

超好熱菌も暑がる!?

-大規模データから熱応答システムを紐解く-

岡部晴子^{1,2*} 金井昭夫^{1,2,3**}

¹慶應義塾大学 先端生命科学研究所

²慶應義塾大学 環境情報学部

³慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

*t17162ho@sfc.keio.ac.jp, **akio@sfc.keio.ac.jp

要旨

超好熱性アーキアのパイロコッカス フリオサスは、100℃近い高温環境を好み生息しているにも関わらず熱ストレス応答機構を持つことが既知である。しかし本アーキアの熱ショック時におけるタンパク質の挙動や、細胞全体の生理応答については未解明の部分が多い。本研究は、本アーキアにおける熱ショック応答機構の全体像の解明を目的とした。90℃で培養した培地を煮沸状態にして熱ショックをかけ、タンパク質の継続的、網羅的同定と定量を行った。結果、同アーキアのタンパク質のうち80%以上が極めて高い熱安定性をもつことが明らかとなった。一方、機能未知タンパク質PF0624は大幅に増加し、煮沸後45分には熱ショック前の12倍以上の量になっていた。PF0624はヒストン様のDNA結合性ドメイン配列を有しており、高温下でのDNAの開裂を防いでいる可能性がある。本発表では、熱ショック時における遺伝子発現解析を含め、他のユニークなタンパク質の挙動についても解説したい。

キーワード: 分子生物学、超好熱性アーキア、バイオインフォマティクス、プロテオーム、トランスクリプトーム

1 背景

1.1 超好熱性微生物 パイロコッカス フリオサス

パイロコッカス フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)は、1980年代にイタリア、ヴェルカーノ島付近の硫黄を含む海底熱水噴出孔から発見されたアーキアである(図1)。Pyrococcusの語源はPyro(炎)とcoccus(球形の菌)であり、炎の球のようなアーキア、という意味合いで名付けられた。形もさることながら、本アーキアは増殖可能温度が70~103℃と非常に高温であることが知られており、酸素の無い環境を好み生息している。

されている場所である。熱水噴出孔のような高温環境に生息する微生物の多くは、地球生命における系統樹の根元、つまり生命の起源に近い事が既知であり、パイロコッカス フリオサスも系統的に古い生物である事が先行研究より知られている。また、アーキアは生命の基盤となる機構を担う分子が真核生物と類似していることが知られており、原始生命および原始真核様生物の様子を反映している可能性が高い。生命の進化史を考える上で、本アーキアの持つ分子機構を明らかにする意義は大きいと言える。

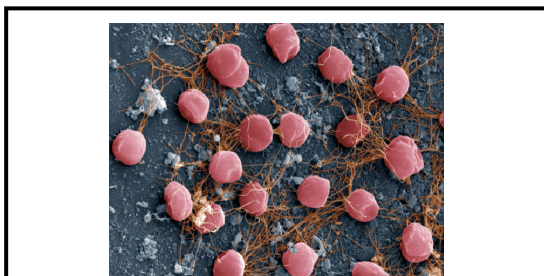


図 1:超好熱性アーキア パイロコッカス フリオサスの電子顕微鏡写真

赤い丸が菌体、橙の線状の物質は鞭毛である。

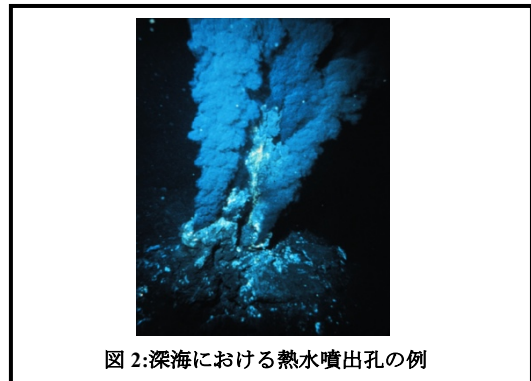


図 2:深海における熱水噴出孔の例

また本アーキアの見つかった熱水噴出孔(図2)は、地球における原子生命の誕生の地として強く支持

1.2 パイロコッカス フリオサスの熱応答機構

本アーキアは常に超高温環境に生息しているにもかかわらず、通常時の細胞機構とは異なった熱ショック応答機構を持つことが知られている。タンパク質レベルでは、熱ストレス下でタンパク質を保護、修復するsHSP(small Heat Shock Protein)やサーモソームが増加することが既知である。

