

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580097

研究課題名（和文） 高度好熱菌のシリカ誘導性タンパク質の発現機構の解明と異種タンパク質生産への応用

研究課題名（英文） Transcriptional analysis of silica-induced protein in *Thermus thermophilus* and its application to heterologous protein production

研究代表者

土居 克実 (DOI KATSUMI)

九州大学・農学研究院・講師

研究者番号：40253520

研究成果の概要（和文）：高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のシリカスケール形成機序を解明するため、ゲノム解読が完了している *T. thermophilus* HB8 株に対し過飽和シリカ刺激による発現プロファイルを経時的に解析した。これによって過飽和シリカに応答し、Sip の発現を誘導する遺伝子を網羅的に解析できた。この結果、Sip は環境中の鉄飢餓感知システムにより制御されていることが分かった。

研究成果の概要（英文）： *Thermus* cells produce the specific protein, a silica-induced protein (Sip), only when they are cultivated in the culture containing supersaturated silica. DNA microarray analysis under the silica-stressed and iron-deficient conditions were performed to detect the signal transduction in sip expression. From the results, *Thermus* cells may receive the signal of the existence of supersaturated silica as the iron deficiency, and may gather iron ions or other metal cations to their surfaces.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：*Thermus thermophilus*、シリカ、ABC トランスポーター、DNA マイクロアレイ、大量発現系、鉄イオン

1. 研究開始当初の背景

(1) シリカは地殻中に最も多く存在する物質であり、水にはケイ酸として溶解し、その飽和濃度は温度・圧力・pH に依存する。ケイ酸は温度・圧力の低下により過飽和になると互いに脱水縮合し、ポリケイ酸を形成することでコロイドとなり水溶液中に安定に存在する。したがって過飽和シリカの溶液から

固体状シリカは沈降しにくい地熱地帯では、高温・高圧下でシリカが飽和した地下水が噴出することで、地表付近の熱水中ケイ酸濃度は過飽和に達している。このため、地熱発電所のパイプライン中ではシリカ沈殿物であるシリカスケールが急速に形成され、操業トラブルの原因となっている。シリカスケール形成は圧力や温度、他の共存金属イオン

との相互作用を考慮した無機化学的な形成メカニズムでは説明不可能で、無機化学分野ではシリカスケール形成が注目の研究対象となっている。

(2) 申請者は、地熱発電所パイプライン中のシリカスケール形成メカニズムを解明する中で、シリカスケール内に多数の微生物様構造が存在することを見出し、シリカスケール中の高度好熱菌の菌相解析に成功した。菌相解析の結果、主要菌群であった *Thermus* 属細菌をシリカスケールより分離し、過飽和シリカ含有培地で培養すると、対数増殖期中期から急激に沈殿を生じた。また、過飽和シリカ添加培地で培養した場合に細胞表面で特異的なタンパク質 (Silica-induced protein ; Sip) の発現が確認され、*Thermus* 属細菌にシリカ応答機構が存在し、シリカ沈殿に関与することが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 本研究は細菌におけるシリカ刺激応答機構として、Sip の誘導発現制御機構を解明することを目的とした。特に、過飽和シリカ刺激によって *T. thermophilus* で鉄結合性 ABC トランスポーターのサブユニットとホモロジーを示す Sip が過剰生産され、シリカによる刺激がどのような経路を経て発現誘導に至るか、および、シリカによる刺激と鉄による刺激では応答が異なるか否かを解明することを目的とした。

(2) また、sip 転写機構 (プロモーター、ターミネーター、 σ 因子、アクチベーターまたはリプレッサータンパク質など) を明らかにする。

(3) さらに、極限環境微生物の外部刺激応答や代謝メカニズムの解明に有効である DNA マイクロアレイ解析を行い、シリカおよび鉄に対する応答を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

(1) 過飽和シリカ添加 TM 培地および無添加 TM 培地にて *T. thermophilus* を培養し、経時的に mRNA を抽出・精製し、sip コードする DNA 領域をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションを行った。また、精製した mRNA を鋳型に 5' -RACE 法とプライマー伸長法を行い、転写開始点を決定した。

