

平成 26 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658083

研究課題名(和文) Virome miningによる極限環境からの遺伝子資源探索法の開発

研究課題名(英文) Bioresource serch from extreme environment with virome mining

研究代表者

土居 克実 (Doi, Katsumi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40253520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：小浜温泉および小松地獄の地熱熱水からのウイルス粒子およびウイルスDNAの探索と単離を行った。その結果、小浜温泉排水口沈殿物からの単離ファージ OH3、OH16、小松地獄地熱熱水からの単離ファージ KJ3、KJ4、KJ5について、プラーク形状、電子顕微鏡観察による形態、宿主域、ゲノム構造および推定ORF、宿主内での複製形態等について性状を解析したところ、すべて、turbid plaqueを形成する繊維状ファージであり、Inovirus科に分類された。それぞれのファージゲノムを比較したところ、ORFは高い相同性を示し、単離地域の違いに関わらず、繊維状ファージには高い類似性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Isolation of thermophilic bacteriophages were carried out with geothermal waters and sediments in hot springs from Obama hot spring and Komatsu-jigoku hot spring. Isolated phages, phi OH3, phi OH16, phi KJ3, phi KJ4 and phi KJ5, were examined with plaque formation, morphology, host range, replication and genome structure. All isolated phages were categorized into Inoviridae, and predicted ORFs on these phages showed high similarities together. These results suggested Thermus filamentous phages are resemble together, regardless of isolating points.

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：phage Thermus Inoviridae replication genome

## 1. 研究開始当初の背景

生命は原始地球の海から誕生し、その形態は RNA であったと考えられているが、現在の地球上ではそれを確認すべき術はない。また、海洋性の地熱熱水からは *Aeropyrum pernix* や *Thermococcus kodakarensis* などの約 90 で生育する超好熱アーキアが分離され、始原生命のモデルとして研究されている。さらに、数種の好熱性微生物からは耐熱性 DNA ポリメラーゼが単離、市販されているように、好熱性微生物の遺伝子資源としての価値は高い。他方、細菌や真核生物と同様、好熱性微生物に感染するウイルスまたはファージの存在が知られ、*Geobacillus* 属、*Thermus* 属や *Sulfolobus* 属のいくつかの株に感染性を示すウイルスが報告されている。一般にウイルスは、その宿主より古い進化を遂げたとされ、特にレトロウイルスと称される RNA ウィルスや一本鎖 DNA ウィルスは生命誕生時の遺伝情報を伝えていると共に様々な細胞に感染し、宿主の進化に関与したと考えられる。しかしアーキアを含む極限環境微生物では RNA ウィルスや一本鎖 DNA ウィルスの報告例はない。

申請者は地熱発電所や温泉から採取した地熱熱水から多数の高度好熱菌に感染するウイルス(バクテリオファージ)を単離し、数種についてゲノム塩基配列の決定を試みた。ところが繊維状ファージ OH3 では、ピロシークエンス法では塩基配列の決定ができなかった。この結果は、OH3 ゲノムがピロシークエンスに不向きな一本鎖核酸をもつことを示唆し、熱水環境中に一本鎖核酸を含むウイルスが存在することが推察できた。

よって、未発見の好熱性微生物を宿主とする RNA ウィルスや一本鎖 DNA ウィルスの存在を推察し、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

地熱熱水を中心とした極限環境から、これまでに報告例のない RNA ウィルスや一本鎖 DNA ウィルスゲノムを収集し、ライブラリーを構築する。得られたウイルスゲノムの塩基配列情報を基に、ウイルスゲノム上にコードされている遺伝子をクローニングして、その特性を解析する。特にバイオテクノロジーや医療検査等で重要な DNA ポリメラーゼや逆転写酵素をはじめとする耐熱性の高い核酸関連酵素群や感染の鍵となる宿主認識に関与するタンパク質、ナノテクノロジーに有用な構造タンパク質等の取得を中心に行って、極限環境下での新たな遺伝子資源の探索と開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 極限環境ウイルスの単離

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を指示菌とし、長崎県小浜温泉(75 °C、pH 7.2)、大分県小松地獄(70 °C、pH 7.5)から採取した温泉水を単離源として二重寒天法を用いて

ファージの単離を行った。

### (2) 表現型解析

ネガティブ染色法を用いて透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。そして *T. thermophilus* HB8 以外の *Thermus* 属細菌および好熱菌を指示菌としてスポットテストを行い、宿主域を決定した。次いで分離ウイルスに対して 50~90 °C で 1 時間の処理および pH3~11 の溶液中で 24 時間の処理、NaCl 濃度 0~5 M の溶液中で 24 時間の処理を行った後に *T. thermophilus* HB8 に感染させ、二重寒天法で形成したプラーク数を基に熱・pH 安定性および耐塩性を検討した。その後、ウイルスを吸着させた *T. thermophilus* HB8 を TM 液体培地中で 70 °C、180rpm で振盪培養し、0~120 分の 10 分毎に培養液を回収し、別に培養した *T. thermophilus* HB8 と混合して二重寒天法を行い、形成したプラーク数を基に一段増殖曲線を作成し、ウイルスの潜伏期、放出期および burst size を明らかにした。

