高圧, 低温に適応する深海由来好圧好冷性微生物 *Shewanella violacea* DSS12 株の全ゲノム解析

Whole-genome analysis of deep-sea piezophilic and psychrophilic bacterium, *Shewanella violacea* strain DSS12

近畿大学工学部生物化学工学科
仲宗根 薫 Kaoru NAKASONE

Key words: deep-sea bacterium; piezophile; psychrophile; *Shewanella violacea* strain DSS12; whole-genome analysis

1. はじめに

地球表層の70%は海洋でそのほとんどの海域が深度1000 mを超える「深海環境」である。また深海底の温度は1~3℃であり、恒常的な高水圧下と低温下の環境であるといえる。このような環境から分離される微生物は、高圧や低温環境に適応した特徴を有するものが多い¹⁾。近年の有人潜水調査船などを利用した調査・研究により、現場環境に適応する深海微生物の多様性、生理学的また生化学的特徴が明らかになってきた^{2), 3)}。なかでも好圧好冷性微生物は、高圧と低温環境に適応した微生物の典型例である。ここで好圧性とは、大気圧下(1気圧)よりも高圧下(200気圧以上)での増殖速度が、また好冷性とは、中温域(20~40℃)よりも低温域(0~20℃)での増殖速度が速い性質として定義する。すなわち好圧好冷性微生物は、中温域よりも低温域を、常圧下よりも高圧下を好む微生物の総称である。*Shewanella violacea* DSS12株は、琉球海溝・深度約5100 mの低泥から分離された、300気圧および8℃に生育至適を有する、典型的な好圧好冷性細菌である(図

1)。本菌株は、大腸菌と近縁な真正細菌であることが明らかにされている^{4), 5)}。また大腸菌と系統上非常に近いとはいえ、その好圧性と好冷性は大腸菌と比べ著しく異なっており、これまで本菌株は微生物の高水圧および低温環境への適応機構を研究するためのモデル微生物として扱われてきた。

微生物ゲノムは、病原微生物を中心に解析が進められており、産業上有用な極限環境微生物では、高温環境に適応した(超)好熱始原菌の解析が活発である。しかしながら、これまで高圧・低温環境に適応する微生物のゲノム解析は皆無であった。本稿では、深海由来好圧好冷性細菌 *Shewanella violacea* DSS12株のこれまでの研究の経緯とその有用性を概観し、本菌株の全ゲノム解析の意義について解説したい。

細胞分裂機構の解析

圧力および低温は、海洋では極めて普遍的物理的因子であり、それを生物がどのようにして認識し、適応しているかを分子レベルで理解することは、基礎研究のみならず、応用研究として深海微生物の遺伝子資源の有効な利用を考えるうえでも非常に重要である。

圧力が微生物に与える影響として増殖抑制以外に細胞形

図1 好圧好冷性細菌 *S. violacea* DSS12 株の比増殖速度(μ)と圧力, 温度との関係
Aは好圧性細菌としての, Bは好冷性細菌としての性質を示している^{4), 5)}。

図2 DSS12株の圧力下における細胞分裂機構

大腸菌は高圧力下では、分裂阻害を起こしその形態は長く伸びていく一方、DSS12株では分裂阻害が起きず、その形態に変化はない⁶⁾。

態にも変化を与える。図2は、DSS12株と大腸菌の細胞分裂の様子を、常圧下(0.1 MPa)と高圧下(50 MPa)で比較したものである。顕微鏡観察から、大腸菌は高圧力下では、分裂阻害を受けその形態は長く伸びていく一方、DSS12株では分裂阻害を受けず、その形態に変化はないことが観察される。さらに、細胞分裂時に重要な役割を果たすタンパク質の一つ FtsZ タンパク質を免疫蛍光染色法によって顕微鏡観察したところ、中央に集合・配列すべき FtsZ は、高圧下では、大腸菌 FtsZ は規則正しく集合(リング形成)できないのに対し、DSS12株 FtsZ は、常圧下と同じように規則正しく配列していることが明らかとなった。この観察結果は、高圧力下での大腸菌の分裂阻害は、FtsZ によるリング形成の阻害と密接な関係を有しているものと解釈される⁶⁾。すなわち、DSS12株 FtsZ は、大腸菌 FtsZ と比べ、高圧力の影響を受けず、相互作用が可能なのである。