(2) (1) と同様の条件で培養した細胞より抽出した mRNA を鋳型にした qRT-PCR を行い、シリカ刺激による特異的な mRNA 転写量を定量した。

(3) 培地中の金属イオンを除去するため、キレックス 100 を通過させた TM 培地を用い、上記と同様の実験を行った。

(4) *T. thermophilus* 発現プラスミドクローンセットを用い、2,226 遺伝子をガラスプレートにスポットした *T. thermophilus*

DNA チップを調製した。

(5) (1) で調製した total RNA を鋳型に逆転写 PCR によって合成した cDNA をそれぞれ Cy5、Cy3 ラベルし、プローブを作製した。調製した蛍光 cDNA プローブをスポット DNA とハイブリダイズさせ、FLA-8000 によって蛍光強度をスキャンした。得られた蛍光強度をもとに、発現量の変動を統計学的に処理し、解析した。

4. 研究成果

(1) シリカスケール形成の引き金を探索するため、シリカ濃度 (200ppm、400ppm、600ppm) を変化させた、またはキレート樹脂により鉄イオンを除去した液体培地中で培養した *T. thermophilus* HB8 株から RNA を分離・精製し、これらを鋳型とした RT-PCR 法によって各遺伝子の転写量を定量解析した (図 1)。

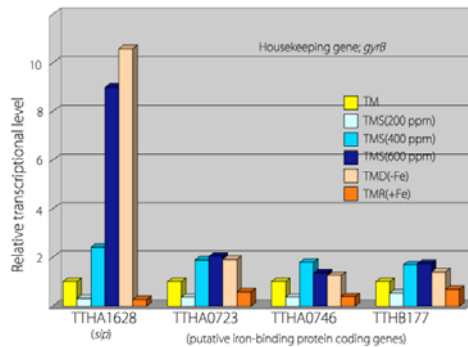


図1. RT-PCRを用いたシリカ存在下および鉄飢餓条件下における*T. thermophilus* HB8の鉄結合性ABCトランスポーター遺伝子の転写量解析

その結果、TTHA1628 (sip) のみが、過飽和シリカに応答して転写量が増大した。また、本遺伝子は飽和以下の濃度では、転写量は2倍程度でしか無く、鉄飢餓状態では転写量は10倍以上に増加した。これらの結果は、DNA マイクロアレイの結果とも合致したことから、sip は鉄飢餓または過飽和シリカ刺激に応答して発現されるタンパク質であることが推察された。

(2) *T. thermophilus* HB8 を 70°C、160 rpm で培養し、回収した菌体をシリカ添加(600 ppm)および無添加の TM 培地にそれぞれ懸濁後、15分、60分培養した。これらの培養菌体から全 RNA を抽出し、これを鋳型として cDNA 合成を行った。

これらを GeneChip カスタムアレイとハイブリダイズしてトランスクリプトーム解析を行った結果、sip (Gene ID: TTHA1628) の転写量は15、60分後では、約4倍、約8倍に増大した。ところが、Sip と共に Fe³⁺ 結合性 ABC transporter を構成し、オペロン構造をとると推定される TTHA1629、TTHA1630 の転写量増大は15分後では観察されなかった (表 1)。よって、sip は単なる鉄輸送の ABC transporter ではなく、シリカ

に特異的な機能を有することが推察された。

表1 DNAマイクロアレイの解析結果

15分後			60分後		
Locus Tag	annotation	fold	Locus Tag	annotation	fold
TTHC04	hypothetical protein	9.6	TTHA1629	iron ABC transporter, permease protein	11
TTHC03	hypothetical protein	7.5	TTHC04	hypothetical protein	8.6
TTHB070	survival protein SsrE	4.5	TTHC02	hypothetical protein	7.9
TTHC06	hypothetical protein	3.9	TTHB219	hemin ABC transporter, permease protein, putative	7.8
TTHA1629	iron ABC transporter, periplasmic iron-bind	3.8	TTHA1629	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein	7.6
TTHA1325	putative sulfite oxidase	3.7	TTHB16	ABC transporter, periplasmic binding protein related protein	7.0
TTHC09	hypothetical protein	3.7	TTHB20	hemin ABC transporter hemin-binding protein	6.7
TTHA940	conserved hypothetical protein	3.7	TTHA0706	cation-transporting P-type ATPase	6.2
TTHA939	conserved hypothetical protein	3.6	TTHA1600	iron ABC transporter, ATP-binding protein	6.2
TTHA326	cytochrome c-552 like protein	3.5	TTHC06	hypothetical protein	5.3
TTHA1838	SuA protein (ATP-binding protein)	3.4	TTHA059	cold shock protein, CSD family [C-terminal]	5.1
TTHA1841	putative dioxygenase ferredoxin component	3.3	TTHC01	putative RepA protein	4.5
TTHB07	alkaline phosphatase	3.2	TTHA049	fatty acid desaturase	4.5
TTHA070	peptide ABC transporter, permease protein	3.2	TTHC08	hypothetical protein	4.4
TTHA021	probable phosphate transporter, permease protein	3.1	TTHB18	ABC transporter, ATP-binding protein	4.1
TTHA030	probable phosphate transporter, permease protein	3.0	TTHA051	9S4 pseudouridine synthase A (pseudouridylylase synthase)	3.9
			TTHC07	hypothetical protein	3.8
			TTHA064	hypothetical protein	3.5
			TTHA0312	cytochrome cxd oxidase subunit I (polypeptide I + III)	3.3
			TTHB22	conserved hypothetical protein	3.2