### (3) ゲノム解析

ウイルスを *T. thermophilus* HB8 に感染させ、宿主細胞内で形成されたウイルスの複製型(replicative form; RF)をアルカリ-SDS法を用いて抽出した。その後アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し精製し、pUC19 にライゲーションしたものを大腸菌 DH5 に形質転換した。青白選択を行い、形質転換に成功した菌体からアルカリ-SDS法を用いてプラスミドを抽出・精製し、塩基配列解析に供した。得られたゲノム配列は、Microbial Genome Annotation Pipeline によって構造解析と遺伝子のアノテーションを行った。

さらにアルカリ-SDS法を用いてファージ粒子から一本鎖 DNA を精製し、DIG で標識した 2 種類のプライマーをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、ウイルスゲノムの+鎖 DNA を決定した。

### (4) プロテオーム解析

各ウイルス粒子を精製・濃縮し、超音波破碎を行い、Tricine SDS-PAGE に供して、ウイルスタンパク質を分離した。それぞれのタンパク質バンドを切出し、液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて、各タンパク質のアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列情報は、Mascot データベースと照合・解析し、ファージゲノム上の ORF の塩基配列と照合した。

## 4. 研究成果

### (1) 好熱性繊維状ファージの単離

熱水サンプルを用いてプラッキングを行い、各熱水毎に 20 個のプラークを選択し、同様の操作を 5 回以上繰り返して純化を行った。最終的に 16 種類のファージを単離した。そのうち小松地獄熱水より単離した OH3、

OH16 を、小松地獄熱水から単離した KJ3、KJ4、KJ5 を選択した。それぞれのファージは直径 0.3 ~ 0.6 mm の濁ったプラークである turbid plaque を形成した。

#### (2) 表現型解析

TEM による形態観察の結果、OH3 は長さ約 830 nm、幅約 8 nm、OH16 は長さ約 2.0  $\mu$ m、幅約 8 nm であり、KJ3、KJ4、KJ5 も含め全て繊維状ファージであり、頭部を持たないことから *Inoviridae* 科に属すると考えられた (Fig. 1)。また、スポットテストの結果、OH3 は *T. thermophilus* HB8 のみに完成生を示し、他のファージは HB8 および *T. aquaticus* YT-1 に感染性を示した。

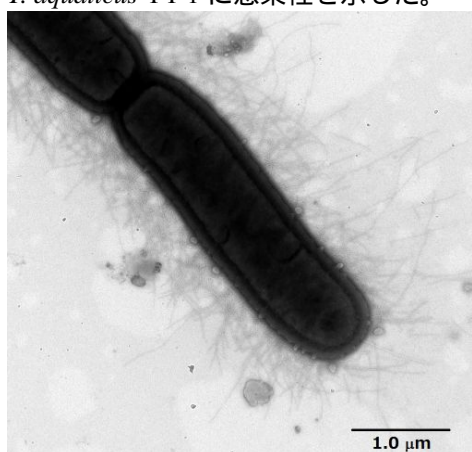


Fig 1. Electron micrograph of

*T. thermophilus* HB8 and  $\phi$ OH16

また、安定性試験の結果、全てのファージは、50 ~ 70  $^{\circ}$ C、pH5 ~ 9、NaCl 濃度 0 ~ 3 M の処理に対して安定であり、幅広い環境に対して安定であることが示唆された。また、一段増殖曲線から、潜伏期間は 50 ~ 60 分、放出期間は 30 ~ 40 分、burst size は 100 ~ 109 PFU/cell であった。

#### (3) ゲノム解析

塩基配列解析の結果、OH3、OH16、KJ3、KJ4、KJ5 のゲノムサイズはそれぞれ、5,688、6,533、5,687、5,651、5,687 bp であり、Replication initiation factor や Minor coat protein など 6 ~ 7 個の ORF が推定された。これらの中で、OH16 のみが、Transposase 遺

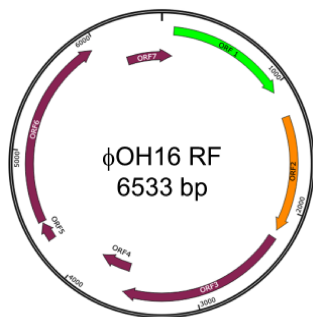


Fig 2. Estimated ORFs on the genome of  $\phi$ OH16

伝子を保有していた (Fig. 2)。これらの ORF に関してホモロジー検索を行ったところ、アミノ酸レベルでのみ *Thermus aquaticus* Y51MC23 ゲノムとのみアミノ酸配列レベルで高い相同性を示すものの、既知遺伝子と塩基配列レベルでの有意な相同性は認められず、新規遺伝子をコードしていると考えられた。

