熱水環境における微生物群集の遺伝子的解析

Genomic Analysis of microbial Community in the Hydrothermal Environment

河原林 裕[1]
yutaka kawarabayasi[1]

[1] 産総研、糖鎖工学
[1] RCG, AIST

今までに様々な微生物が、多くの熱水環境から見出されてきている。しかし、それらの環境に生息する微生物の内のほんの一部が単離されているに過ぎず、培養が可能なものはほんの 1%程度に過ぎないと言われている。それらの環境に生息している微生物は産業的にも有用な機能を数多く有している可能性が高い。これまで、それらの微生物の存在や系統位置は、主に PCR で増幅されたリボソーム DNA 領域の塩基配列を比較解析することで推定されてきた。しかし、PCR による増幅の際には、塩基配列に変異が導入される場合が有るので、PCR 増幅を行わず直接クローニング・塩基配列解読を行うことにより、熱水環境中に存在する微生物が有する DNA の正確な塩基配列を入手する事を計画した。

現在までに、南東太平洋(S-EPR)に存在する RM24 地点の低温熱水より得られた環境 DNA、水曜海山のボーリング孔より噴出した 300℃の熱水及び約 80℃の熱水より得られた環境 DNA、九州・別府温泉の白池地獄より得られた環境 DNA を材料として直接構築した各ライブラリーについて一定数のクローンの塩基配列解読を行ってきた。また、九州霧島温泉郷・東北宮城県鬼首地域の源泉地域から採取した土壌サンプルから DNA の回収に取り組むと共に、16S rDNA 領域の増幅・塩基配列解読による微生物群集構造の解析も行ってきた。

水曜海山において噴出した高温熱水を濾過して得た混合微生物サンプルから調製した DNA からは、ライブラリーを効率的に作成することが出来なかった。これは濾過採取時に、熱水中に含まれる重金属等が析出した微粒子の多くが、微生物と共にフィルターにトラップされてしまうのでライブラリー構築を阻害しているのではないかと考えている。一方、同じ水曜海山での 80℃程度の熱水を濾過して得た混合微生物サンプルから調製した DNA 由来のライブラリー及び S-EPR の RM24 に噴出していた低温熱水を濾過して得た混合微生物サンプルから調製した DNA 由来のライブラリーは効率よく構築することが出来た。

まず、各ライブラリーから無作為に選択した幾つかのクローンの両末端の塩基配列を解読し、既存のデータベースに登録されている塩基配列と比較した。その結果、今回解読した塩基配列中には既知の塩基配列は存在しない事が判明した。そこで、各クローンが有する環境由来 DNA 断片の全長塩基配列をプライマー歩行法で決定していった。水曜海山の 80℃の熱水から構築したライブラリー由来の 49 クローン、S-EPR・RM24 地点の低温熱水から構築したライブラリー由来の 27 クローンについて全長塩基配列を決定・解析を行った。S-EPR・RM24 地点由来クローンの中には、ORF が全く見出されないクローンや４塩基の配列が繰り返して見出されるクローンなど真核生物の塩基配列に特徴が類似しているものが幾つも見出されてきた。一方、水曜海山の 80℃の熱水から構築したクローンでは、大部分のクローンで ORF が容易に見出されてきた。

また、九州・別府・白池地獄由来サンプルより調製した DNA からも、ライブラリーを効率よく構築することが出来たので、55 クローンについて全長塩基配列を解読したところ、ほぼ全てのクローンで ORF を容易に見出すことが出来た。別府・白池地獄と水曜海山 80℃熱水由来 DNA から構築したクローンからは、幾つの完全な Aminoacyl-tRNA synthetase 遺伝子が見出されてきた。この遺伝子はアミノ酸を tRNA に結合させる酵素をコードし、全ての生物が有している遺伝子なので、配列の比較から元の微生物の系統的位置を推定する事が出来る。その結果、別府白池地獄からは、新規古細菌及び新規バクテリアの存在が、水曜海山からも新規バクテリアの存在が示唆された。

以上のような解析結果から、核酸分子の塩基配列や特異的領域を指標とした PCR 解析によって、微生物の群集解析の解析に資する様々な情報を得られる事を示すことが出来た。