深海微生物の脂肪酸組成の変化

圧力増加と温度低下は、細胞膜の流動性に対し類似の物理的効果を示す。生物の増殖温度の低下、または増殖圧力の増加に伴い、細胞膜は、流動性を有する状態から流動性のない状態へと可逆的变化を受ける。実際これまでに深海の微生物が高圧および低温環境に対する適応戦略の一つとして、細胞膜内の不飽和脂肪酸の割合を増加させることが観察されている。

Kato & Nogi は、12種類の *Shewanella* 属細菌の脂肪

酸組成の変化とその表現型との相関関係について解析を行い、*Shewanella* 属細菌は、*Shewanella* group 1 と *Shewanella* group 2 の亜属(sub-genus)に分類が可能であることを提唱した⁷⁾。この提案は、group 1 は大量の EPA (20:5 ω3) (全脂質の 11~16%) を生産し、group 2 は EPA を生産しない。この概念から、group 1 は高圧および低温に適応した細菌であり、一方 group 2 のほとんどが、mesophilic または圧力感受性であるということを意味している。

脂肪酸組成の圧力変化も、加圧下での特異的な遺伝子発現によって引き起こされたものと解釈され、圧力応答遺伝子の発現調節機構研究の重要性も同時に示唆しているといえよう。

高圧下における遺伝子発現機構の解析

高圧下における遺伝子発現機構の解析は、80年代後半に初めて報告された⁸⁾。米国の Bartlett らは深海由来好圧好冷性細菌 *Photobacterium profundum* SS9 株より加圧応答する遺伝子 *ompH* をクローニングし、圧力に対する応答現象を解析した⁸⁾。また日本においては加藤らが、日本近海深海域より数多くの好圧性細菌を分離し⁴⁾、加圧に応答し発現する遺伝子オペロンやプロモーターについて報告している^{9), 10)}。

さらに筆者らは、DSS12株よりさまざまな遺伝子をクローニングし、その加圧応答機構の解析を進めてきた。わ

図3 DSS12株の圧力下における遺伝子発現機構
圧力応答遺伝子プロモーター領域に相互作用する因子群, および遺伝子発現のモデルの一例¹¹⁾。

われわれは σ 因子と転写因子に注目し、 σ^{54} 因子を活性化する転写因子NtrBおよびNtrCが本菌株の加圧応答の制御に特に重要な役割を担う因子であることを報告してきた^{11)~13)}。そこで、 σ^{54} 因子により制御されていることで知られている *glnA* オペロン上領域の解析を行ない¹⁴⁾、これら因子群とプロモーター配列の予想される相互作用を加圧応答のモデルとして提案した (図3)¹⁵⁾。

有用微生物としての DSS12 株

Shewanella 属細菌は、主に水界において温帯域から極域にかけて非常に広範囲に分布しているおり、嫌気呼吸によってFe(III)やMn(IV)などの金属類を還元するほか、一部の菌種ではCr(VI)やU(VI)を還元して無毒化したり、有機塩素化合物の脱ハロゲン化を行う能力を有することから、バイオレメディエーションに有効な細菌として非常に注目を集めている。本菌株はEPAや細胞外プロテアーゼなどを生産することがすでに知られており、また*Shewanella*に属することから有毒物質を還元して無毒化する機能を有することも予測される。本菌株は、上記のように、高圧力下および低温下における細胞分裂や遺伝子発現機構など、さまざまな視点から研究が進められてきており、有用微生物としての側面も持ち合わせている。このような背景から、これまでの遺伝子発現機構に関する知見をゲノム上の分子ネットワークのレベルにまで拡張し、さらに本菌株が生産する有用物質の大量生産法の開発も視野に入れ、複数の研究室によるコンソーシアムにより、本菌株の全ゲノム解析を開始した。