#### (4) プロテオーム解析

Tricine SDS-PAGE から分離した OH3、OH16 タンパク質をそれぞれゲルから切出し、LC-MS/MS による解析を行った (Fig. 3)。解析

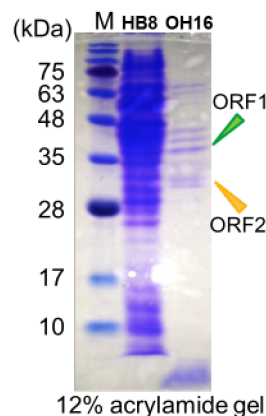


Fig 3. SDS-PAGE analysis of the  $\phi$ OH16 virion proteins

できたアミノ酸配列と解読済みのゲノム配列とを比較し、それぞれの ORF がコードしているタンパク質を同定した。

#### 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 19 件)

- R. Ogura, T. Wakamatsu, Y. Mutaguchi, K. Doi and T. Ohshima: Biochemical characterization of an L-tryptophan dehydrogenase from the photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*, *Enzyme Microb. Tech.*, 査読有, 2014, 印刷中
- T. H. Bang, H. Suhara, K. Doi, H. Ishikawa, K. Fukami, G. P. Parajuli, Y. Katakura, S. Yamashita, K. Watanabe, M. K. Adhikari, H. K. Manandhar, R. Kondo and K. Shimizu: Wild mushroom in Nepal: Some potential candidates as antioxidant and ACE inhibition sources, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 査読有, 2014, Article ID 195305
- H. Akita, H. Suzuki, K. Doi and T. Ohshima: Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 査読有, Vol. 98, No. 3, 2014, 1135-1143.
- H. Suzuki, K. Wada, M. Furukawa, K. Doi

- and T. Ohshima: A ternary conjugation system to construct DNA libraries in *Geobacillus kaustophilus* HTA426, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, Vol. 77, No. 11, 2013, 2316-2318.
- K. Doi, K. Mori, H. Martono, Y. Nagayoshi, Y. Fujino, K. Tashiro, S. Kuhara and T. Ohshima: Draft Genome Sequence of *Geobacillus kaustophilus* GBlys, a lysogenic strain with bacteriophage φOH2. Genome A. 査読有, Vol. 1, 2013, e00634-13.
- T. Wakamatsu, C. Higashi, T. Ohmori, K. Doi and T. Ohshima: Biochemical characterization of two glutamate dehydrogenases with different cofactor specificities from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. Extremophiles, 査読有, Vol. 17, No. 3, 2013, 379-389.
- Y. Mutaguchi, T. Ohmori, H. Akano, K. Doi and T. Ohshima: Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids, SpringerPlus, 査読有, Vol. 2, 2013, 691.
- Y. Mutaguchi, T. Ohmori, T. Wakamatsu, K. Doi, and T. Ohshima: Novel amino acid racemase, isoleucine 2-epimerase, from *Lactobacillus* species: Identification, purification and characterization, J. Bacteriol., 査読有, Vol. 195, No. 22, 2013, 5207-5215.
- K. Doi, Y. Nishizaki, H. Kimura, M. Kitahara, Y. Fujino, S. Ohmomo, T. Ohshima and S. Ogata: Identification of thermo tolerant lactic acid bacteria isolated from silage prepared in the hot and humid climate of Southwestern Japan, SpringerPlus, 査読有, Vol. 2, 2013, 485.
- K. Doi, K. Mori, Y. Mutaguchi, K. Tashiro, Y. Fujino, T. Ohmori, S. Kuhara and T. Ohshima: Draft Genome Sequence of D-branched-chain amino acids producing *Lactobacillus otakiensis* JCM 15040<sup>T</sup> isolated from a traditional Japanese pickle, Genome A., 査読有, Vol. 1, 2013, e00546-13.
- K. Doi, O. T. A. Phuong, F. Kawatou, Y. Nagayoshi, Y. Fujino and T. Ohshima: Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice bran product, Adv. Microbiol., 査読有, Vol. 3, 2013, 265-272.
- J. Kobayashi, Y. Shimizu, Y. Mutaguchi, K. Doi and T. Ohshima: Characterization of D-amino acid aminotransferase from *Lactobacillus salivarius*, J. Mol. Catal. B: Enzym., 査読有, Vol. 94, 2013, 15-22.
- K. Doi, K. Mori, K. Tashiro, Y. Fujino, Y. Nagayoshi, Y. Hayashi, S. Kuhara and T. Ohshima: Draft Genome Sequence of *Pediococcus lolii* NGRI 0510Q<sup>T</sup> isolated from ryegrass silage, Genome A., 査読有, Vol. 1, 2013, 00156-12.
- 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, Appl. Microbiol. Biotechnol., 査読有, Vol. 95, No. 3, 2012, 707-716.
- 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. Colloid Surfaces B, 査読有, Vol. 95, 2012, 208-213.
- T. Hirajima, Y. Aiba, M. Farahat, N. Okibe, K. Sasaki, T. Tsuruta and K. Doi: Effect of microorganisms on flocculation of quartz, Int. J. Miner. Process., 査読有, Vol. 102-103, 2012, 107-111.
- Y. Zhao, T. Wakamatsu, K. Doi, H. Sakuraba and T. Ohshima: A psychrophilic leucine dehydrogenase from *Sporosarcina psychrophila*: Purification, characterization, gene sequencing and crystal structure analysis, J. Mol. Catal. B: Enzym., 査読有, Vol. 83, 2012, 65-72.
- T. Ohmori, Y. Mutaguchi, K. Doi and T. Ohshima: Effects of alkali or acid treatment on the isomerization of amino acids, J. Biosci. Bioeng., 査読有, Vol. 114, No. 4, 2012, 457-459.
- 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, Biotechnol. Lett., 査読有, Vol. 34, No. 9, 2012, 1693-1699.
- 藤野泰寛、横山拓史、土居克実：環境応答とバイオミネラルリゼーション -極限環境下における細菌の生存戦略-、生物と化学、査読無、50巻、175-181。
- 〔学会発表〕(計 件)
- 相川浩輝、永吉佑子、藤野泰寛、大島敏久、土居克実：小浜温泉より単離した *Thermus* 属繊維状ファージの特性解析。日本生物工学会九州支部大会、2013年12月7日、佐賀大学
- 大森勇門、牟田口祐太、守崎香菜、土居克実、大島敏久：発酵食品に含まれるアミノ酸の研究、農芸化学会中四国支部第16回若手シンポジウム、2013年11月2日、高知大学
- 若松泰介、芦内誠、土居克実、大島敏久：