さらに、パイロコッカス フリオサスは熱ショック時に分子量の小さい有機物を細胞内に蓄積させることが知られており、この合成に関わるMyo-inositol-1-phosphate synthaseタンパク質が増加する。本生物において、これらの物質はmRNAレベル、代謝レベルで熱ショック時に増加することが先行研究にて確認されている。

1.3 本研究の目的

上記の通り、本アーキアでは熱ショック時に特定のタンパク質が増加することがわかっており、熱ショック時のmRNA、代謝物の変動に関して網羅的解析がなされている。しかしながらタンパク質の網羅的解析は行われておらず、また産生されたmRNA量とタンパク質量は必ずしも相関しないため、熱ショック時におけるタンパク質の挙動の全体像は未解明である。

本研究では、網羅的タンパク質、mRNAデータを用いた解析を行うことにより、超好熱性アーキアの熱ショック時における遺伝子の挙動を解明することを目的とする。

2 方法

2.1 データ取得

本解析では金井、佐藤によって作成されたサンプルを解析対象とした(図3)。サンプル作成において、まずパイロコッカス フリオサスを90°Cで培養し、対照群のサンプルを採取した。90°Cから温度を上げ始め102°C(煮沸)に達してから15、30、45分のタイムコースごとにサンプルを採取した。

その後採取された各サンプルについて、プロテオーム解析を行った。プロテオーム解析は、サンプル内の細胞が持つタンパク質を網羅的に解析する手法である。

今回はサンプルを産総研の足達博士に委託し、プロテオームのデータ取得および解析の前処理を実施している。

今回のサンプリングでは、927のタンパク質における発現変動データを取得することができた。

また同サンプルについて、トランスクリプトーム解析を行った。本解析は、サンプル内に存在するmRNAを網羅的に解析する手法である。mRNAの配列決定をするNGS解析を外部委託し、得られたリードについてマッピングおよび定量を行った。結果、2,070の遺伝子における変動データを取得することができた。

最後に、同サンプルを用いて低分子RNA解析を実施した。低分子RNAとはタンパク質をコードしないRNAのうち、長さがわずか20~30塩基の分子を指す。また低分子RNAは、様々な生物学的プロセスの調整で重要な役割を担っていることが近年判明し、急速に研究が進展している。この低分子RNAについて、サンプル内の配列決定を外部委託し、得られた配列データについて低クオリティ配列除去後に、マッピングおよび定量化を行った。結果、52の低分子RNAにおける変動データを取得することができた。

2.2 発現変動比を用いた分類

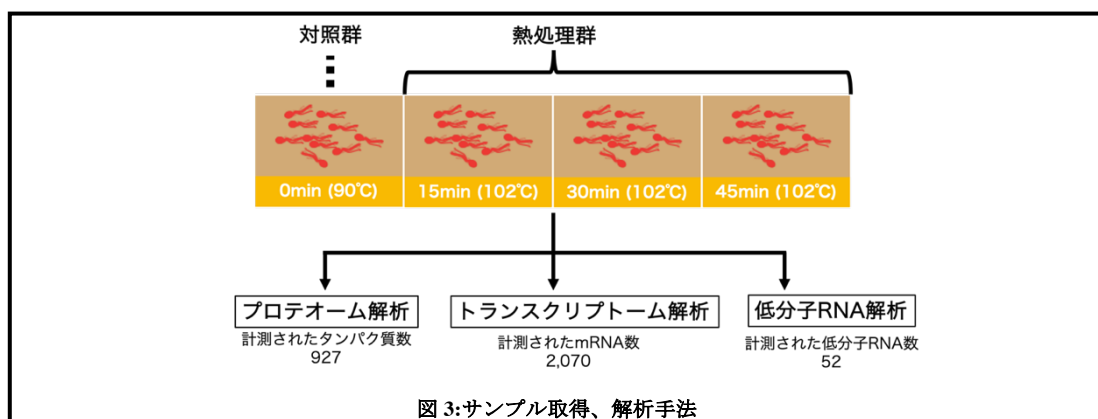
各タンパク質の傾向について、発現変動比を用いて増加、減少、不変に分類した。

本解析における発現変動比とは、90°Cでのタンパク質量を1としたときの15、30、45分におけるタンパク質量である。発現変動比は、各タイムポイントにおけるタンパク質存在量/対照群におけるタンパク質存在量で求められる。今回は発現変動比が2より大きいタンパク質は増加、1/2以上かつ2以下であるタンパク質は不変、1/2より小さいタンパク質は減少傾向を示すと定義している。

