

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月18日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651208

研究課題名（和文）超好熱古細菌に感染するウィルスの網羅的解析

研究課題名（英文）Analysis of archaeal viruses infecting hyperthermophilic archaea

研究代表者

吉宗 一晃 (YOSHIMUNE KAZUAKI)

日本大学・生産工学部・准教授

研究者番号：50325700

研究成果の概要（和文）：

古細菌は真核生物、真正細菌とは異なるドメインに分類されるユニークな特徴を持つ生物である。古細菌は独特な酵素遺伝子群を持つため、今後も有用な遺伝子が見出されると期待されている。古細菌に感染するウィルスが持つ遺伝子を解析すればこれまでにない有用な遺伝子が見出されることも予想される。DNAを100°C近い温度を持つ温泉水から採取し精製したDNAをクローニングしてDNAシーケンサーによりその塩基配列を決定するクローン解析を行った。この結果、これまでに報告された遺伝子配列と相同性がほとんど見られない塩基配列を多数得ることができた。これらの塩基配列の由来や機能の解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

Archaea belongs to a major domain of life which is distinct from Eukaryota and Eubacteria. Some unique enzymes from Archaea are applied for biotechnology. Since useful enzymes for gene manipulation often derived from viruses, archaeal viruses may have these useful enzymes. However, only a few viruses infecting archaea are reported, especially those infecting hyperthermophilic archaea are scarcely reported. Here, viruses infecting hyperthermophilic archaea are collected from hot springs having temperatures of more than 80°C where hyperthermophilic archaea are living. Hot spring water having temperatures of near 100 °C in Beppu, Atagawa and Toyako was collected. The obtained water was filtered with 0.22 µm filters and impurities were removed. Viruses in the water were concentrated with 50kDa-filters. DNA was extracted and purified with protease treatment and phenol/chloroform extraction. The purified DNA was subcloned and the DNA sequences were determined to analyze their function.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：複合新領域

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：古細菌、超好熱古細菌、高温温泉、アーキウイルス、ウイルス DNA、クローンライブラリ

### 1. 研究開始当初の背景

古細菌はアーキアとも呼ばれ、真核生物、真正細菌とは異なるユニークな生化学的性質を持つ。このことから古細菌は真核生物、真正細菌とは異なる第三のドメインに分類されている。この様に生物が3つのドメインに分類されてから20年程しか経っていないため、古細菌の研究は他のドメインの生物と比較して相対的にあまり進んでいない。古細菌は真正細菌と同様、核を持たない原核生物であるが、イントロンが存在するなどその生化学的性質の一部は真核生物と共通である。このことから古細菌は真核生物の祖先とも考えられている。

古細菌には高温、低温、高塩濃度、極端な酸性もしくはアルカリ条件、および極端な嫌気環境等の特殊な環境を好んで生育する物が多い。特に80°C以上を好んで生育する生物のほとんどは古細菌に分類される。このため100°C近い高温の温泉中で生育できるのは超好熱古細菌のみであると予想される。超好熱古細菌由来の酵素は真核生物や真正細菌のものよりもはるかに高い耐熱性を持つため、その耐熱性を利用した酵素の応用研究も進んでいる。例えば超好熱古細菌由来のDNAポリメラーゼはPCR酵素として広く利用されている。さらにその高い耐熱性から扱いが容易で研究しやすくタンパク質の立体構造研究のモデルとしてしばしば利用され基礎

研究にも貢献している。

古細菌のゲノムのDNA配列を決定しその遺伝子を真核生物や真正細菌のものと比較するとアミノ酸レベルで高い相同性を持たないものも多く存在する。高い相同性を持つ酵素でも、広い基質特異性を持つものや、他のドメイン由来のものとは全く異なる代謝産物で活性調節を受ける報告もある。代謝系自体も真核生物や真正細菌のものとは異なる場合もある。さらに古細菌の遺伝子には機能未知のものが多く、今後の研究によって有用な機能が見出される可能性もある。

ウイルスは動物、植物、昆虫、糸状菌、マイコプラズマ、原生動物及び、細菌等の宿主細胞内でのみ複製する感染性を持つ分子集合体でDNAもしくはRNAからなるゲノムとそれを取り囲むタンパク質で構成される。ウイルスは宿主に感染するとその遺伝子を改変して増幅するため、その酵素は遺伝子組換え技術に利用されているものも多い。これまでに古細菌に感染するウイルスの存在は知られていなかったが、近年古細菌に感染するアーキウイルスの存在が報告された。古細菌に感染するウイルスの報告例は非常に少なく、特に生育至適温度が80°C以上の超好熱古細菌に感染するアーキウイルスの報告例はほとんど無い。このためユニークな特徴を持つ古細菌に感染するアーキウイルスの機能解析は非常に重要であるため、それらに関

するデータの蓄積が期待されている。これらウィルスの網羅的解析は基礎科学的な分野だけでなく、それらの遺伝子産物を用いた新しい遺伝子組み換え技術などの応用研究にも貢献できる。

## 2. 研究の目的

研究例の少ない生育至適温度が 80°C 以上の超好熱古細菌に感染するウィルスを 100°C 程度の高温環境から探索する。これらウィルスの DNA 配列をクローニングしその DNA 配列を決定する。このため 80°C 以上の温度を有する温泉の源泉から試料を採取する。試料中の DNA は非常に微量であることが予想されるが、それらの DNA を PCR で増幅すること無くそれらの DNA を抽出、精製し、それらのクローンライブラリを作成する。これによって PCR による DNA の偏った増幅を防ぐことができる。クローンライブラリを作成し、試料中の DNA を増幅することで、これらの DNA 配列が決定できるようになる。この手法を用いて超好熱古細菌に感染するウィルスを網羅的に解析することを目的とする。これによってその基礎科学的な分野だけでなく、それら遺伝子産物を用いた応用研究にも貢献できる。

## 3. 研究の方法

試料は100°C近い温度を持つ湧泉水から採取した。高温の源泉を持つ温泉は限られているものの、大分県の別府温泉、神奈川県強羅温泉、静岡県熱川温泉、北海道の洞爺湖温泉等から源泉から直接試料を採取した。得られた試料中に存在するウイルス以外の生物やゴミなどの夾雑物を取り除くため湧泉水を0.22µmのフィルターでろ過した。この試料からウイルスを濃縮するため5nm程度の孔径を持つ50kDaのタンパク質を濃縮するための限

外ろ過膜で1,000倍以上濃縮した。これらウィルスは耐熱性であるためそのDNA抽出は非常に困難である。このため濃縮液をフェノール、クロロホルム及びプロテアーゼを用いて精製してDNAを得た。得られたDNAの両端をT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化した。このDNAをZero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いてpCR-Blunt vectorにクローニングした。DNAシーケンサーによりその塩基配列を決定しデータベースにあるDNA配列と比較した。

## 4. 研究成果

得られた DNA 配列をデータベース中の既知の配列と比較したところ、これまでに報告された遺伝子配列と相同性がほとんど見られない塩基配列を多数得ることができた。高温環境から得られたこれらの DNA 配列は超好熱古細菌に感染するウイルス由来の可能性がある。今後はこれらの塩基配列の由来や機能の解析を進めていく。

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

吉宗一晃, 他, Springer, *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. 2013, 589-610.

[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

吉宗 一晃 (YOSHIMUNE KAZUAKI)  
日本大学・生産工学部・准教授  
研究者番号：50325700