

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04490

研究課題名(和文)好熱菌ウイルス由来の有用酵素の開発

研究課題名(英文)Development of useful enzymes from thermophilic viruses

研究代表者

大島 敏久(OHSHIMA, Toshihisa)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：10093345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：好熱性ウイルス(ファージ)は、安定性に優れた耐熱性のウイルス由来の酵素を生産でき、産業上の有効利用が期待できる。本研究では、宿主である細菌を特異的に宿主とする好熱性ウイルスを2種類分離に成功し、特徴を明らかにした。

その結果、土壌から分離した好熱菌*Bacillus thermolactis* OIT60-9-2菌と、それを宿主とするCaudovirales科に属する新規好熱性ウイルスの分離に成功した。またシイタケ腐敗菌の常温性*Pseudomonas tolaasii*を宿主とするMyoviridae科に分類される新規好熱性ウイルス OC1を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高温(50℃以上)で増殖する好熱菌を宿主とするウイルス(ファージ)、および常温菌を宿主として50℃以上でも生存性を示す好熱性ウイルス、さらにはそれ由来の溶菌酵素、DNAリガーゼ、逆転写酵素などの酵素は、抗菌剤(ファージセラピー)や遺伝子工学分野の研究試薬などとして新規な応用面の有用性が期待できる。また、耐熱性ウイルス由来の安定性に優れた酵素は、構造と機能の解析が容易になるために、ウイルスと宿主の分子レベルでの相互作用の解明などの研究においても新たな進展が期待できる。本研究において得られた好熱性の新規ウイルスは、新規酵素遺伝子資源として高い有用性を有していることから学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Thermophilic viruses (phages) which infect on bacteria, especially thermophiles are expected to be genetic resource for the production of useful virus's enzymes. In this study, we have tried isolation of thermophilic viruses from soils and determination of their properties.

In this study, we succeeded in the isolation of a thermophile *Bacillus thermolactis* OIT60-2 and a virus (Caudovirales) which was specifically infected with the thermophile, and another thermophilic virus OC1 (Myoviridae family) which was specifically infected with *Pseudomonas tolaasii*, which is a pathogene of Shiitake mushroom.

研究分野：酵素工学、微生物学、応用生物化学

キーワード：好熱性ウイルス ウイルス酵素 好熱菌 溶菌酵素 シイタケ腐敗菌

1. 研究開始当初の背景

好熱菌の耐熱性酵素は常温菌のものと比較して安定性が非常に高く、生化学的な機能解析や結晶構造解析、蛋白質工学的機能改善などの基礎研究と有用物質生産用バイオリクター、及び食品や臨床分析用などの応用研究において、格段に優れていることを本研究者は明らかにしてきた。一方、ウイルス（ファージ）の酵素に関しては、本研究開始当初では常温性の大腸菌を宿主とする T4 ファージなど、常温性菌由来のウイルス酵素が主に遺伝子工学的試薬などに利用されていた。しかし好熱菌のウイルスに関する分子生物学、生化学、或いは遺伝子資源としての有効利用などに関する研究は極めて少なかった。また、次世代 DNA シークエンサーの開発などゲノム解析技術の迅速化によるウイルスのゲノム解析も進んできたが、ウイルスの酵素遺伝子に関する知見が乏しく遺伝子機能が殆ど推定できない状況であった。一方、好熱菌の自然界からの分離・培養技術が容易になり、好熱菌のウイルスに関しても応募者のこれまでの研究によって分離できるようになってきた。また 耐熱性で安定性の高い逆転写酵素、溶菌酵素、インテグラーゼなど、好熱菌ウイルス由来の酵素、タンパク質はバイオテクノロジーにおいて新規な応用展開が大いに期待できること、好熱菌ウイルスの機能未知遺伝子産物は安定性が高く、機能と構造解析が従来の常温性生物のウイルスに比較して、容易であることから、構造生物学的研究によるウイルスと宿主の相互作用やウイルスの侵入、増殖機構などに関する新たな知見が得られること、それらの情報や技術は他の微生物(病原菌や発酵微生物)、ヒトや家畜、植物などのウイルスの侵入や増殖機能などの解明や抗ウイルス剤の開発につながり、病気などの診断と予防への展開に大きく貢献すること、などが期待できる状況になりつつあった。