注) Locus TagはThermus thermophilus HB8のゲノム(TTHA), メガプラスミド(TTHB), ミニプラスミド(TTHC)上に定位する遺伝子を表す。

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 17 件)

- ① H. Akita, K. Doi, Y. Kawarabayasi and T. Ohshima: Creation of a thermostable NADP(+)-dependent D: -amino acid dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 meso-diaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis, 査読有, *Biotechnol. Lett.*, in press (2012).
- ② K. Doi, Y. Ohyama, E. Yokoyama, T. Nishiyama, Y. Fujino, Y. Nagayoshi, T. Ohshima and S. Ogata: Expression analysis of the spi gene in the pock-forming plasmid pSA1.1 from *Streptomyces azureus* and localization of its product during differentiation, 査読有, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press (2012).
- ③ T. Hirajima, Y. Aiba, M. Farahat, N. Okibe, K. Sasaki, T. Tsuruta and K. Doi: Effect of microorganisms on flocculation of quartz, 査読有, *Int. J. Miner. Process*, **102-103**, 107-111 (2012).
- ④ S. Bai, G. Naren, H. Noma, M. Etou, H. Ohashi, Y. Fujino, K. Doi, Y. Okaue, T. Yokoyama: Silica deposition induced by isolated aluminum ions bound on chelate resin as a model compound of the surface of microbes, 査読有, *Colloid Surfaces B*, **95**, 208-213 (2012).
- ⑤ 藤野泰寛、横山拓史、土居克実、環境応答とバイオミネラリゼーション - 極限環境下における細菌の生存戦略 -、査読無、*生物と化学*, **50**, 175-181 (2012) .
- ⑥ T. Ohmori, Y. Mutaguchi, S. Yoshikawa, K. Doi and T. Ohshima: Amino acid components of lees in salmon fish sauce are tyrosine and phenylalanine, 査読有, *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 256-258 (2011).

- ⑦ H. Akita, Y. Fujino, K. Doi and T. Ohshima: Highly stable meso-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing, 査読有, *AMB Express*, **1**, 43 (2011).
- ⑧ T. Satomura, X. D. Zhang, Y. Hara, K. Doi, H. Sakuraba and T. Ohshima: Characterization of a novel dye-linked L -proline dehydrogenase from an aerobic hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*, 査読有, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1075-1082 (2010).
- ⑨ Y. Mutaguchi, T. Ohmori, H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Doi and T. Ohshima: Visible wavelength spectrophotometric assays of L-aspartate and D-aspartate using hyperthermophilic enzyme systems, 査読有, *Anal. Biochem.*, **409**, 1-6 (2010).
- ⑩ S. Iwai, K. Doi, Y. Fujino, T. Nakazono, K. Fukuda, Y. Motomura and S. Ogata: Silica deposition and phenotypic changes to *Thermus thermophilus* cultivated in the presence of supersaturated silica, 査読有, *The ISME J.*, **4**, 809-816 (2010).
- ⑪ K. Doi, Y. Fujino, T. Ohshima and T. Yokoyama: Characterization of a silica-induced protein in *Thermus thermophilus* related to biosilicification, 査読有, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **74**, A238 (2010).
- ⑫ Y. Fujino, T. Ohshima, T. Yokoyama and K. Doi: Transcriptional analysis of the response to supersaturated silicic acid in *Thermus thermophilus*, 査読有, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **74**, A309 (2010).
- ⑬ K. Doi, Y. Fujino, F. Inagaki, R. Kawatsu, M. Tahara, T. Ohshima, Y. Okaue, T. Yokoyama, S. Iwai, S. Ogata: Stimulation of expression of a silica-induced protein (Sip) in *Thermus thermophilus* by supersaturated silicic acid, 査読有, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2406-2413 (2009).
- ⑭ M. Farahat, T. Hirajima, K. Sasaki, K. Doi: Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior, 査読有, *Colloids Surface B*, **74**, 140-149 (2009).
- ⑮ K. Doi, Y. Nishizaki, Y. Fujino, T. Ohshima, S. Ohmomo and S. Ogata (2009) *Pediococcus lolii* sp. nov., isolated from ryegrass silage, 査読有, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1007-1010 (2009).
- ⑯ 土居克実、九州地方の遺伝子資源の有効活用に向けた基礎研究、査読無、*BIO 九州*, **191**, 11-19.

