

機関番号：82626
 研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19201041
 研究課題名(和文) インテグロン・ジーンカセットメタゲノム解析の基盤整備とその有効性評価
 研究課題名(英文) Development and Evaluation of Integron Gene Cassette Metagenome Analysis
 研究代表者
 丸山 明彦 (MARUYAMA AKIHIKO)
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ付
 研究者番号：30202336

研究成果の概要(和文)：

海洋の極限環境試料ではじめて、可動性遺伝因子の一つであるインテグロンやそれに付随するジーンカセットの解明を目指した。その結果、インテグロンの新しい構造や環境適応機能を担う機能遺伝子などを数多く見出すことに成功した。具体的には、環境 DNA 試料からインテグロンを効率的に見出す新手法を考案するとともに、海洋の汚染・極限環境試料を対象にその環境への適応に関与する新しいインテグロン情報を収集、バイオテクノロジー利用が期待できる新しい有用機能遺伝子情報も数多く収集することができた。

研究成果の概要(英文)：

This project aimed to study the mobile DNA element, integrons, and associated gene cassettes, for the first time, in extreme marine environments. Novel and diverse integron structures and environment-adaptive gene cassettes have been recovered. This project had three main achievements. First, it introduced new methodology for recovery of integrons from environmental metagenomes. Second, it extended our understanding to the contribution of integrons in the adaptation of bacteria to extreme marine conditions. Third, it provided us with several novel adaptive and metabolic genes that have several biotechnological applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
総計	36,200,000	10,860,000	47,060,000

研究分野：環境微生物・遺伝子の解析と利用

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：微生物、遺伝子、メタゲノム、インテグロン、環境適応、極限環境、IODP、海洋

1. 研究開始当初の背景

微生物ゲノム解析の効率化や塩基配列情報の蓄積により、個々の微生物の系統分類学的位置のみでなく、その機能の推定が分子レベルで可能な状況となっている。一方、近年の環境微生物群集解析では、自然界の微生物の大半は分離培養困難なもので占められていることが明確となっている。したがって、

これら未解明な大多数の環境微生物を対象としたゲノム情報あるいは機能遺伝子情報の収集と解析、資源探索には、基礎と応用の両面から多くの関心が寄せられている。

こうした中、米国は21世紀になるや否やメタゲノム解析の時代に突入し、新しい遺伝子や生物機能、それらの生態学的役割に至るまで次々と解明しつつある(e.g. Beja et

al. 2001 Nature, Venter et al. 2004 Science)。国内でも、ヒト腸内細菌やカイメン、海底試料、土壌試料などで研究が進められているが、これらのいわば網羅的メタゲノム解析手法のみでは人手や予算の制約が大きく、このままでは日米間の差は開くばかりと考えられる。

一方で、変わったメタゲノム解析手法も登場している。これは、自然環境中を一つの発現可能な遺伝子単位 (ORF) として可動しているジーンカセット (GC) に焦点をあて、それがもつ一部の共通領域を標的とした遺伝子増幅 (PCR) により、その含有機能遺伝子を効率よく検出するという点に特徴がある (Stokes et al. 2001 Appl Environ Microbiol; Holmes et al. 2004 Environ Microbiol)。このジーンカセットの微生物群集内転移を制御している機構をインテグロン、関与する転移酵素をインテグレースと呼び、その全体をここではインテグロン・ジーンカセット (IGC) システムと呼ぶ (図 1)。もともとこれは、抗生物質等薬剤耐性遺伝子のすみやかな水平伝播に介在していることで著名となったが、その後いくつかの例外が見いだされ、広く環境中での原核生物の適応・進化に関与している可能性が高まっている (Mazel 2006 Nature Rev Microbiol)。しかし、環境試料の解析は土壌試料などごく一部でしか行われていない。そこで、本研究では、この手法を幅広く環境試料に適用する基盤整備を行うとともに、これまで全く未解明な極限環境試料を対象とし、この IGC システムの普遍性や特徴、ジーンカセット内遺伝子の特徴や有用性、生息環境との関連性等の解明を図り、この手法の有効性について評価することを目的とした。

