

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580117

研究課題名(和文) 次世代シーケンサデータを活用した新規好塩性細菌利用基盤技術の開発

研究課題名(英文) Generic technology for halophilic bacteria using genomic data from next generation sequencer

研究代表者

松井 徹 (Matsui, Toru)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：90372812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：チュニジア乾燥地、緑地帯より分離した中等度好塩性細菌を用いて環境浄化機能(特に石油系化合物分解)を発現させるために基盤技術について検討した。多様な好塩性細菌分離条件最適化、次世代シーケンサによるゲノム情報取得、ベクター構築、形質転換系確立、遺伝子破壊株ライブラリー構築、石油系化合物分解遺伝子の収集などを達成した。今後、好塩濃度条件下での石油分解菌構築・評価を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Generic technology for moderately halophilic bacteria was examined using isolates from various area of Tunisia in order to apply for bioremediation under salinity conditions. Screening conditions for the variety of halophiles, genome analysis using next generation sequencer, plasmid vector construction with transformation, gene disruptant library construction, and collection of petroleum related compounds degradative genes were examined. Construction of petroleum degradation bacteria working under a salinity condition using the above materials is under progress.

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：好塩性細菌 オキシゲナーゼ シデロフォア

1. 研究開始当初の背景

好塩性細菌は生育に NaCl を必要とする原核微生物の一種であり、至適増殖濃度により低度(0.2-0.5M)、中度(0.5-2.5M)に分類される(高度はほとんどが古細菌)。

地球の表面積の 70%を占める海洋に代表される高塩環境水圏では、重金属やタンカー座礁等による流出石油汚染が近年世界的に深刻化しており、早急な対策技術の開発が必要となっているが、好塩性細菌は海洋中(NaCl 0.5M 程度)におけるこれらの自然な浄化に高く寄与していると考えられる。また、高塩濃度環境は、醗酵産業でのバイオリアクター運転において雑菌汚染を防止できるメリットがあり、有用物質の収量向上、滅菌処理コストの削減に役立つと期待されているが、in vivo での遺伝子組み換え、遺伝子解析ツールが不十分であることから、好塩性細菌を宿主とした実用例は極めて少ない。例えば、形質転換技術として一般的な電気パルス法は高塩濃度条件下では不可能なことから、接合法による報告のみである(Llomas et al., 2000)。好塩性細菌の耐塩性機構はグリシンベタインやエクトインなどの低分子化合物(補償溶質と呼ばれる)の代謝生産によることが知られており、一部の好塩性細菌(*Halomonas*, *Halobacillus*, *Nesterenkonia* sp)のエクトイン合成遺伝子などが既に報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、多様な生物資源が期待できる北アフリカ地域チュニジアの各地試料より分離した好塩性細菌、耐塩性細菌に関する環境浄化機能(特に石油系化合物分解)を解析すると共に、新たに見出した遺伝子解析の可能な好塩性細菌 21a 株の遺伝子破壊ライブラリー構築とこれを用いた網羅的遺伝子解析を行う。また、石油分解等の遺伝子を上記菌株に発現させることにより、高塩濃度環境下での石油分解菌を構築する。得られた成果は、これまで試みられることのなかった好塩性細菌、耐塩性細菌の宿主としての産業利用の基盤となる。

3. 研究の方法

・チュニジア環境試料からの好塩性細菌分離
チュニジア国 Borj-Cedria Ecopark 研究所と環境試料の研究利用に関する MOU(Memory of Understanding)契約を行い、チュニジア国内 6 か所 (Fig.1) から 25 サンプルを収集し、各種条件で好塩性細菌探索を実施した。

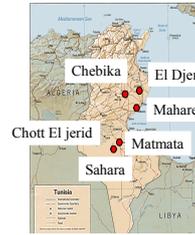


Fig.1 チュニジア国内環境試料収集場所

・培養条件および供試菌株・DNA

好塩性細菌探索には 3 あるいは 10%NaCl を含む 1/10 濃度 LB 培地および SGC 培地の両培地を用いて行い、分離菌多様性の比較を行った(Table 1)。分離菌株の生育に及ぼす NaCl 濃度の影響には、LB 培地あるいは合成培地である No.11 培地 (Matsui et al., 2009) を用いた。

