------------|-----------|-----------|---|
|                       |           | A                     | G                | T         | C         |   |
| 1st base of anticodon | A         | AAG -                 |                  | ATG 37/38 | ACG 34/35 | A |
|                       |           |                       | AGC 35/36        |           |           | G |
|                       |           |                       |                  |           |           | T |
|                       |           |                       |                  |           |           | C |
| G                     | GAA 34/35 | GGA 35/36             | GTA -            | GCA 36/37 |           | A |
|                       | GAG 34/35 | GGG 36/37             | GTG 36/37        | GCG 34/35 |           | G |
|                       | GAT 15/16 | GGT 35/36             | GTT 38/39        | GCT 34/35 |           | T |
|                       | GAC 34/35 | GGC 34/35             | GTC 35/36        | GCC 34/35 |           | C |
| T                     |           | TGA 35/36             | TTA 35/36        |           |           | A |
|                       | TAG V     | TGG 36/37             | TTG 36/37        | TCG 37/38 |           | G |
|                       |           | TGT 15/16             | TTT 15/16        | TCT 57/58 |           | T |
|                       | TAC 15/16 | TGC 35/36             | TTC 35/36        | TCC 35/36 |           | C |
| C                     | CAA -     | CGA V                 | CTA V            | CCA 35/36 |           | A |
|                       | CAG 16/17 | CGG 35/36             | CTG 37/38        | CCG 15/16 |           | G |
|                       | CAT 36/37 | CGT 35/36             | CTT 19/20, 57/58 | CCT 15/16 |           | T |
|                       | CAC 15/16 | CGC 35/36             | CTC 45/46        | CCC 55/56 |           | C |

図5：アンチコドンごとに示したtRNAの切断部位  
tRNAが断片化されていた位置をアンチコドンごとに集計し、最も多く検出された位置を示した。「V」はバリアブルアーム中で切断されていたことを示す。34/35で切断されていたものは青で、アンチコドンアーム以外で切断されていたものはピンク色で示した。断片化されたtRNAが見つからなかったものは空欄、見つかったtRNAフラグメントの数が少なく順位を議論できないと判断したものは「-」で示した。

## 結論

本研究では湯野浜温泉源泉水という環境を対象に研究を行い、多数の新規難培養性微生物を発見した。特に古細菌については、これまで酸性の環境のみで発見されていたARMANグループの古細菌を世界で初めてアルカリ性の環境から発見したことで、様々な環境を対象に難培養性微生物の研究を進めていくことの重要性を示すことができたと考えている。

また、バクテリアにおけるtRNAの分解に注目し、Dループ内の新規切断部位を提示したほか、tRNAの種類によって切断されやすい部位があることを報告した。本研究ではファージの感染のような特殊な条件を設定すること無く、環境中に存在するtRNAをまとめて観察した点と、全てのタイプのtRNA分解を同時に観察した点が新しく、バクテリアにおけるtRNA分解に関する研究をこれまでに無い規模で示したと言える。

また、本研究ではSURFYのような多数の新規sRNA候補を発見することができたが、これらは地中の温泉水中という環境で生物が生育するために必要な遺伝子である可能性がある。しかし、メタトランスクリプトーム解析ではこれらの生物学的な機能を明らかにすることはできず、この点については今後の研究および研究手法の発達が期待されるものである。

本研究によって得られた新規知見は、環境中の微生物およびそのRNAを観察したことで得られたもので、モデル生物を用いた研究からは報告されていなかった現象を見出すことができた。従って、地球上にあふれている難培養性微生物にも目を向け、様々な研究を進めていくことが重要であることをここに改めて記したいと思う。

なお、本研究の成果は米国微生物学会誌であるApplied and Environmental Microbiologyに掲載されたものである (Murakami *et al.*, 2012)。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、金井昭夫教授と藤島皓介博士には学部時代から大変お世話になりました。また、修士課程では本ダイジェストに記載できなかった研究も行っており、福田真嗣特任准