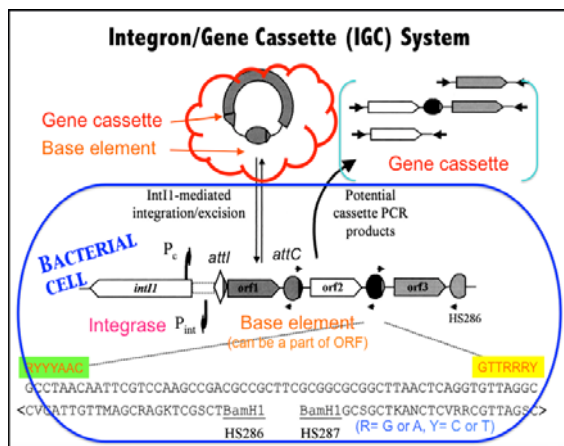


図 1. インテグロン・ジーンカセット (IGC) システムの概要

2. 研究の目的

微生物が保有するインテグロン・ジーンカ

セット部位に着目し、多種多様な微生物が混在する環境微生物試料を対象とした効率的な機能遺伝子探索手法 (IGCメタゲノム解析手法) として確立するための基盤整備を行う。これまで全く未解明な極限環境試料 (過度な汚染環境を含む) を対象とし、この IGC システムの普遍性や特徴、見出された機能遺伝子の特徴や生息環境との関連性、発現産物の特徴や有用性等の解明を通し、本手法の有効性や得られた結果の科学的意義、応用の可能性等について評価することを目的とする。また、通常のメタゲノム解析が困難な微量バイオマス環境試料への適用を図り、本手法の有効性や優位性を示すことを目指す。

3. 研究の方法

標的とするジーンカセット部位に特徴的な共通領域 (attC 領域: たとえば、GCCTAACAAATTCGTCCAAGCCGACGCCGCTTCGCGGGCGCGCTTAACTCAGGTGTTAGGC) に着目し、特異的でありかつある程度の汎用性も備えたプライマー候補をいくつかデザインし、ジーンカセットを含む標的遺伝子部位が効率よく増幅されるかどうかを組織的に調べた。また、ジーンカセット部位だけに留まらず、インテグレース部位を含む長鎖 IGC 断片の獲得も試みた。実際には、各々のプライマーを用いて得られた PCR 増幅産物を電気泳動にかけ、得られた DNA バンドを切り出しクロニングし、各々の配列を読んだ。得られた塩基配列情報から標的とする配列情報が含まれているかどうかを精査した後、ORF や構造を読み解き、その試料が由来した環境との関係解明を図った。また、見出した遺伝子 ORF については、既存のデータベースとの比較で近縁分子の探索を行い、配列から機能を推定した。一部有用性が期待される酵素遺伝子等については、通常の大腸菌や海洋由来の宿主・ベクター系を用い、発現実験を行い、さらなる特徴解明に取り組んだ。

IGC システム中の重要酵素であるインテグレースについては、本システムの由来 (適応・進化の過程) を知る上で大変重要な手がかりとなるため、これまでの知見にとらわれず新しいプライマーや条件を試した。また、各々の環境試料より見出されたインテグレースやジーンカセットが、こういった微生物に由来するのかを推定するため、通常の SSU rRNA 遺伝子解析手法により宿主微生物の解明を図った。これらの情報収集や解析、比較等を通し、その試料が置かれていた環境と見出された可動性遺伝因子との間の関係解明、さらにはその宿主微生物との関係解明を図るとともに、新しい機能遺伝子探索法としての有効性や有用性を評価した。

対象とした試料は、計画の前半部が主に石

油等で汚染されたスエズ湾海底堆積物試料および東京湾海底堆積物試料であった。後半部は、北米西海岸沖（カスカディア）のメタンハイドレート海域で採取した掘削コア試料（IODP #311）であった。この中でコア試料については、DNA量が少なく不純物が多かったため、市販の各種キットや改変法を用い、DNAの抽出・精製を注意深く行った。

4. 研究成果

これまでほとんど解析が行われていない汚染環境試料や極限環境試料を対象とし、IGCシステムの新しい獲得方法の開発を手がけるとともに、その構成要素であるインテグレース遺伝子やジーンカセット接合領域、そして多数の機能遺伝子を内包するジーンカセット領域の解明を図った。また、見出された機能遺伝子の機能や役割を推定するとともに、新しい情報の活用を図った。主な成果は以下のようである。