- ⑰ 岩井覚、緒方靖哉、土居克実、高度好熱性細菌のシリカ鉱物化作用の解明と応用に関する研究、査読無、九州、**193**, 3-6.

〔学会発表〕(計 31 件)

- ① 行本丞太郎、松川博昭、土居克実、大島敏久、乳酸菌由来のアミノ酸ラセマーゼの機能解析、日本農芸化学会 2012 年度大会
- ② 土居克実、岩瀬真、熊谷健太、藤野泰寛、草場俊司、土谷直史、森一樹、田代康介、久原哲、臨海域の熱水中における微生物メタゲノム解析、日本ゲノム微生物学会 2011 年度大会
- ③ K. Doi and T. Ohshima: Role of biosilicification-related protein in *Thermus thermophilus* and its application to nanotechnology, 16th Japanese- German Workshop on Enzyme Technology
- ④ 岩瀬真、藤野泰寛、田代康介、大島敏久、土居克実、*Thermus thermophilus* によるバイオミネラル化作用の形成機序のトランスクリプトーム解析、第 48 回化学関連支部合同九州大会
- ⑤ K. Doi, Y. Fujino, T. Yokoyama and T. Ohshima, Role of biosilicification-related protein in *Thermus thermophilus* and its application to nanotechnology, 11th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (2011)
- ⑥ Y. Fujino, T. Yokoyama, T. Ohshima and K. Doi, Biodeposition of silica in geothermal system: Transcriptional analysis of silica-induced protein, 11th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (2011).
- ⑦ ONG Thi Anh Phuong、藤野泰寛、大島敏久、土居克実、Identification and characterization of lactic acid bacteria from fermented rice bran product, 第 47 回化学関連支部合同九州大会 (2010).
- ⑧ Fujino Y., Ohshima T, Yokoyama T and Doi K., Transcriptional Analysis of the Response to Supersaturated Silicic Acid in *Thermus Thermophilus*, Goldschmidt 2010 (2010).
- ⑨ Doi K., Fujino Y., Ohshima T. and Yokoyama T, Characterization of a Silica-induced protein in *Thermus Thermophilus* related to Biosilicification, Goldschmidt 2010 (2010)
- ⑩ 藤野泰寛、岩井覚、緒方靖哉、大島敏久、土居克実、シリカストレスに対する *Thermus thermophilus* HB8 の応答, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部. 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部. 日本食品科学工学会西日本支部. 合同大会 (2009).
- ⑪ 藤野泰寛、大島敏久、緒方靖哉、土居克実、*Thermus thermophilus* HB8 のシリカ誘

導性タンパク質の発現機構解析、日本生物工学会 2009 年度大会 (2009).

〔図書〕(計 2 件)

- ① 土居克実、門多真理子、左古知行、桜井稔三、緒方靖哉他、京大出版会、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、2010、p. 431-446
- ② 土居克実他、シーエムシー出版、メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収、2009、p. 115-120

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/grt-docs/migt/HP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 克実 (DOI KATSUMI)
九州大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：40253520

(2) 研究分担者

田代 康介 (TASHIRO KOSUKE)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00192170

藤野 泰寛 (FUJINO YASUHIRO)
九州大学・基幹教育院・助教
研究者番号：70582659