Table 1 Medium compositions for halophiles screening

	0.1%LB+NaCl	SGC
Bacto trypton	1 g	Yeast Extract 10 g
Yeast Extract	0.5 g	Casamino acid 7.5 g
NaCl	30 g or 100g	Citrate·Na ₃ 3 g
D.W.	1 L	KCl 2 g
		MgSO ₄ ·7H ₂ O 20 g
		NaCl 30 g or 100g
		D.W. 1 L

使用した菌株およびプラスミド DNA について Table 2 に示した。

・遺伝子組み換え実験

好塩性細菌の形質転換は Biorad 社 Genepulser X cell を用いて電気パルス法により行った。宿主内のプラスミドベクターの安定性は既報(Matsui et al., 2008)に従って行った。その他の遺伝子組み換え実験は原則として実験書(Sambrook et al., 1989) に準じて行った。

Table 2 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Source of reference
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K m_K), e14 (mcrA), supE44, relA1, ? (lac-proAB)F' [traD36, proAB, lac P, lacZ' M15]</i>	Takara-bio Co.
<i>C. beijerinckii</i>	Type strain	NBRC*
NBRC 103041	Type strain	NBRC
<i>C. marismortui</i>	Type strain	NBRC
NBRC 103155T	Type strain	NBRC
<i>Halomonas</i> sp. 21a	Isolate from soil in Chebika, Tunisia	This study
<i>H. pacifica</i>	Type strain	NBRC
NBRC102220	Type strain	NBRC
<i>H. halodurans</i>	Type strain	NBRC
NBRC14912	Type strain	NBRC
<i>H. halodurans</i>	Type strain	NBRC
NBRC15607	Type strain	NBRC
<i>H. halophila</i>	Type strain	NBRC
NBRC 102604	Type strain	NBRC
<i>H. meridiana</i>	Type strain	NBRC
NBRC 15608	Type strain	NBRC
Plasmids		
pCM1	Cryptic plasmid from <i>C. marismortui</i>	Mellado et al 1995
pHSG298	<i>E. coli</i> cloning vector; Km ^r	Takara-bio Co.
pCCMR1	<i>E. coli</i> - <i>Halomonas</i> sp. shuttle vector harboring 1.6 kb fragment from plasmid pCM1	This study
p17 (blue)	<i>E. coli</i> cloning vector; Ap ^r	Takara-bio Co.
pCR2.1	<i>E. coli</i> cloning vector; Ap ^r , Km ^r	Life Technologies Co.
EZ-Tnp^{KAN-2}	Transposon complex vector; Km ^r	Epicentre Co.

4. 研究成果

・チュニジア環境試料からの好塩性細菌分離
チュニジア各地から採取した環境試料から2種の方法を用いて好塩性細菌の分離を試みた。すなわち、0.1倍濃度のLB培地に高濃度NaClを添加した寒天培地に直接試料を塗抹する方法(I)と、好塩性細菌の培養に使用される高Mg濃度を特徴とするSGC培地にて集積培養後、同一組成の寒天培地にて純粋分離を行う方法(II)で分離細菌多様性の比較を行った。試料の採取場所による分離菌数の比較をTable 3に示したが、(I)法では緑地帯であるChebikaからのみ好塩性細菌が分離され、(II)法では砂漠地帯であるSaharaや塩田地帯であるChott El Jeridからも好塩性細菌が得られた。いずれの方法も好塩性細菌スクリーニングに用いられる方法であるが、今回使用した試料ではII法がより多い菌株を得るためには適切であった。

Table 3 Number of isolates with each medium

Place	0.1*LB+NaCl	SGC
El Djem	0	4
Mahares	0	3
Matmata	0	4
Sahara	0	7
Chott El Jerid	0	12
Chebika	19	4
Grand canyon	0	4
Total	19	38