(1) 環境 IGC システムの新しい獲得方法

環境 IGC システム中のジーンカセット部位を特異的に増幅するよう我々がデザインした PCR プライマーは、今回対象とした汚染環境試料や極限環境試料の解析にも有効であった。これに加え、ジーンカセット部位以外の幅広い関連領域まで増幅可能な PCR 条件の検討を進めた。その結果、インテグレース部位からジーンカセット部位までの長鎖 DNA 断片（図 1 参照）の取得を可能にするプライマーセットをデザインすることに成功した。得られた PCR 増幅産物は 1.5~4 kbp の大きさを持ち、これまで別々の DNA 断片情報でしかなかったインテグレース遺伝子配列とジーンカセット配列が、一つの機能的構造体情報として入手可能となった。この中には、これまであまり知られていないジーンカセット接合領域（attI）やプロモーター領域（Pc）の情報も含まれているものと考えられた。また、この方法により、ジーンカセット配列中第 1 番目に位置する遺伝子配列情報の取得が可能となった。この部位の遺伝子は、他の部位のそれより発現頻度が高くより重要な遺伝子と考えられることから、本システムの機能や役割の解明にも大きく寄与するものと考えられた。

(2) インテグレース遺伝子の多様性

IGC システム中の重要酵素であるインテグレース遺伝子については、スエズ湾試料で 13、東京湾試料で 20、掘削コア試料で 25 の系統群情報が得られ、そのほとんどが新規性の高いものと見なされた。また、これらの中で重複する系統群の数は少なく、解析数を増やせばさらに新しい系統群が見出せるものと考えられた。このことは、この IGC システムが

原核生物の中で、かなり以前より広範に分布し多様化していることを示唆している。

(3) ジーンカセット接合領域（attI）の特徴

今回の解析で、内湾の堆積物試料から約 30、掘削コア試料から 1 つの attI 様領域を見出した。しかし、いずれの場合も、一部の培養可能な細菌で知られるコアサイト配列（DR1、DR2）がほとんど見出せなかった。この領域については、大腸菌等のごく一部の細菌種（クラス 1 インテグロン保有種）でしか明らかにならず、まだまだ不明な点が多い。したがって、今回考案した方法により得られる環境微生物由来の情報からは、この領域に関わる原核生物全般に共通する知見が得られる可能性がある。

(4) ジーンカセットの多様性

標的としたジーンカセット中より、スエズ湾試料から 146、東京湾試料から 68、掘削コア試料から 53 の遺伝子 ORF が見出された。ジーンカセット中で、これらの ORF の配列方向は一樣ではなく、逆方向のものが隣接して連結している場合もしばしば見られた。また、通常の相同性検索で機能推定が可能なものはごくわずかであり、大半の ORF は機能未知な新規性の極めて高いものと見なされた。そこで、見出された遺伝子と環境との関連性解明には、これら一部の機能推定可能なものを対象とした。また、これまでのところ、どの環境試料でも同一の遺伝子配列が繰り返し見出される場合は少なく、解析数の増加とともにさらに多くの多様な機能遺伝子が得られるものと考えられた。

(5) 見出された機能遺伝子の特徴

上述したように、本手法を用いることで環境中より多数の機能遺伝子を見出すことが可能となったが、その大部分は通常法での機能推定が困難であった。別途、インフォーマティクスの解析手法を用いたアプローチが必要と考えられた。一方、ある程度相同性が見出された遺伝子に着目した場合、その種類は、その試料が由来する環境により大きく異なることがわかってきた。たとえば、石油や重金属による汚染が常態化しているスエズ湾試料の場合、他とは異なり、その汚染物質の認識や分解、プラスミドの維持や生命維持等に関わる遺伝子が比較的多く見出された（図 2）。東京湾試料では、PCB 等難分解性物質分解酵素やエステラーゼなど。また、両内湾試料に共通してブレオマイシン耐性タンパク質などが見出された。

一方、メタンハイドレート海域の掘削コア試料の場合、酸化・還元酵素等のタンパク質ファミリーが全体の半数以上を占めた。また、これらの中には、ジーンカセット中の第 1 番

目遺伝子となっているものが数多く見られた。このことは、これら遺伝子が、その環境中で高頻度発現している可能性が高いことを示唆するものであり、イオウやメタンの酸化還元エネルギーに依存して生育している現場微生物の特徴とよく一致した。

