

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18674

研究課題名(和文) 深海底微生物が有するD-アミノ酸/希少糖代謝系酵素遺伝子の網羅的探索と解析

研究課題名(英文) Exhaustive screening of D-amino acids/rare sugars-metabolizing enzyme genes in subseafloor microbial communities

研究代表者

若松 泰介 (Wakamatsu, Taisuke)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・講師

研究者番号：60597938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々なD-アミノ酸、希少糖を基質としたSIGEX解析法を用いて南海トラフ熊野灘海底下コア試料由来ショットガンメタゲノムライブラリーと、南太平洋環流海底下コア試料由来メタゲノムショットガンメタゲノムライブラリーに含まれる陽性クローン候補数を決定した。フローサイトメーターを用いて南太平洋環流海底下コア試料由来ショットガンメタゲノムライブラリーからD-Trp, D-Arg, D-Asp各々に応答する3つの陽性クローンを単離し、塩基配列を明らかにした。ライブラリー構築法のブラッシュアップも行い、挿入断片長と、ライブラリー数ともに従来法と比べ大幅に改善できた。

研究成果の概要(英文)：I determined the percentage of clones in shotgun metagenomics libraries prepared with subseafloor sediment samples at Nankai Trough and South Pacific Gyre with green fluorescence as the response to various D-amino acids and rare sugars using the SIGEX method. Clones with positive induction response to D-Trp, D-Arg, or D-Asp from the South Pacific Gyre library were sorted by a cell sorter. I determined DNA sequences for these three clones using the Sanger method. Furthermore, I brushed up the method for construction of libraries, and hence, both the length of inserted DNA fragment and the number of clones were significantly improved.

研究分野：生化学

キーワード：機能性遺伝子 海底下微生物 D-アミノ酸 希少糖 基質誘導

1. 研究開始当初の背景

蛋白質や核酸など生体分子の殆どはL-アミノ酸、D-糖から構成されるという光学異性体比の偏り(ホモキラリティー)が存在し、他方の光学異性体は生物界から排除されたとい前は考えられていた。また、生命圏での主要単糖はD-リボースやD-グルコースを含む7種類のみで、残りの単糖約50種類は希少糖とされている。しかし、近年の光学異性体などを分離分析する技術の発展に伴い、微生物から高等生物まで幅広くD-アミノ酸や多くのL-糖を含む希少糖が結合型、遊離型で存在し、病気への関与など生理機能や美肌効果、抗酸化作用など多くの効能を有することが明らかになり、医療・化粧品分野から大きな注目を浴びている。更に、希少糖のみならずD-アミノ酸の多くも甘味を呈することから、食品分野からのアプローチも多く始まっている。このように生命圏で存在比が低いD-アミノ酸や希少糖の有用性に大きな注目が集まるのに伴い、その分析や物質生産などに用いるための既知酵素とは特異性、安定性、至適条件、反応動力学定数、調節機構などが異なる酸化還元酵素や異性化酵素をはじめとした新規代謝系酵素の発見が待たれている。特に酸化還元酵素は、研究代表者が近年構造機能解析や応用研究を精力的に行っており、酸化反応による有用酸化物、還元反応によるD-アミノ酸/希少糖など有用物質生産用素子以外にも、酸化反応を利用した未利用生物資源を燃料とする酵素電池用素子、遊離D-アミノ酸/希少糖濃度を高精度で簡便に算出できる酵素センサー用素子など多くの産業利用が見込まれる。

地球の表面積の半分以上も占める海底下ではアーキアを主とした微生物が多く生存し、陸上や海中とは全く異なる地球最大規模の生命圏が存在する。有機物質や呼吸に用いるための酸化的物質が欠乏した超貧栄養状態の広大な海底下生命圏で生存する微生物は、海水中の生物活動により消費されずに埋没した難分解性物質を栄養源として利用するなど、独自のライフスタイルを持つ。陸上や海中の生命圏におけるD-アミノ酸、多くのL-糖の代謝速度はもう一方の光学異性体と比べ著しく遅いため、アミノ酸や単糖の絶対量が非常に低い海底下生命圏で生育する微生物は、消費されず埋没したそれらを効率良く利用する代謝経路を有すると考えられる。実際、海底下コア試料はD-アミノ酸の割合が高く、D-アミノ酸を栄養源とする海底下微生物の存在も報告されている。更に海底下微生物はその生育を維持するために、蛋白質やD-アミノ酸を含むペプチド、細胞膜エーテル脂質など菌体成分の再利用までも行っており、D-アミノ酸と同様に多くのL-糖を含む希少糖に対する新規代謝経路の存在が予想される。

