

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660069

研究課題名(和文) 土壌メタトランスクリプトーム解析に基づく新規抗生物質生産遺伝子のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening for new genes involved in antibiotics production from soil-metagenome using metatranscriptomic analysis

研究代表者

藤井 毅 (FUJII, Takeshi)

独立行政法人農業環境技術研究所・その他部局等・研究領域長

研究者番号：00354100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キチンの添加により土壌中で生育している放線菌の抗生物質生産関連遺伝子群の発現が活性化されるという申請者が見いだした最新の知見に基づき、これまで手つかずだった培養が困難な土壌微生物に着目し、メタトランスクリプトーム解析技術等を駆使してメタゲノムから新規抗生物質生産に関与する遺伝子断片の取得を目指す。

研究成果の概要(英文)：The applicant has found that the expression of antibiotic production-related genes of *Streptomyces coelicolor* growing in soil was activated by the addition of chitin. Based on this finding, in this study, the antibiotic production-related genes which expression is activated in soil after addition of chitin will be analyzed by sequencing RNA extracted from soil amended with chitin. The aim of this study is to get the genes that are involved in new antibiotics produced in soil by soil microorganisms.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：放線菌 抗生物質 キチン 転写誘導 メタトランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

放線菌などの土壤微生物に代表される環境中の微生物が二次代謝産物として産生する抗生物質が、人類の健康や福祉に多大な貢献を果たしていることは周知の通りであるが、これまでその探索は、例えば土壤微生物の場合、微生物の生息場所である土壤を分離源として希釈平板法によって出現したコロニーを選択し、純粋培養を行った後、得られた分離株の抗生物質の産生性を調べる方法によって行われてきた。しかしながら、こうした方法は、作業が煩雑で困難な上、効率が悪いことに加え、近年では、長年にわたる探索努力の結果から、新たに見出される抗生物質が既に知られている物質であるといったことが多い。また、土壤中には極めて多種多様の微生物が生息しているが、そのうち培養が可能な微生物はせいぜい1%程度といわれており、残りの約99%は培養が困難な微生物である。従って、培養が困難な土壤微生物については、上記のようなこれまでの方法ではその抗生物質の産生性を調べることができないことから、探索が手つかずの状態にある。こうした中、近年、99%の難培養微生物が持つこれまでにない新規有用機能遺伝子に脚光が集まっており、こうした難培養微生物の有用遺伝子にアクセスする手段の一つとして、環境中から直接抽出したDNA(メタゲノム)やRNA(メタトランスクリプトーム)が注目を集めている。

申請者は、早くから土壤メタゲノムや土壤メタトランスクリプトームに着目し、土壤メタゲノムからの有用遺伝子の選抜および取得法を開発すると共に(Wang Y, *et al.*, 2012, *Appl Microbiol Biotechnol*, 96: 793-802, Morimoto S, *et al.*, 2009 *Appl Microbiol Biotechnol*, 83: 389-396)、これまで困難であった黒ボク土からの土壤RNAの抽出法を開発し、マイクロアレイ等を用いて土壤微生物の遺伝子発現解析に成功している(Nazari B, *et al.*, 2011, *FEMS Microbiol Ecol* 77: 623-6353, Nazari B, *et al.*, 2012, *Appl Environ Microbiol*, 79: 707-713)。また、最近申請者は、土壤中で生育している放線菌において、これまで生産が確認されているものはもちろん、通常液体培地では発現しない複数の抗生物質生産関連遺伝子群の発現がキチンの添加により活性化される現象を見だし(Nazari B, *et al.*, 2012, *Appl Environ Microbiol*, 79: 707-713)。同様の抗生物質生産活性化機構は、広く土壤微生物全般に普遍的に存在するという仮説を立て、本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

新規抗生物質の発見は人類の健康と福祉に多大な貢献をしてきたが、長年の探索努力の結果、最近では折角スクリーニングしても既知の物質であることが多く、新たな抗生物質探索源とスクリーニング法の開発が求め

られている。本研究では、キチンの添加により土壤中で生育している放線菌の抗生物質生産関連遺伝子群の発現が活性化されるといふ申請者が見いだした最新の知見に基づき、これまで手つかずだった培養が困難な土壤微生物に着目し、メタトランスクリプトーム解析技術等を駆使してキチンを添加した土壤に特異的に発現する mRNA を取得・濃縮し網羅的な配列解析を行い、メタゲノムから新規抗生物質生産に關与する遺伝子断片の取得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 土壤の培養実験