2. 研究の目的

本研究は、特殊環境である高温環境で生育する好熱性菌（pH 環境：中性、アルカリ性、酸性）のウイルスに注目し、多くの非病原性の新規好熱菌ウイルスの分離、ゲノム解析（塩基配列の決定）、ウイルス由来の耐熱性タンパク質や酵素の生産、生化学的機能解析と立体構造解析を進める。さらに、高い安定性が期待できる耐熱性ウイルス由来の酵素やタンパク質の産業、医療等への新たな応用面の展開をはかるものである。これにより、未開拓な好熱菌ウイルスの有用酵素遺伝子資源としての開発を進め、食品産業、医療等への新たな応用展開を図る。

3. 研究の方法

本研究では、種々の好熱菌（好熱菌、好熱好アルカリ性菌、好熱好酸菌、超好熱アーキアなど）や常温菌を宿主とする耐熱性ウイルスを、宿主菌の溶菌活性（プラーク形成）により分離する。分離できたウイルスを純化し、生育温度特性、生育 pH 特性を解析する。また電子顕微鏡観察による形態的特徴を解析する。さらに分離した好熱性ウイルスのゲノムの解析、

宿主菌のゲノム解析を行う。その形態やゲノム情報を基に、ウイルスの分類・同定を行う。さらに遺伝子の相同性検索からの酵素やタンパク質の遺伝子の同定を行う。溶菌酵素などの有用酵素遺伝子を大腸菌などで発現させ、産物を生産し精製する。精製した酵素の安定性、機能と構造に関する特徴を明らかにする。次に、それらの特長を生かした、新規応用面の開発を行う。

4. 研究成果

1) 好熱菌とこれを宿主とするウイルスの高温 (50-80) での分離

天然の藍であるスクモと高温の温泉の沈殿物から 60 , pH 9 の培養条件下で生育する 4 株の好熱菌の分離に成功した。2 重寒天法 (60) でそれらの菌株のコロニーにプラークを形成するウイルスの分離を行った (図 1)。

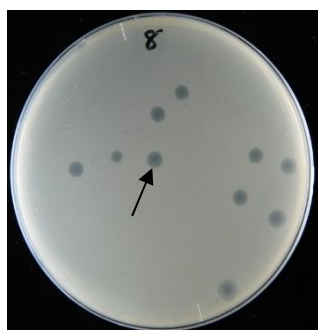


図 1. ウイルス IN1 が *Bacillus thermolactis* に形成するプラーク (矢印 : プラーク、シャーレ : 径 9 cm)

その結果、16S r-DNA の塩基配列の相同性 (基準株との相同性 ; 99.7%) から *Bacillus thermolactis* OIT60-9-2 株と同定した好熱菌を分離し、それを宿主とするとウイルス (IN1) を兵庫県・猪名川の土壌試料より見いだした。このウイルス液を調製し、様々な温度や pH 条件下での生存活性を調べた。その結果、60 、 pH 5-9 での処理 (24h) 後においても高い感染力をもつ好アルカリ・耐熱性で、透過型電子顕微鏡観察から正十二面体構造を持つ *Caudovirales* 科 (Head: 60 nm, Tail: 120 nm) に属する新規ウイルスの分離に成功した。現在、宿主菌 *B. thermolactis* OIT60-9-2 とウイルス IN1 のゲノム解析を行っている。

2) シイタケ腐敗菌として分離された常温菌 *Pseudomonas tolaasii* を宿主とするウイルス OC1 の発見

このウイルスは宿主が常温性菌にもかかわらず、耐熱性が高く、60 で 1 時間処理後も 100% の生存率を示した。そこで、この好熱性ウイルス OC1 の生理的な特徴を解析した。このウ