2. 研究の目的

生命圏で存在比が低いD-アミノ酸や希少糖を持つ多くの生理機能や効能が明らかに

なるにつれ、これらは医療・化粧品・食品分野などから大きな注目を集め、その分析や物質生産に用いるための酸化還元酵素など新規代謝系酵素の発見が待たれている。海底下は超貧栄養状態であり、そこで生存する多くの微生物は利用されずに埋没したD-アミノ酸や希少糖を栄養源として利用するための様々な代謝系酵素を有することが予想される。本研究では、酵素活性発現や既知配列情報などに依存しない基質依存的遺伝子発現誘導を指標とした解析法(Substrate-Induced Gene Expression, SIGEX)を用いて、環境の異なる数種の海底下コア試料からD-アミノ酸や希少糖に対する誘導オペロンとその中に含まれる新規代謝系酵素遺伝子を探索、取得、解析することを目的とする。

3. 研究の方法

目的代謝系酵素遺伝子の網羅的探索には構内のJAMSTEC高知コア研究所海底資源研究プロジェクト地球生命工学研究グループの支援のもと、近年開発された基質依存的な遺伝子発現誘導を指標とした解析法SIGEXを用いた。本方法は、誘導オペロンに着目し、添加基質による遺伝子発現誘導を蛍光検出することで誘導オペロンに含まれる目的代謝系酵素遺伝子やその転写因子遺伝子、リボスイッチ遺伝子、膜蛋白質遺伝子などを探索する方法であり、多くの代謝系酵素遺伝子は基質やその生成物等に依存して誘導的に発現する、微生物の代謝系酵素遺伝子の多くはオペロンを形成しており、転写因子遺伝子やリボスイッチ遺伝子は代謝系酵素遺伝子の近傍に存在することが多い、という2つの知見に基づいている。蛍光検出にフローサイトメーター、基質依存的に蛍光を発する陽性クローンの単離にセルソーターを使用することができるため、従来の2方法のメタゲノム法(酵素活性の検出(欠点; 活性発現が必須、多大な労力) 遺伝子配列/蛋白質一次構造情報に依存した探索(欠点; 既知配列情報に依存))と比べハイスループット且つ画期的であり、機能未知遺伝子を大半とした海底下環境DNAには最適な方法であると考えた。

既存の南海トラフ熊野灘海底下コア試料由来と南太平洋環流海底下コア試料由来のショットガンメタゲノムライブラリーを対象ライブラリーとして用いた。挿入DNA断片の下流にはレポーター遺伝子として*gfp*または*evoglow*遺伝子を配置している。

4. 研究成果

まず上記の既存の2つのショットガンメタゲノムライブラリーを対象に、添加した19種のD-アミノ酸と3種の希少糖(L-glucose, L-ribose, D-psicose)各々に応答する陽性クローン候補数を算出した。その結果、宿主として用いた大腸菌がデータベース上代謝し

ないとされる基質の中では、南海トラフ熊野灘海底下コア試料由来ショットガンメタゲノムライブラリーの1%以上のクローンが、D-Ile, D-Gln, D-Thr, D-Trp, D-Tyr, D-Asp, D-His, L-ribose, D-psicoseに回答し、南太平洋環流海底下コア試料由来ショットガンメタゲノムライブラリーの0.01%以上のクローンが、D-Ile, D-Thr, D-Trp, D-Tyr, D-Arg, D-Hisに回答した。次にフローサイトメーターを用いて南太平洋環流海底下コア試料由来ショットガンメタゲノムライブラリーからD-Trp, D-Arg, D-Asp各々に回答する3つの陽性クローンを単離した。サンガー法を用いて挿入塩基配列を明らかにした結果、13-45bpと非常に短く、エネルギー的にリボスイッチの可能性も低いいため、これらの陽性クローンの誘導機構としては基質によって宿主の代謝産物(転写因子など)が変化し、それが挿入遺伝子断片に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、本研究で対象としたD-アミノ酸、希少糖に対する陽性クローンだけではなく、ニッケルやガリウムなどのレアメタルに対する陽性クローンについても、その挿入遺伝子断片が殆どの場合500bp以下と短いことが明らかになった。より長い回答遺伝子断片を得ることで基質応答メカニズムの考察がし易くなると考え、本年度はショットガンメタゲノムライブラリー作製時の条件検討(ブラッシュアップ)を行った。まず、挿入遺伝子断片のサイズセレクションについて、これまでゲル切り出し法により行っていたが、今回は磁気ビーズ法を用いることで課題であった低分子DNAを効率的に除くことに成功した。この時、数社の磁気ビーズキットの比較をした。また、今回からGatewayテクノロジーを用いてショットガンメタゲノムライブラリーを構築することにしたが、用いるDESTINATIONベクターをインバースPCRにより直鎖状にした上でエントリークローンとクローナゼ反応を行うことで、効率的に挿入断片未挿入クローンを除けることがわかった。更にインバースPCRにより挿入遺伝子断片上流の*lac*プロモーターを削ることでバックグラウンドの蛍光を顕著に減少させることが出来ることがわかった。今回のこれらのブラッシュアップにより、今後作製予定のショットガンメタゲノムライブラリーのクオリティは劇的に向上することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Taisuke Wakamatsu, Haruhiko Sakuraba, Megumi Kitamura, Yuichi Hakumai, Kenji Fukui, Kouhei Ohnishi, Makoto Ashiuchi, and Toshihisa Ohshima (Corresponding author), Structural insights into