3 結果

3.1 プロテオーム、トランスクリプトーム解析結果

タンパク質における網羅的機能解析を行った結果、計測された全927タンパク質中、80%以上のタンパク質が全時間通して熱ストレス時に不変であった。



金井らの研究(未発表)から、同じ原核生物である大腸菌は熱ストレス時に50%以上のタンパク質が減少傾向を示すことが既知であり、これと比較すると本アーキアは熱ストレスに対し極めて高い安定性をもつことが判明した。

mRNAにおける網羅的機能解析を行った結果、全時間を通して、増加傾向と不変のmRNA存在比率はおおよそ1:1であり、減少傾向を見せるmRNAの数は極端に少なかった。また、減少傾向を示すmRNAについて確認を行ったところ、全時間通して6割以上を代謝関連機能が占めており、セントラルドグマ関連は1割にも満たないことが判明した。

3.2 機能未知タンパク質PF0624

プロテオーム解析の結果、15、30、45分の全時間において最も発現変動比が高かったのは、機能未知タンパク質PF0624であった(図4)。パイロコッカスフリオサスにおいて代表的なタンパク質である、酸化還元酵素のSulphydrogenase 1 subunit alphaやDNA複製で重要な役割を担うDNA polymerase sliding clampと比較すると、その増加が顕著であることが確認できた。さらに、これまで熱ショック時に増大する代表的なタンパク質とされていたsHSPが45分までに10倍増加しているのに対し、PF0624は約12倍とより大きな幅で増加していることがわかった(図5)。また、PF0624はトランスクリプトームレベルでも増加が確認された。

PF0624についてより詳細に調べるべく、他タンパク質との関係についてSTRINGを用いて確認を行った。結果、PF0624はsHSPやMyo-inositol-1-phosphate synthase等の熱ショック応答との関連が既知であるタンパク質とともに、Phrという転写制御因子によって制御を受けていることがわかった(図6)。Phrは通常時、プロモーター領域(DNAからRNAを合成する段階の、開始に関与する領域)に結合することで、mRNAの合成を抑制している。しかし熱ショックがかかると、Phrのタンパク質構造が変化することでプロモーター領域に結合できなくなり、mRNA合成の抑制が解除される。これによりPF0624やsHSPはmRNA量が増加し、mRNAからタンパク質が合成されることでタンパク質量も増加するのである。さらにPhrによって、mRNAだけでなく特定の低分子RNAも制御される可能性があることが先行研究より判明した。挙げられた低分子RNAはPF_s016とPF_s041であり、今回行った低分子RNAの結果ではどちらも熱ショック時の増加が確認された。

続いて、Phyre²を用いて立体構造からタンパク質機能の類似性解析を行った。本解析を行うことにより、タンパク質のアミノ酸配列やmRNA配列など、いわゆる一次元的な解析では確認できない類似性を見出すことができる。その結果、以下の立体構造を取ることを推定し(図7)、ヒストンに似た機能を持つ可能性が示唆された。