愛媛県の畑土壤(Wang Y, *et al.*, 2008, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(3): 694-701)を供試土壤とし、最大含水量60%となるように、コロイダルキチンと純水を用いて、土壤の水分含量を調整した。コロイダルキチンは、キチンパウダーを塩酸で可溶化後純水で洗浄し、pHを7に調整、最終濃度を0.2%(W/W)となるように土壤に添加して、30で培養した。

(2) 土壤からの RNA 抽出

コロイダルキチンを添加、あるいは非添加の土壤を30で培養を開始した土壤から経時的に、2gの土壤を採取し、Nazariらの方法を用いて土壤から高純度のRNA(土壤メタトランスクリプトーム)を抽出した(Nazari *et al.*, 2011, *FEMS Microbiol Ecol* 77: 623-635)。

(3) 土壤抽出 RNA を鋳型とした *pks* 遺伝子断片の増幅

様々な抗生物質の骨格の基本となるポリケタイドの合成酵素遺伝子(*pks*)の発現を広く検知することができるプライマーを取得するため、*pks* 遺伝子の保存性の高い部分を標的に、PCRによって様々な微生物由来の多様な*pks* 遺伝子を検出できる縮重プライマーをデザインした。この縮重プライマーを用い、コロイダルキチンを添加した土壤から抽出したRNAを鋳型にRT-PCRを行い、土壤微生物の抗生物質生産関連遺伝子群の発現を検出した。

(4) 土壤メタトランスクリプトームから抽出した *pks* 配列の網羅的な配列解析

土壤から直接抽出した mRNA から *pks* 遺伝子特異的な縮重プライマーを用いて得られた cDNA 断片を、エマルジョン PCR で増幅し次世代シーケンサーを用いて網羅的な配列解析を行った。

4. 研究成果

(1) 土壤における抗生物質生産関連遺伝子のキチンによる転写活性化

これまでの研究で、滅菌土壤中で生育している放線菌 *Streptomyces coelicolor* の抗生物

質生産関連遺伝子群の発現が、キチンによって誘導されることが明らかになった。この知見の普遍性を検証することを目的に、生土壌にキチンを添加した場合、そこに生息する土壤微生物の抗生物質生産関連遺伝子の発現が誘導されるか否かを検討するため、土壌から直接抽出した RNA (メタトランスクリプトーム) 中の抗生物質生産関連遺伝子の転写産物の検出を試みた。

その結果、キチンパウダーから調整したコロイダルキチンを添加した土壌と添加しなかった土壌を 2 日間 (48 時間) 及び 3 日間 (72 時間) 保温した土壌から RNA を抽出し、それを鋳型にして縮重 RT-PCR を行い抗生物質生産関連遺伝子 (抗生物質の分子骨格の基本となるポリケチドの合成酵素遺伝子) (*pks*) を増幅した。その結果、コロイダルキチンを添加した 2 日後及び 3 日後の土壌からのみ増幅断片が得られた (図 1)。この結果から、土壌に生息する微生物の抗生物質生産がキチンの添加により活性化されたことが明らかとなった。

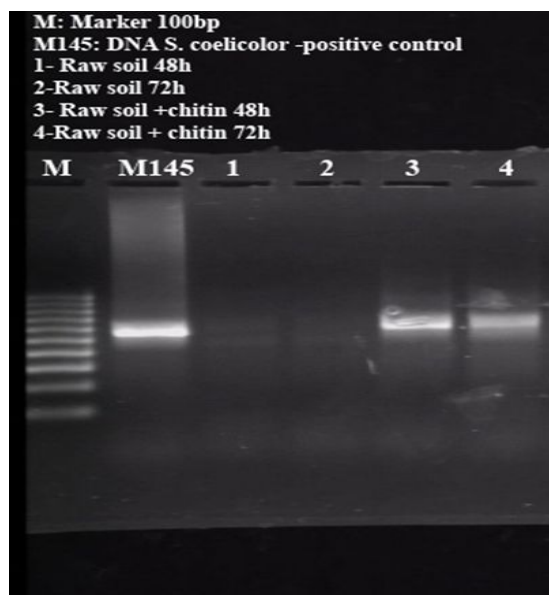


図 1 キチンの添加によって土壌中で活性化される抗生物質生産関連遺伝子の発現

コロイダルキチンを添加しなかった土壌とコロイダルキチンを添加した土壌を 2 日間 (48 時間) (それぞれレーン 1 とレーン 3) 及び 3 日間 (72 時間) (それぞれレーン 2 とレーン 4) 培養した土壌から RNA を抽出した。それぞれ抽出した RNA から逆転写反応で cDNA を合成し、RNA を鋳型に *pks* 特異的プライマーを用いて転写産物を増幅したところ、キチンを添加した土壌からのみ、増幅断片が得られた (レーン 3 とレーン 4)。

