

2020 年度 教育奨励基金「学習・研究奨励金」最終報告

深海好塩性細菌 *Halomonas* 属種の 完全なゲノム配列取得

環境情報学部 2 年

五十嵐 水月

1 研究概要

Halomonas 属は、好塩性もしくは耐塩性を持つ、グラム陰性、好気性細菌の属である。この属に含まれる種は通常、中程度の好塩性で3~15%(w/v)のNaCl濃度を好み、世界中の高塩分濃度環境に生息している。また、pH9.0を超える塩基性環境下でも生育できる種が多い(Kim *et al.* 2013)。

近年、この極限環境微生物に対する産業利用的価値が高まっており、特に深海に生息する *Halomonas* 種について、海底に蓄積する様々な廃棄物の分解機能を有している種が存在することが期待されるが、深海 *Halomonas* 種のゲノムはいまだに数例しか知られていない。大西洋中央海嶺の熱水噴出孔付近に生息するエビから単離された *Halomonas profundus* (以下 *H. profundus*)は、研究所環境下でポリヒドロキシアルカン酸(PHA)として知られている熱可塑性樹脂を生成することが可能である(Simon-Colin *et al.* 2008)。 *Halomonas* 種、特に深海 *Halomonas* 属種のさらなる理解に繋げることを目的に、我々は *H. profundus* の高品質なコンプライトゲノム配列を取得する作業を行なっている。

2 実験手法

フランス IFREMER 研究所から頂いた *H. profundus* 株を培養し、生育した細胞からDNAをなるべく断片化させずにゲノムDNAを数日かけて抽出する。その後、ゲノムDNAの配列ライブラリーを整え、DNAを長鎖のまま検出可能であるMinIONデバイスによるNanoporeシーケンス法(Oxford Nanopore Technologies)と、断片化したDNAを両側から読むIllumina Paired-End 150bpシーケンス法の両方でDNAのシグナルを読み取る。Nanopore法では長い断片を読み取れ

るが、シーケンスのエラー率がIllumina法より高い(Kono and Arakawa 2019)。そのため、その二種類のデータを組み合わせることで、ゲノムDNAにコードされている遺伝情報を途切れさせることなくゲノム配列のアセンブリを得る。具体的には、Nanopore法で得た長鎖のDNA配列データとIllumina法で得られた短鎖のDNA配列データとをコンピューター上で照らし合わせ、Nanopore法による長鎖DNA配列データのエラーを補完し、質の高い *H. profundus* の完全なゲノム配列データの構築を行う。

3 研究経過報告

3.1 *H. profundus* のゲノムDNA抽出

H. profundus のDNAを高い品質と、10,000塩基対以上という長い断片の状態では抽出することができた(図1,図2)。

図2は、抽出されたDNA量と質を評価するために使用した、微量分光計による *H. profundus* のDNA評価結果である。

DNAは主に260nmの波長の光を吸収する。260nm波長におけるabsorbanceの値が高くなっており、DNAをしっかりと抽出できていることが示されている。抽出されたDNAサンプルの濃度は57.9ng/μlであり、溶媒100μlに溶けているため合計5.8μgほどのDNAを抽出することに成功した。

抽出されたDNAの純度を評価する指標である「260/280」及び「260/230」は、後のDNA library作成で要求されている

「260/280」の値が1.8以上、「260/230」の値が2.0以上必要だという条件を満たしており、純度の高い状態でDNAを抽出することができた。

3.2 *H. profundus* の Nanopore 法用 DNA ライブラリー作成

ゲノム配列データ取得の際、機器が効率よく DNA 配列を読み取れるように DNA ライブラリーを調整する必要があるため、その作成を行なった。しかし、ライブラリー調整後の DNA データ取得の際に、DNA シーケンサーの状態が良いにも関わらずデータ取得量が少ない事態となったため、一度実験を中断した。DNA ライブラリー調整時に *H. profundus* の DNA を喪失している疑いがあったため、DNA 濃度を調べながらも一度 DNA ライブラリー調整を行ったところ、作業途中でほぼ全ての *H. profundus* の DNA を失っていることが分かった。はじめ総量 1500ng 存在した *H. profundus* の DNA が、最終的に約 2.3ng まで減少しており、この状態では十分なデータが得られない(対して、以前問題なく Nanopore 法によりゲノムデータを取得した *Halomonas titanicae* のライブラリー調整時の最終 DNA 総量は 675ng であった)。

DNA ライブラリー調整中に DNA を紛失してしまった原因として、使用した *H. profundus* の DNA 断片の長さが長すぎた可能性がある。今後は、*H. profundus* の詳細な DNA 断片長を計測して、成功した *H. titanicae* の DNA 断片長と比較し、DNA をさらに細かい断片に分けて再度実験を行う予定である。

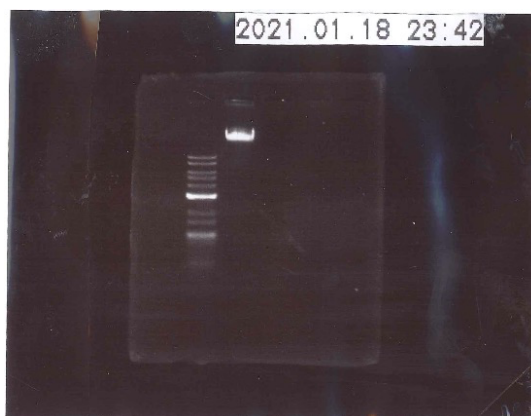


図 1. 電気泳動の結果

左レーンが DNA はしご、右レーンが *H. profundus* の抽出ゲノムを示している。*H. profundus* の DNA バンドが出現した位置が、DNA はしごで測れる 10,000bp の DNA 断片の大きさを超えている。

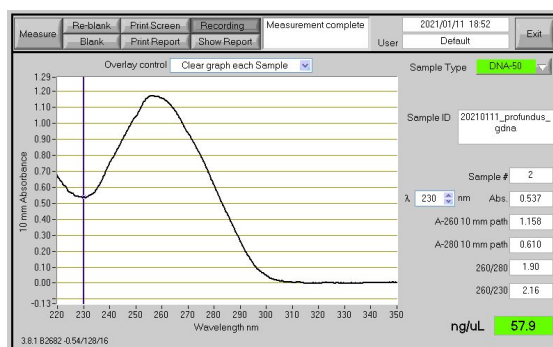


図 2. 抽出した *H. profundus* のゲノム DNA に対する微量分光計による評価結果

グラフの横軸がゲノム DNA サンプルに照射された光の波長を、縦軸が照射された光が吸収された度合いを示している。“ng/μl”の値は DNA サンプルの DNA 濃度を表している。