得られた菌株の16SrRNA配列を用いた系統解析を行い、分離株の多様性を比較した。(I)法ではFig.1に示すようにActinobacteria, Firmicutes, -proteobacteria, -proteobacteriaにわたっていたのに対し、(II)法ではFirmicutes, -proteobacteriaのみであった。(II)法は集積培養のためにSGC培地によく生育する株が優先となった結果と考えられる。

・21a株の性質検討

上記分離株より、塩濃度に対する生育特性から好塩性細菌を選抜し、さらにシデロフォア生産性を示す株として21a株を以下の実験に供した。

本菌株の16SrRNA配列と最も高い相同性を示した菌株は*Halomonas aquamarina* 2PR52-11 (accession number EU440965)であり、99.3%の相同性を示した。

本菌株の生育に及ぼす塩濃度の影響をFig.2に示す。対照とした非好塩性細菌*Pseudomonas putida*の場合は0~3%の狭い範囲で生育を示したのに対し、21a株は1~15%の範囲で生育した。NaCl濃度1~3%の時に最大比増殖速度を示した。以上の結果から、本菌株は中等度好塩性細菌であることが

明らかとなった。

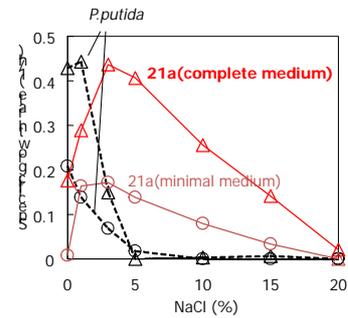


Fig.2 Effect of NaCl concentration on the cellular growth of strain 21a.

・21aの遺伝子組み換え系構築と遺伝子解析
好塩性細菌の宿主ベクター系に関する基盤構築のために既報による情報からプラスミドベクターを作成した。Halomonadaceae family (*Halomonas* spp., *Chromohalobacter* spp.などが含まれる)の内性プラスミドが報告されている*Chromohalobacter marismortui* ATCC17056 (NBRC103155と同一株)の有するpCM1の複製領域をE.coli用プラスミドベクターpCR2.1に連結したpCCMR1を作成し、電気パルス法による形質転換を検討した。得られた形質転換効率結果をTable 4に示す。形質転換可能な宿主域は必ずしも広くはなかったが、一部の*Halomonas* sp.細菌で形質転換株が得られた。遺伝子マーカーであるカナマイシン耐性株からはpCCMR1と同一のプラスミドが検出され、形質転換可能であることが明らかとなった。最近、*Halomonas varibilis*に関する報告(Burch et al., 2013)があったが、電気パルス法による好塩性細菌の形質転換例としては非常に少なく、今後、知見の蓄積が必要である。

Table 4 Transformation of halophilic bacteria with various vector

Vector DNA	Host	Efficiency (cfu/ug-DNA)
pHSG298(Tn903-Km*)	21a	0
pCCMR1(Tn5-Km*)	21a	2.0 × 10
EZ-Tnp⁻KAN-2>(Tn903-Km*)	21a	1.1 × 10 ⁴
pCCMR1	<i>H.pacificus</i> NBRC102220	7.1 × 10 ²
pCCMR1	<i>H.halodenitrificans</i> NBRC14912	6.7
pCCMR1	<i>H.halodurans</i> NBRC15607	0
pCCMR1	<i>H.halophila</i> NBRC102604	0
pCCMR1	<i>H.meridiana</i> NBRC 15608	0
pCCMR1	<i>C.beijerinckii</i> NBRC103041	0

*Genetic marker of the vector

プラスミドベクターを利用した遺伝子組換え菌を産業利用する場合、培養排水の処理から遺伝子マーカーとして通常使用される抗生物質類の添加は避けることが好ましいが、この場合、抗生物質による遺伝子組換え菌の選択圧がないために、培養増殖中の宿主からのプラスミド脱落による生産性低下が課題となっている。そこで21a/pCCMR1株のプラスミド安定性に及ぼす培養条件の影響を検