ウイルス OC1 の宿主特異性を、8 種類の異なる *Pseudomonas* 属細菌を対象にスポットテストにより調べた結果、*P. tolaasii* のみを宿主とする新規な好熱性ウイルスであることが判明した。このウイルスを精製し、その電子顕微鏡観察(図 3)から、頭部 67 nm、尾部 143 nm からなる全長 210 nm の Myoviridae 科に分類されることが判明した。また宿主 *P. tolaasii* のゲノムを調製し、その全塩基配列の解析を行った。遺伝子の同定を進めている。

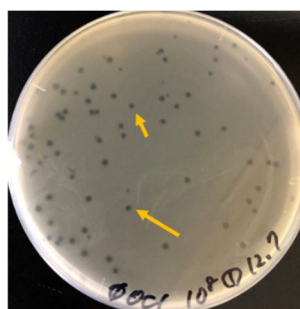


図 2 . ウイルス OC1 が *P. tolaasii* に形成するプラーク(矢印：プラーク、シャーレ：径 9 cm)

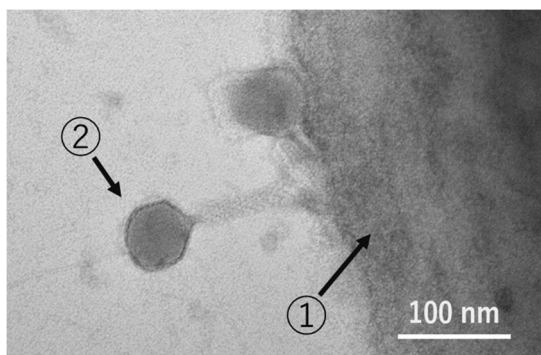


図 3. 好熱性ウイルス OC1 の透過型電子顕微鏡写真 (倍率 200,000 倍)、宿主細胞表面、ウイルス OC1 のヘッド、電顕撮影：(株)株花市電子顕微鏡技術研究所 (愛知県岡崎市)

3) 好熱菌の溶菌酵素の発見

高温 (95) 温泉水中から好熱性ウイルスを溶菌 (プラーク形成) 活性で探索する過程で、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* を特異的に溶菌する現象を見出した。この溶菌現象を解析した結果、溶菌活性は増殖するウイルスではなく、好熱菌が生産する溶菌酵素 (バクテリオシン) であることが判明した。その好熱菌を単離し、16S rRNA の塩基配列の相同性から通性嫌気性の好熱菌 *Anoxybacillus flavithermus* と同定した。この好熱菌の生産する新規バクテリオシンの特異性と溶菌活性は非常に高い。溶菌活性は 120 の処理でも残存し、非常に高い耐熱性を示した。分子レベルでの特徴を解明し、応用面の開発を図るために、溶菌酵素の高度精製と遺伝子の同定、構造解析などを現在進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagayoshi Y, Kumagai K, Mori K, Tashiro K, Nakamura A, Fujino Y, Hiromasa Y, Iwamoto T, Kuhara S, Ohshima T, Doi K	4. 巻 7
2. 論文標題 Physiological Properties and Genome Structure of the Hyperthermophilic Filamentous Phage OH3 Which Infects Thermus thermophilus HB8	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2016.00050.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊恭伸、大森勇門、尾崎清和、土居克己 大島敏久
2. 発表標題 好熱好アルカリ性Geobacillus toebii OIT60-9-2株を宿主とするウイルスfIN1の分離・性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会(名古屋市名城大学)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 老川 典夫、大島 敏久、保川 清、三原 久明、宮原 郁子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社サイエンティフィク	5. 総ページ数 224
3. 書名 エッセンシャル タンパク質工学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大森 勇門 (OHMORI Taketo) (90570838)	大阪工業大学・工学部・准教授 (34406)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	土居 克己 (DOI Katumi)		
研究協力者	櫻庭 春彦 (SAKURABA Haruhiko)		