超好熱菌の2つのNAD(P)-グルタミン酸脱水素酵素の機能開発、ビタミンB研究協議会、2013年11月2日、名古屋・ウインクあいち

牟田口祐太、大森勇門、若松泰介、土居克実、大島敏久：乳酸菌 *Lactobacillus* 属由来新規酵素、イソロイシン 2-エピメラゼ、日本生物高分子学会 2013 年度大会、2013 年 10 月 19 日、常翔学園大阪センター

大森勇門、牟田口祐太、守崎香菜、土居克実、大島敏久：発酵食品中の D-アミノ酸分析とその由来、日本生物高分子学会 2013 年度大会、2013 年 10 月 19 日、常翔学園大阪センター

鈴木宏和、和田圭介、古川恵、土居克実、大島敏久：三者接合法による *Geobacillus kaustophilus* HTA426 への高効率プラスミド導入、日本生物工学会第 65 回大会 2013 年 9 月 18 日、広島国際会議場

安部友昭、鈴木宏昭、土居克実、大島敏久：藍菌由来好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のインジゴカルミン還元酵素の機能解析、日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区合同大会 2013 年度合同広島大会、2013 年 9 月 6 日、広島県立大学

Martono Hindra、永吉佑子、藤野泰寛、大島敏久、土居克実：小浜温泉より単離したファージ OH2 由来耐熱性溶菌酵素の特性解析、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013 年 7 月 6 日、北九州国際会議場

土居克実、森一樹、田代康介、藤野泰寛、久原哲、大島敏久：サイレージ乳酸菌 *Pediococcus lolii* NGRI 0510Q<sup>T</sup> のゲノム構造解析、日本生物工学会 2012 年度大会、2012 年 10 月 24 日、神戸国際会議場  
熊谷健太、永吉佑子、藤野泰寛、大島敏久、土居克実：地熱環境より分離した *Thermus* 属繊維状ファージの性状解析、日本生物工学会 九州支部大会、2012 年 12 月 01 日、別府大学

吉国翔一、若松泰介、土居克実、松本広重、大島敏久：色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を用いた L-プロリン電池の開発、日本生物工学会 九州支部大会、2012 年 12 月 01 日、別府大学

〔図書〕(計 2 件)

K. Doi and Y. Fujino, Springer, NY, Biomineralization in geothermal environment, *In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles* edited by T. Satyanarayana, J. Littlechild and Y. Kawarabayasi, 2013, 233-247.

大島敏久、土居克実、地熱発電所と微生物、「環境と微生物」、日本微生物生態学

会編、2014、217-218.

〔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

<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