

平成 22 年 4 月 28 日現在

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・生物機能工学研究部門・主任研究員  
研究者番号： 30202336

研究代表者の専門分野： 環境微生物遺伝子資源  
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、機能、特殊環境、汚染環境、海洋

### 1. 研究計画の概要

微生物が保有するインテグロン・ジーンカセット (IGC) 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や汚染環境試料等を対象とし、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。

### 2. 研究の進捗状況

これまでに調査経験をもつ海底熱水系試料や汚染沿岸環境試料等を対象に研究を開始した。その結果、機能遺伝子の効率的な獲得・解析用の新しい手法を開発するとともに、多数の機能遺伝子 ORF を取得した。その一部は、大腸菌での発現実験により生成物レベルで確認、評価した。また、IGC システムの制御因子であるインテグレース (Int) と微生物の系統分類学的位置とを比較解析し、前者の多様性が予想以上に大きいことを明らかにした。採取した IGC-GC は 1~3 個の機能遺伝子 ORF を含む小型のものが大半であったが、10 個以上の大型 GC も取得された。こういった GC 中には、環境条件や汚染物質といった様々なストレスの指標になりそうな GC も見出した。一方、人為汚染の影響が皆無と考えられる外洋のガスハイドレート海域において、海底下 1~200 m から採取した掘削コア試料を対象に、バクテリアやアーキアの多様

性解析を行うとともに、深度と Int や GC との関係解明に取り組んだ。これらの試料からの DNA 抽出は当初困難を極めたが、方法の改良により多くの IGC-GC を取得することに成功、当該試料ではじめてとなる IGC 解析を進めている。また、同試料でのメタン代謝酵素遺伝子の多様性や現存量についてのデータを室内培養実験・化学分析で明らかにした代謝活性データ等と比較、対象海域の特徴を明らかにした。また、海底熱水系での結果を基に、IGC の多様性に関する総説作成に取り組んでいる。

### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。  
独自に開発した PCR 条件は、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効であり、当該システムの構成要素 (attI、Pc、attC 等) についても新しい特徴をいくつか見出すことができた。また、本研究により、当該 IGC システムが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広く分布することが明らかとなったことから、当該システムが培養可能菌株を用いてこれまで明らかにされ考えられてきた以上に古い時代から、細菌類の適応・進化の過程に関与していた可能性が強く示唆された。また、得られた GC 遺伝子 ORF 解析では、抗生物質耐性遺伝子やデハロゲネース、プラスミドキラータンパク、トランスポゼース、ヌクレアーゼ等の有用性が期待できる機能遺伝子を多数見出した。その他取得できた ORF の多くについては機能推定が困難だったことから、本法は新規機能遺伝子を探索する上で極めて有効

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、未解明な環境遺伝子資源の利用といった応用的側面からも意義深い成果をあげており、当初目標を十分に達成している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

これまでに得られている試料の解析と結果の取りまとめを最優先事項とし、残された計画期間内に学術的な意義付けや新しい現象の発掘に努め論文文化を図る。基礎的な側面では、これまでに解析がなされていない特殊環境試料や汚染環境試料で良好な結果が得られており、その全てがはじめての知見であるため、その論文文化により十分な成果が見込まれる。応用的な側面では、通常の網羅的なメタゲノム法とは異なり発現する可能性が高い機能遺伝子 ORF が実際に多数取得できていることから、その有益性の証明が次の課題となっている。このため、共同研究を活用し、二三の代表的なものについて宿主ベクター系をうまく選抜し発現実験を行い、生成物についての機能証明を行う予定である。

将来的には、現在の研究チームの継続を前提に、基礎と応用の両面で新しい展開を図ることが可能である。すなわち、基礎的な側面では、細菌類の適応・進化の問題により深く踏み込む展開が可能である。応用的な側面では、目標とする機能遺伝子を、微生物の純粋分離法を用いることなく環境中から効率的、合目的的に取得する方法の開発に結びつけることが期待できる。また、既存の DB 上にない機能推定不可能な機能遺伝子 ORF が多数得られていることから、これらはバイオインフォマティクス研究者との絶好の共同研究材料と考えられる。現研究チームの主要メンバーが維持できるかどうかによって、将来的な研究推進の方策は異なっている。

#### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 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, 2007, 2298-2312.

(2) 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, in press.

〔学会発表〕(計14件)

(1) 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。

(2) 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。

(3) 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.

(4) 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。

(5) 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.

(6) Kurusu Y, Ochoi M, Saito M. Characterization of Novel Plasmids from *Sphingomonad*. ASM General 109<sup>th</sup> Meeting. May, 2009, Philadelphia, USA.

(7) 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。

(8) 林 宏恵, 久留主泰朗. 深海における細菌由来異常塩基の生成と抑制に関する研究。Blue Earth 2010。2010年3月、東京。

〔図書〕(計1件)

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