(2) 土壌抽出 RNA を鋳型とした *pks* 遺伝子断片の増幅

キチン添加後 48 時間保温した土壌から得られた RNA から増幅した *pks* 遺伝子の PCR 産物を、大腸菌にクローニング、得られたクローンの DNA 塩基配列を解析した結果、既知 *pks* 遺伝子配列に相同性を有する様々な配列バリエーションを持つ新規の *pks* 遺伝子の部分

配列であることが明らかとなった。この結果から、キチンを土壌に添加することで、土壤微生物に由来する様々な新規抗生物質生産関連遺伝子の発現が活性化されることが示唆された (図 2)



図 2 増幅された遺伝子断片の配列

増幅された遺伝子断片の 1~60p の部分配列を示す。配列を解析した 32 個のクローンには共通性の高い配列から他の配列とは相同性が低い配列までいろいろな配列が存在することが明らかとなった。

この結果は、最近行き詰まっている新規抗生物質の探索研究に、これまで手つかずであった土壌中に生息する難培養微生物という新たな探索源と、土壤メタトランスクリプトームから新規抗生物質生産遺伝子群を得るという全く新しい、抗生物質探索法を提供する可能性を示すものであり、当初の作業仮説が正しかったことが確認できた。

(4) 土壌メタトランスクリプトームから抽出した *pks* 配列の網羅的な配列解析

キチン添加後 2 日後の土壌から抽出した RNA について、リボソーム RNA を除去し mRNA から、次世代シーケンサーを用いてメタトランスクリプトーム配列解析を行った。その結果、残念ながらキチンを添加した土壌に特異的に発現する *pks* 産物を検出することはできなかった。そこで、縮重 PCR によってキチン存在下特異的増幅してくる *pks* 産物を次世代シーケンサーで配列解析を試みた。しかし、短い部分配列やギャップを持つ *pks* 様配列は得られるものの、機能している *pks* と考えられる適度な長さを持つ配列を得ることはできなかった。おそらく縮重 PCR で得られた産物の GC 含量が高く、エマルジョン PCR 反応がうまく進行しなかったことが原因と考えられた。

本挑戦的萌芽研究では、新規 *pks* の候補配列の網羅的な取得はできなかったが、今後、経常研究費等、他の研究費を用いて引き続き土壌中でキチン存在下特異的に発現が誘導される抗生物質生産遺伝子群の解析を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

飯野 藤樹, 藤井 毅 他、土壤環境下における放線菌キチナーゼ遺伝子群と抗生物質生産関連遺伝子群の発現誘導、2014、環境微生物学会合同大会

藤井 毅、土壤抽出 RNA から明らかになった抗生物質生産遺伝子の土壤における誘導発現、2014、農業環境技術研究所公開セミナー「核酸から見えてきた農業に役立つ微生物の生態と機能」

Yong Wang, Takeshi Fujii 他、Development of a novel approach for RNA extraction from various soils and its application to the detection of *amoA* gene expression in Andosols、2013、Third International Conference on Nitrification (ICoN3), 55

〔図書〕(計1件)

Yong Wang, Takeshi Fujii 他、NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC. Fulvic and Humic Acids: Chemical Composition, Soil Applications Subtotal and Ecological Effects、The Influence of Humic Acids on the Research in Molecular Ecology、2015、pp.73-107

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：抗生物質生産関連遺伝子のスクリーニング方法

発明者：藤井 毅、ナザリ ベナム

権利者：独立行政法人農業環境技術研究所

種類：特許

番号：特許願 2014-042420 号

出願年月日：平成26年3月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

ベナムナザリ、藤井 毅、土壤環境下、放線菌の抗生物質生産遺伝子群の発現がキチンによって誘導される

http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result29/result29_38.html

藤井 毅 他、これまで困難だった黒ボク土壌からの RNA 抽出法の開発

http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/result/result29/result29_36.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 毅 (FUJII Takeshi)

独立行政法人 農業環境技術研究所・生物
生体機能研究領域・研究領域長

研究者番号：00354100