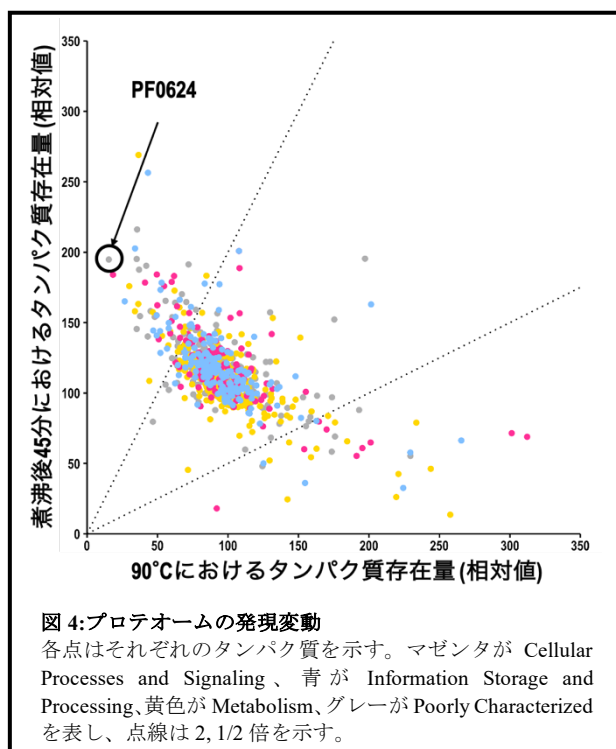


図4:プロテオームの発現変動

各点はそれぞれのタンパク質を示す。マゼンタが Cellular Processes and Signaling、青が Information Storage and Processing、黄色が Metabolism、グレーが Poorly Characterized を表し、点線は 2, 1/2 倍を示す。

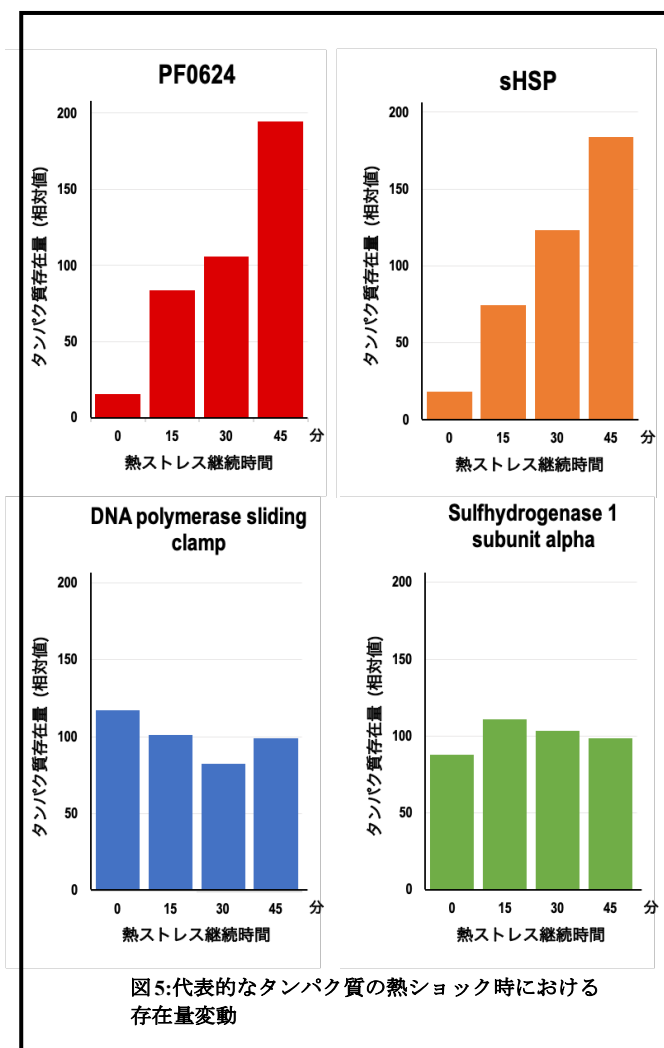
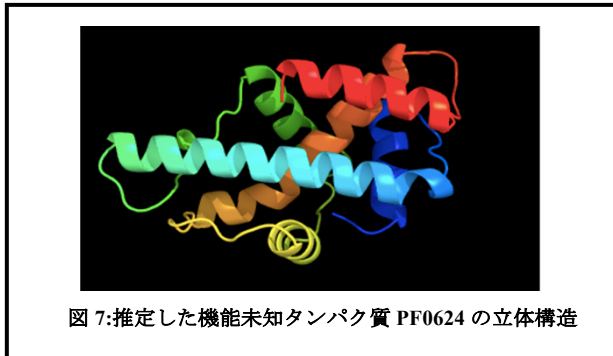
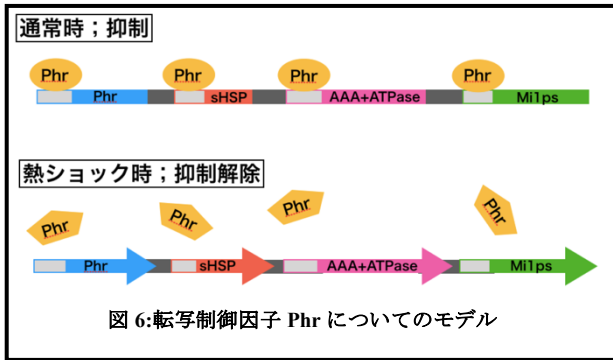