教授，中西裕美子博士，池田幸樹博士にも大変お世話になりました。馬場藤貴君，石井千晴さん，山本優理さん，亀崎圭太君，菅野奈々さん，石堂未夕さんとは研究以外の時間を共有することも多く，皆さんのお陰で修士課程における鶴岡での生活を満喫することができたと思っています。また，このような充実した研究生活を送ることができる素晴らしい環境をご提供下さっております富田勝教授に心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- Arumugam, M., *et al.* 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-180.
- Baker, B. J., *et al.* 2006. Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. *Science* 314:1933-1935.
- Baker B. J., *et al.* 2010. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:8806 – 8811.
- Barns, S. M., R. E. Fundyga, M. W. Jeffries, and N. R. Pace. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1609-1613.
- Bomar, L., M. Maltz, S. Colston, and J. Graf. 2011. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. *MBio* 2:e00012-00011.
- Emara, M. M., *et al.* 2010. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem* 285:10959-10968.
- Gantner, S., A. F. Andersson, L. Alonso-Saez, and S. Bertilsson. 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J Microbiol Methods* 84:12-18.
- Gottesman, S. 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* 21:399-404.
- Grice, E. A., *et al.* 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324:1190-1192.
- Haiser, H. J., F. V. Karginov, G. J. Hannon, and M. A. Elliot. 2008. Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* 36:732-741.
- Hall, J. R., *et al.* 2008. Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Appl Environ Microbiol* 74:4910-4922.
- Inskeep, W. P., *et al.* 2010. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. *PLoS One* 5:e9773.
- Jost, D., A. Nowojewski, and E. Levine. 2011. Small RNA biology is systems biology. *BMB Rep* 44:11-21.
- Jurgens, G., and A. Saano. 1999. Diversity of soil Archaea in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning. *Fems Microbiology Ecology* 29:205-213.
- Kato, M., X. Chen, S. Inukai, H. Zhao, and F. J. Slack. 2011. Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*. *RNA* 17:1804-1820.
- Kawano, M., A. A. Reynolds, J. Miranda-Rios, and G. Storz. 2005. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33:1040-1050.
- Kvist, T., B. K. Ahring, and P. Westermann. 2007. Archaeal diversity in Icelandic hot springs. *FEMS Microbiol Ecol* 59:71-80.
- Lee, Y. S., Y. Shibata, A. Malhotra, and A. Dutta. 2009. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* 23:2639-2649.
- Marck, C., and H. Grosjean. 2002. tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* 8:1189-1232.
- Masaki, H., and T. Ogawa. 2002. The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie* 84:433-438.
- Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston, and E. F. DeLong. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* 63:50-56.
- Miyoshi, T., T. Iwatsuki, and T. Naganuma. 2005. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol* 71:1084-1088.
- Murakami, S., Fujishima, K., Tomita, M., Kanai, A. 2012. Metatranscriptomic analysis of microbes in an Oceanfront deep-subsurface hot spring reveals novel small RNAs and type-specific tRNA degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1015-1022.
- Nunoura, T., *et al.* 2005. Genetic and functional properties of uncultivated thermophilic crenarchaeotes from a subsurface gold mine as revealed by analysis of genome fragments. *Environ Microbiol* 7:1967-1984.
- Nunoura, T., *et al.* 2011. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res* 39:3204-3223.
- Ogawa, T., S. Inoue, S. Yajima, M. Hidaka, and H. Masaki. 2006. Sequence-specific recognition of colicin E5, a tRNA-targeting ribonuclease. *Nucleic Acids Res* 34:6065-6073.
- Regalia, M., M. A. Rosenblad, and T. Samuelsson. 2002. Prediction of signal recognition particle RNA genes. *Nucleic Acids Res* 30:3368-3377.
- Schlax, P. J., K. A. Xavier, T. C. Gluick, and D. E. Draper. 2001. Translational repression of the *Escherichia coli* alpha operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. *J Biol Chem* 276:38494-38501.
- Shi, Y., G. W. Tyson, and E. F. DeLong. 2009. Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column. *Nature* 459:266-269.
- Shinhara, A., *et al.* 2011. Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 12:428.
- Takai, K., and K. Horikoshi. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152:1285-1297.
- Takai, K., D. P. Moser, M. DeFlaun, T. C. Onstott, and J. K. Fredrickson. 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl Environ Microbiol* 67:5750-5760.

- Tang, T. H., *et al.* 2002. RNomics in Archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 30:921-930.
- Thompson, D. M., C. Lu, P. J. Green, and R. Parker. 2008. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* 14:2095-2103.
- Venter, J. C. *et al.* 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66-74.
- Warnecke, F., and M. Hess. 2009. A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. *J Biotechnol* 142:91-95.
- Washietl, S., I. L. Hofacker, M. Lukasser, A. Huttenhofer, and P. F. Stadler. 2005. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol* 23:1383-1390.
- Wassarman, K. M., and G. Storz. 2000. 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* 101:613-623.
- Weinberg, Z., J. Perreault, M. M. Meyer, and R. R. Breaker. 2009. Exceptional structured noncoding RNAs revealed by bacterial metagenome analysis. *Nature* 462:656-659.
- Weinberg, Z., *et al.* 2010. Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biol* 11:R31.
- Wilms, R., *et al.* 2006. Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Appl Environ Microbiol* 72:2756-2764.
- Winkler, W., A. Nahvi, and R. R. Breaker. 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419:952-956.
- Xie, W., *et al.* 2011. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *ISME J* 5:414-426.