これらジーンカセット中に見出された遺伝子の中で、一部の有用性が期待できる酵素等遺伝子については、さらに大腸菌や海洋細菌を使った宿主・ベクター系での発現実験を試みた。その結果、ハロゲナーゼ様遺伝子など二三の遺伝子で実際の発現に成功している。これらジーンカセット由来の遺伝子は、実際の環境中でも発現している可能性が高く、またいずれも新規性の高いものと見なされることから、今後の利用に向けた展開にも期待がもてる。

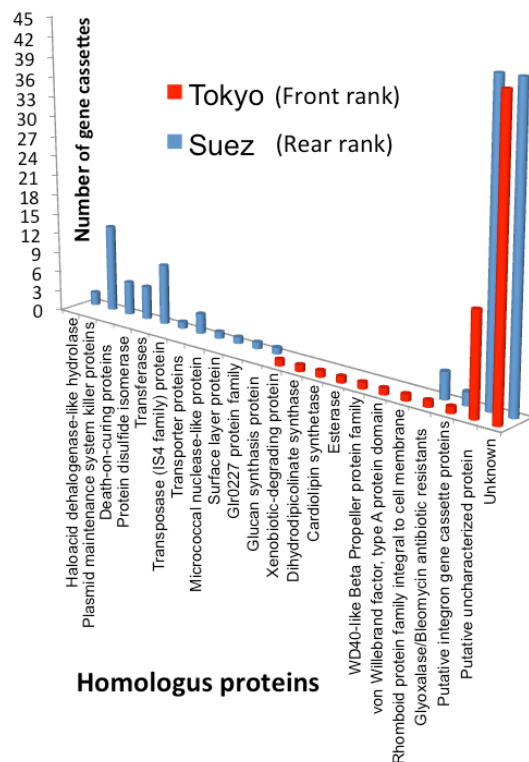


図2. 内湾堆積物由来のジーンカセット領域から見出された機能遺伝子の特徴

(6) まとめ

本研究で考案した IGC システムの一括獲得手法は、従来法より長く完全なインテグロンシステムを様々な環境中から取得する上で大変有益なものであることがわかった。また、これまで限られた情報しかなかった当該システムの構成要素 (attI、Pc、attC 等) についても、より普遍的な構造や機能が解明される可能性が高まった。一方、本研究により、人為的影響の極めて少ない深海や海底地下圏の環境微生物試料にも IGC システムが広く分布することが明らかとなったことから、こ

れまで病原菌等の培養可能株を中心に解析され推定されてきた以上に古い時代から、原核生物の適応・進化の過程に関与してきた可能性が高まった。また、得られたジーンカセット部位の解析では、大部分の遺伝子が機能未知なものに見なされたが、一部有用性が期待できる遺伝子も見出された。特にプロモーター領域 (Pc) 直下に位置するジーンカセット第1番目遺伝子は、実際の環境中で頻度高く発現していると考えられることから、その多様性や変動様式は、基礎と応用の両面から大変興味深いものと見なされた。このように、本研究は、微生物の適応・進化といった基礎的側面のみならず、現段階では無尽蔵とも言える環境遺伝子資源の利用といった側面からも、大変意義深い成果をあげたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① Hosam Easa Elsaied, Hatch W Stokes, Keiko Kitamura, Yasuro Kurusu, Youichi Kamagata, and Akihiko Maruyama. Marine integrons containing novel integrase genes, attachment sites, attI, and associated gene cassettes in polluted sediments from Suez and Tokyo Bays. THE ISME Journal (Nature Publication Group), 査読有、in press. advance online publication, 20 January 2011 (doi:10.1038/ismej.2010.208)

② Olivia U. Mason, Tatsuo Nakagawa, Martin Rosner, Joy D. Van Nostrand, Jizhong Zhou, Akihiko Maruyama, Martin R. Fisk, and Stephen J. Giovannoni. First Investigation of the Microbiology of the Deepest Layer of Ocean Crust. PLOS ONE. 査読有、5, e15399-1~e15399-11, 2010.

③ Hideyoshi Yoshioka, Akihiko Maruyama, Takamichi Nakamura, Yowske Higashi, Hiroyuki Fuse, Akira Sakata, and Douglas H. Bartlett. Activities and distribution of methanogenic and methane-oxidizing microbes in marine sediments from the Cascadia Margin. Geobiology. 査読有、8, 169-243, 2010.