図5:代表的なタンパク質の熱ショック時における存在量変動

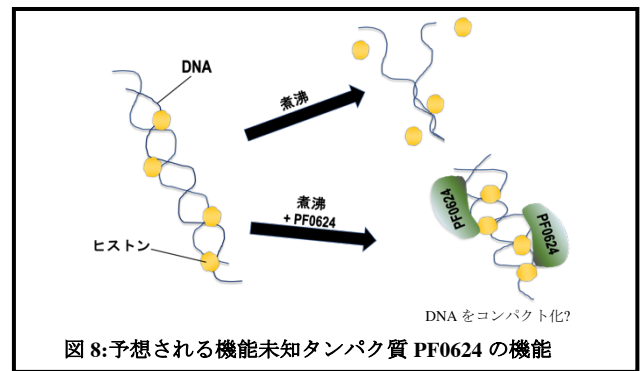


4 考察・展望

プロテオーム解析結果より、パイロコッカス フリオサスは熱に対し極めて高い安定性をもつことが示唆された。また、トランスクリプトーム解析の結果より、熱ショック時には減少傾向を示す遺伝子が熱ショック継続時間に関わらず少ないことが判明した。さらに、減少傾向を見せた代謝関連のタンパク質について詳細を確認したところ、特にエネルギー代謝に関わる遺伝子が偏って減少したことがわかった。この結果から、熱ショック時にはエネルギー代謝関連の一部の転写が抑制されやすくなる可能性が考えられた。

機能未知タンパク質PF0624における確認では、熱ショックによるタンパク質量の大幅な増加やPhrによる転写制御より、PF0624が熱ストレス応答に関与する可能性が強く示唆された。また、Phyre²を用いたタンパク質立体構造の類似性解析から、PF0624はヒストンに似た立体構造を持つことが推定された。しかしながら本アーキアにおけるヒストンは全長67アミノ酸であるのに対し、PF0624は全長153アミノ酸であり、長さに2倍以上の差異があった。以上より、PF0624は熱ストレス時に、ヒストンによるゲノムの保護をより強固にする役割を果たす可能性が考えられる(図8)。本仮説の実証のため、卒業論文執筆までにPF0624の機能を実験的に確認したい。

最後に、低分子RNAの変動データをNGS解析により取得、データ成形済みである。本発表には間に合わなかったが、卒業論文では今回報告した解析結果と合わせて考察を行いたい。



5 謝辞

この研究を支援、指導してくださった、アドバイザーの三浦昌浩さん、産総研 足達俊吾先生、森大博士、佐藤朝子さん、永田祥平さん、玉木聡志博士、斎藤元文さん、鶴巻萌さん、森田鉄兵さん、RNA グループの皆様、富田勝教授、金井昭夫教授に、この場をお借りし感謝申し上げます。また、本研究は山岸学生プロジェクト支援制度の助成を受けたものである。

6 参考文献

- Akanuma, S., Yokobori, S., Nakajima, Y., Bessho, M. and Yamagishi, A. (2015) Robustness of predictions of extremely thermally stable proteins in ancient organisms. *Evolution*, 69, 2954–2962.
- Keese AM, Schut GJ, Ouhammouch M, Adams MWW, Thomm M. Genome-wide identification of targets for the archaeal heat shock regulator phr by cell-free transcription of genomic DNA. *J Bacteriol.* 2010. Mar 1;192(5):1292–8.
- Shockley KR, Ward DE, Chhabra SR, Connors SB, Montero CI, Kelly RM. Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Apr 1;69(4):2365–71.
- Olsen GJ, Woese CR. Archaeal genomics: an overview. *Cell*. 1997 Jun 27;89(7):991–4.
- Kao CC, Lieberman PM, Schmidt MC, Zhou Q, Pei R, Berk AJ. Cloning of a transcriptionally active human TATA binding factor. *Science*. 1990 Jun 29;248(4963):1646–50.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun 1;87(12):4576–9.
- Bezdek JC, Ehrlich R, Full W. FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm. *Comput Geosci.* 1984 Jan 1;10(2–3):191–203.
- McCord JM, Keele BB, Fridovich I, Adams MWW. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 May 6;68(5):1024–7.
- Fiala G, Stetter KO. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch Microbiol*. 1986 Jun;145(1):56–61.