討した。Fig.3 に示すようにプラスミド安定性は培地成分により明らかに異なり、安定性の高い条件は天然培地 > 合成培地、NaCl 1 % > 5 % であった。天然培地と合成培地の場合のプラスミド安定性の違いは、組換え *E. coli* で報告がある (Matsui et al., 1990 など) が、組換え好塩性細菌のプラスミド安定性が NaCl 濃度により影響を受けるという知見はこれまでになく、培養中の NaCl 濃度を低くすることがプラスミド安定性の改善に有効であることが知られた。

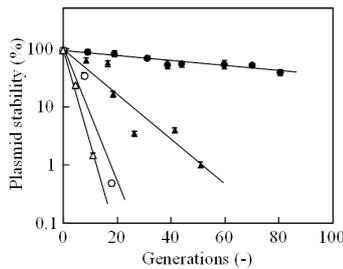


Fig 3. Effect of NaCl conc & medium on plasmid stability of strain 21a harboring pCCMR1 ; LB (1% NaCl), ; LB (5 % NaCl), ; No.11(1 % NaCl), ; (5 % NaCl)

さらに、21a 株はトランスポゾンベクター複合体 (EZ-Trp<KAN-2>) を用いた場合にも形質転換体を得られた。当該ベクターは染色体ランダム挿入型ベクターであるが、染色体へのランダムな挿入が起こっているかどうかを検討した。得られた形質転換体を無作為に 6 クローン選抜し、それぞれのゲノムの PstI 消化物をセルフライゲートした DNA 試料をテンプレートにトランスポゾン遺伝子マーカ配列から設計したプライマーによる inverse PCR を行った結果、異なる鎖長の PCR 産物が得られたことから、トランスポゾン遺伝子マーカが染色体上にランダムに挿入されていることが明らかとなった (データ示さず)。この手法により、21a 株の遺伝子破壊株ライブラリーの構築が可能となり、遺伝子とその機能の関係を検討する遺伝子ツール基盤が確立できた。

次に、上記のようにして得られた遺伝子破壊株クローン約 200 個を用いて Chromoazurolo S-鉄複合体のハロー形成を指標としたシデロフォア活性評価 (Schwyn and Neiland, 1987) を行った。その結果、1 株にシデロフォア生産欠損クローン (I1A10 株とする) が認められたため、さらに詳細な評価を行った。

金属キレート化合物である EDTA 存在下での生育特性を野生株と比較した結果を Fig.7 に示す。野生株はシデロフォアを生産し鉄イオンをキレート化して取り込むために EDTA 存在下でも十分な生育が認められたが、I1A10 株は低濃度の EDTA 添加によっても生育

阻害を受け、シデロフォア機能が欠損していることが示唆された。

さらに I1A10 株のシデロフォア欠損の原因となる破壊遺伝子を検討するため、当該クローンのゲノムに挿入された遺伝子マーカの位置を解析したところ、挿入遺伝子部位のアミノ酸配列は *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 の putative TonB dependent receptor と 70.3 % の高い相同性を示した。TonB dependent receptor はシデロフォアの菌体内への輸送に関係していることが報告されているが、本菌においても TonB dependent receptor がシデロフォア輸送に関わっていることが実験的に証明された。

・次世代 DNA シーケンサによる 21a 株ゲノム解析

21a 株のゲノムデータを取得するために次世代 DNA シーケンサ 454 GS Jr (ロシュ アプライドサイエンス社) を用いて、パイロシーケンシング法による解析を行った。結果概要を Table 5 に示した。平均鎖長 392bp のシーケンシングデータがコンティグ数 296 得られ、ドラフトゲノムデータとしては十分なデータ出力が得られた。また、推定ゲノムサイズは 4.05Mb であり、これまでに報告されている類縁の好塩性細菌 *Halomonas elongata* DSM2581T (4.06Mb)、*Chromohalobacter salexigens* DSM3043 (3.7Mb) と同等のサイズであった。