L-tryptophan dehydrogenase from a photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有り, 83, e02710-16. Doi: 10.1128/AEM.02710-16

〔学会発表〕(計7件)

森澤高至, 諸野祐樹, 寺田武志, 西川聡美, 大下紘貴, 稲垣史生, 芦内誠, 若松泰介, 南海トラフコア試料を対象とした基質誘導ベースのメタゲノム解析法による金属イオン応答遺伝子の網羅的探索, JpGU-AGU Joint Meeting 2017, 2017年5月20-25日, 幕張メッセ(千葉県千葉市)

若松泰介, 諸野祐樹, 寺田武志, 稲垣史生, 芦内誠, 最先端技術を用いた深海底微生物の生態解明 ~SIGEXを用いたレアメタル応答遺伝子の同定など~, 日本農芸化学会 2016年度中四国支部大会(第46回講演会)シンポジウム「環境・ひと・微生物」(共催: 第12回D-アミノ酸学会), 2016年9月15日, 高知県立県民文化ホールグリーンホール(高知県高知市)

森澤高至, 諸野祐樹, 寺田武志, 西川聡美, 尾崎和弘, 北村萌, 大下紘貴, 佐藤瑞希, 稲垣史生, 芦内誠, 若松泰介, 南海トラフ深海底コア試料を対象とした基質誘導型遺伝子発現解析法 SIGEX による Ni²⁺, Ga³⁺ 応答遺伝子の同定, 日本農芸化学会 2016年度中四国支部大会(第46回講演会), 2016年9月16日, 高知大学朝倉キャンパス(高知県高知市)

若松泰介, 櫻庭春彦, 北村萌, 白米優一, 大西浩平, 芦内誠, 大島敏久, シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* 由来 L-トリプトファン脱水素酵素の構造機能解析, 日本ビタミン学会第68回大会, 2016年6月17-18日, 富山国際会議場(富山県富山市)

添田愛理沙, 諸野祐樹, 寺田武志, 稲垣史生, 芦内誠, 若松泰介, 深海底コア試料を用いた SIGEX 法による D-アミノ酸/希少糖代謝酵素遺伝子の網羅的探索, 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日, 愛媛大学農学部(愛媛県松山市)

尾崎和弘, 諸野祐樹, 寺田武志, 西川聡美, 北村萌, 稲垣史生, 芦内誠, 若松泰介, 深海底コア試料を用いた SIGEX 法によるレアメタル応答遺伝子の網羅的探索と解析, 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日, 愛媛大学農学部(愛媛県松山市)

北村萌, 櫻庭春彦, 芦内誠, 大西浩平, 大島敏久, 若松泰介, *Nostoc punctiforme* 由来 L-トリプトファン脱水素酵素の構造機能解析, 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日, 愛媛大学農学部(愛媛県松山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 泰介 (WAKAMATSU, Taisuke)
高知大学・教育研究部総合科学系生命環境
医学部門・講師
研究者番号：60597938

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

諸野祐樹 (MORONO, Yuki)
稲垣史生 (INAGAKI, Fumio)
芦内誠 (ASHIUCHI, Makoto)