④ Hosam Elsaied, H. W. Stokes, Takamichi Nakamura, Keiko Kitamura, Hiroyuki Fuse and Akihiko Maruyama. Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents. Environmental Microbiology. 査読有、9, 2298-2312, 2007.

[学会発表] (計17件)

① Elsaied Easa Hosam, 秋庭 綾、北村 恵子、丸山 明彦. Diversity and role of

Integron/gene cassette metagenome in extreme marine environments. 第26回日本微生物生態学会大会、2010年11月、つくば市。

② Hosam Easa Elsaied, Yosuke Higashi, Hideyoshi Yoshioka, Keiko Kitamura, Akihiko Maruyama. Bacterial Integron Metagenome in Microbial Communities Inhabit a Deep Gas Hydrate Core - Ancient. The 13th International Symposium on Microbial Ecology, 2010年8月、米国シアトル市。

③ 福田敦史、林 宏恵、久留主泰朗。Sphingomonas 属細菌群を宿主とする高発現ベクターの構築。第32回日本分子生物学会。2009年12月、神奈川。

④ Hosam Elsaied, Keiko Kitamura and Akihiko Maruyama. Composition of bacterial integron metagenome in marine sediment contaminated with industrial wastes. Japanese Society of Microbial Ecology, Nov. 2009, Hiroshima.

⑤ 丸山明彦、ホサム・エルセイド。インテグロン・ジーンカセットシステムに着目した海洋環境微生物ゲノム解析。マリンバイオテクノロジー学会。2009年5月、東京。

⑥ Hosam Elsaied, Keiko Kitamura, and Akihiko Maruyama. Integron metagenome comparison between petroleum oil contaminated and oil-free marine sediments: New study and methodology to expand knowledge about integron diversity in marine environment. International Symposium on Microbial Ecology. Aug. 2008, Cairns, Australia.

⑦ Hosam Elsaied, Keiko Kitamura, and Akihiko Maruyama. Integron mobile metagenome in bacterial communities from aquatic oil polluted environment: A source to uncover new functional genes of important scientific and commercial value. Marine Biotechnology Symposium. 2008年5月、京都。

⑧ 丸山明彦、ホサム・イーサ・エルセイド。海底熱水系試料での微生物機能遺伝子探索。東京大学海洋研究所共同利用シンポジウム「海底拡大系の総合研究」、2007年10月、東京。

⑨ 吉岡秀佳、東陽介、中村孝道、丸山明彦。カスカディア縁辺域における微生物・遺伝子の特徴とメタン生成について。第3回 IODP 成果報告会、2007年5月、東京。

⑩ Elsaied Easa Hosam, 中村孝道、北村恵子、布施博之、丸山明彦。海洋環境微生物からの効率的な機能遺伝子の採取。マリンバイオテクノロジー学会。2007年5月、山形。
〔図書〕(計1件)

① Hosam Elsaied and Akihiko Maruyama. Diversity and role of bacterial integron/gene cassette metagenome in extreme marine environments. In: Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. John Wiley & Sons, Inc., in press.

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 機能遺伝子探索用PCRプライマー

発明者: 丸山明彦、ホサム・エルセイド

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所理事

種類: 特許

番号: 特願2007-120210

出願年月日: 平成19年4月27日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 明彦 (AKIHIKO MARUYAMA)

独立行政法人産業技術総合研究所・

生物プロセス研究部門・研究グループ付

研究者番号: 30202336

(2) 研究分担者

久留主 泰朗 (YASURO KURUSU)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号: 60272118

吉岡 秀佳 (HIDEYOSHI YOSHIOKA)

独立行政法人産業技術総合研究所・

地圏資源環境研究部門・研究員

研究者番号: 30415765

布施 博之 (HIROYUKI FUSE)

独立行政法人産業技術総合研究所・

生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 10358103

陶山 哲志 (SATOSHI SUYAMA)

独立行政法人産業技術総合研究所・

生物機能工学研究部門・研究員

研究者番号: 10358103

三谷 恭雄 (YASUO MITANI)

独立行政法人産業技術総合研究所・

生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号: 10358103

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

エルセイド ホサム (HOSAM ELSAIED)

独立行政法人産業技術総合研究所・

生物プロセス研究部門・1号契約職員

ストークス ハロルド (HALORD STOKES)

シドニー工科大学・教授