微生物ゲノムアノテーションのためのパイプラインである MiGAP (Microbial Genome Anotation Pipeline, www.migap.org) によるアノテーションを行い、機能解析の基礎データとした。Table 6 に示すように、好塩性細菌の耐塩性獲得のための適合溶質である エクトインおよびグリシンベタインのそれぞれ生合成遺伝子である ect, bet 遺伝子群が認められた。また、遺伝子破壊株解析により見出された TonB dependent receptor の他にポリケチド生合成関連遺伝子も検出され、これらがシデロフォア生産に関わっているものと推測された (データ示さず)。

Table 5 Sequencer operation data with GS Jr for strain 21a.

Strain 21a	<i>H. elongata</i> DSM2581T	<i>C. salexigens</i> DSM3043
16SrRNA (%identity)	<i>H. aquamarina</i> NBRC101899(99.7)	
Genome size (bp)	4051127	4061296
GC content	60.0	63.6
	296 contig	3696649
Gene count	not available	3555
Total base Length ave.	34,117,854	3409
	392	

Table 6 Genes detected in the genome of strain 21a with the GS Jr analysis.

Gene	Protein	Identity(aa%)	Top match strain
ectA	Diaminobutyrate acetyltransferase	56.48	strainNJ223
ectB	Diaminobutyrate aminotransferase	94.01	strainNJ223
ectC	L-ectoine synthase	82.31	strainNJ223
betA	Choline dehydrogenase	97.49	DSM3043
betB	Betaine aldehyde dehydrogenase	95.09	strainTD01
betI	Transcriptional regulator	96.12	DSM3043

・各種石油関連化合物分解菌の機能評価と遺伝子クローニング

前年度クローニングした芳香族化合物分解遺伝子 nahA に加え、石油関連化合物分解菌の機能評価と分解関連遺伝子の検討を行った。既に分離済みの耐塩性アルカン分解細菌について GC による分解能評価を行ったが、有意な分解が認められず、耐塩性細菌のアルカン分解関連遺伝子を取得することはできなかった。供試菌株の分類結果を Table 7 に示す。

Table 7 List of halophilic alkane degrader.

Strain	Top match (homology %)	Phyrum
TM21-2	<i>Cytophaga sp.</i> (99.7)	CFB
TM21-3	<i>Cytophaga sp.</i> (99.7)	CFB
TM21-5	<i>Vibrio vulnificus</i> (99.9)	-PB
TM21-6	<i>Vibrio vulnificus</i> (99.9)	-PB
TM22-1	<i>Gordonia westfalica</i> (100)	AB
TM22-6	<i>Agrococcus jenensis</i> (98.5)	AB

CFB; CFB group, -PB; -proteobacteria

AB; Actinobacteria

芳香族炭化水素分解細菌 *Pseudomonas putida* HKT554 株の機能評価および生産性向上を目的に当該菌株の高密度培養と微生物変換を検討した。培養条件の最適化により 40 時間で乾燥菌体重量として 114g/l の高密度培養系を構築すると共に本菌株のナフトレンジオキシゲナーゼ触媒活性を利用してチオアニソールから光学活性メチルフェニルスルホキシド(MPSO)の効率的生産を達成した(Fig.4., Ramadhan et al., 2013)。

次に、各種石油関連化合物分解細菌から分解関連遺伝子の取得を試みた。アルカンやテルペン系炭化水素水酸化能を有する *Rhodococcus sp.* 11B 由来の P450 モノオキシゲナーゼ ahp 遺伝子クラスター(2.9kb)、*Mycobacterium sp.* E16 由来のエチレンモノオキシゲナーゼ etn 遺伝子クラスター(4.1kb)を分離した。また、既報の塩基配列を元に *Nocardia coralina* B276 のアルケンモノオキシゲナーゼ(amo)、*Pseudomonas putida* S12 のスチレンモノオキシゲナーゼ(sty)をクローニングした。インドールからのインジゴ生成を指標に nah、sty 遺伝子群の大腸菌での発現を確認した。

さらに、著者が国内土壌試料より分離したアルカン資化性細菌 *Rhodococcus sp.* 11B (Matsui et al., 1995) についてパイロシーケンスによるドラフトゲノム解析を行い、アセンブル、アノテーションを実施した。総塩基数 65Mbp、平均長 454bp、コンティグ数 850 とほぼ期待通りの結果が得られた。炭化水素分解に関連すると推測される P450 遺伝子を抽出したところ、30 近いアイソザイムが検出された。上記 ahp 遺伝子だけでなく、補

酵素酸化還元機能を同一分子に有する self sufficient 型 P450 が見出された。

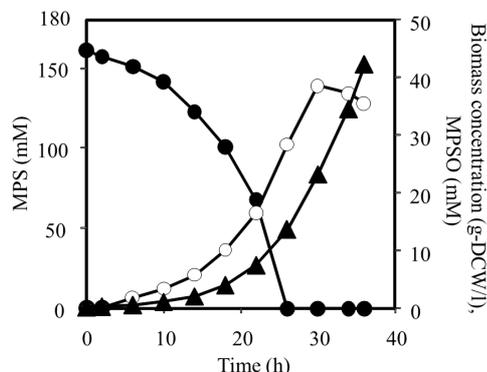


Fig.4. Time course of thioanisole (MPS) consumption and methyl phenyl sulfoxide (MPSO) formation with strain HKT554 grown in HCDC with two-phase reaction. Closed circles: MPS (mM), closed triangles: dried biomass concentration (g/l), open circles: MPSO (mM).

参考文献

- A.Y.Burch, O.M.Finkel, J.K.Cho, S.Belkin, S.E.Lindow, Appl Environ Microbiol. 79:845-852 (2013)
- I.Llamas, M.Argandona, E.Quesada, A. del Moral, Res. Microbiol., 151, 13-18 (2000)
- T.Matsui, H.Sato, S.Sato, S.Mukataka, and J.Takahashi, Agric Biol Chem 54:619-624 (1990)
- T.Matsui, and K.Furuhashi, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1342-1344 (1995)
- T.Matsui, H.Sato, H.Yamamuro, S.Misawa, N.Shinzato, H.Matsuda, J.Takahashi, S. Sato, J Biotechnol 134: 88-92 (2008)
- T. Matsui, K. Kato, T. Namihira, N. Shinzato, and H. Semba, Chemosphere, 76:1278-1282 (2009)
- J.Sambrook, E. F.Fritsch, T.Maniatis, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory (1989)
- B.Schwyn, and J.B.Neilands, Anal. Biochem. 160:47-56 (1987)

5. 主な発表論文等(研究代表者に下線) [雑誌論文](計 1件)

- S. H. Ramadhan, T. Matsui, K. Nakano, H. Minami, High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* strain HKT554 and its application for optically active sulfoxide production. Appl. Microbiol.

Biotechnol., 97:1903-1907 (2013)査読有

〔学会発表〕(計 3件)

(1) T.Matsui, T.Uezu, L. El Bassi, N. Nugara, H. Abdennaceur, H. Isoda, 'Halophilic bacteria isolated from Tunisia and Okinawa., Tunisia-Japan Symposium on Society, Science and Technology, Hammamet, Tunisia (Nov 2013) 査読無

(2) 松井 徹, Nilushi Nugara, 東江菜都美, 上江洲敏子, 磯田博子, 「*E.coli-Halomonas* sp. シヤトルベクターの構築とその性質」(生物工学会、H25年9月、広島) 査読無

(3) 松井徹、青山洋昭、斎藤星耕、新里尚也、松崎吾朗、磯田博子、Hassen Abd-Ennasser、Nilushi Nugara、「チュニジア環境試料からの好塩性細菌分離と454GSJrによるドラフトゲノム解析」(農芸化学会、H24年3月、京都) 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 徹 (MATSUI Toru)

琉球大学熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号： 90372812