S. violacea DSS12 株の全ゲノム解析

S. violacea DSS12 株全ゲノム塩基配列決定に先立ち、

第一段階として解析の指標となるゲノムサイズの推定を行った。ゲノムサイズの決定にはパルスフィールドゲル電気泳動を利用した。検出された断片の本数・サイズを解析した後、それらの総和からゲノムサイズを推定したところ、本菌株は約4.8 Mbのゲノムサイズを有することが明らかとなった。また、リボソームRNAオペロン中23S rRNAの塩基配列を認識し切断する制限酵素 *I-CeuI* (5'-TAAC-TATAACGGTCCTAA/GGTAGCGA-3')により、本菌株の染色体DNAが12本のDNA断片に分画されたことから、本菌株には12個のリボソームRNAオペロンが存在していることも同時に明らかとなった。原核生物リボソーム合成はrRNAの合成量が律速となっているため、細菌の増殖とrRNAの転写との間には密接な関係があり、増殖速度の増加に伴いリボソーム数も増加する。耐圧菌・好圧菌を含めた深海微生物が高水圧・低温下において良好な増殖速度を維持することは、両環境下においてリボソーム合成が盛んに行われていることを示唆する。深海微生物の現場環境における増殖を理解する上で、今後rRNAやリボソームに関する知見と機能解析は必須なものになるであろう。

全ゲノムの塩基配列決定には、ホールゲノムショットガン法を採用し、約84,000シーケンスをPhred/Phrapによるアッセンブルと編集を行い約4.8 Mbのコンティグに関して、アノテーションを行った。解析の結果、約4600のORFの存在が示唆されたが、図4に示すように、系統上近縁な大腸菌遺伝子との構造比較からはその70%近くの機能予測が困難であった。

本菌株ゲノム中の遺伝子編成に注目すると、リボソームタンパク質遺伝子およびrRNAオペロン、細胞分裂関連遺伝子群、複製開始起点、などの必須遺伝子群に関しては、

図4 予測された ORF の分類

基本的にそのオペロン構造の保存性が高いことが確認された。また、ゲノム解析情報の蓄積により水平伝播が多くの微生物の相互作用において普遍的であるということが認識されているが、本菌株においても水平伝播を示す痕跡がいくつか見いだされており、現在その情報学的な解析も進めている。

前節で記述した遺伝子発現機構に関してシグマ因子遺伝子の種類と数について検索したところ、本菌株ゲノム中から7種のシグマ因子が見いだされた。検索された7種の σ 因子は、 σ^{70} ファミリー *rpoD*, *rpoS*, *rpoH*, σ^{54} ファミリー *rpoN*, σ^{70} ファミリー/ECF サブファミリーとして *rpoE*, 新規な2種の ECF σ 因子 (*rpoX* および *rpoY* と仮称) であった。これら7種の遺伝子の圧力応答について現在ノーザン解析を行っており、次のステップの解析としてDNA マイクロアレイによって、それぞれの σ 因子が制御する遺伝子群のスクリーニングと圧力応答遺伝子ネットワークの解明が可能になってくるだろう。

有用酵素遺伝子に着目し、相同性検索により本菌株ゲノムを眺めてみると、さまざまな有用遺伝子の存在が明らかとなった。表はその一例、バイオレメディエーションに応用可能な酵素遺伝子、工業的に有用な酵素遺伝子、EPA ビタミンなど有用な生理活性物質の合成遺伝子など、をまとめたものである。今後は酵素学的な解析とDNA マイクロアレイ、プロテオミクスを組み合わせ、その応用を目指した研究が不可欠である。

S. violacea DSS12 株のゲノム解析のこれから

今後は、*S. violacea* DSS12 株のゲノム情報を活用し、応用化に向けた機能解析を開始する必要がある。すなわち

表 相同性解析により明らかとなった DSS12 株のもつ有用酵素

Haloalkane dehalogenase
Extracellular protease
Chitinase
Chitinase
Cellulase
EPA synthase
Thiamine biosynthesis lipoprotein
Vitamin B6 biosynthesis protein
Biotin synthetase
Organic solvent tolerance protein precursor

1) 本菌株ゲノムのデータベースの構築, 2) マイクロアレイ解析およびプロテオーム解析, 3) 高圧または低温下において活性至適を有する有用酵素および生理活性物質の探索と大量生産法を目指した基礎的研究, 4) *Shewanella* 属のゲノム情報を利用する、低温下におけるバイオレメディエーションの実用化に向けての研究, 5) 低温および高圧環境下における微生物の適応機構の解明を目指した学問体系の創造、などが、今後の応用微生物学の発展にとって重要になるのではないだろうか。これは、基礎学問のすそ野を広げることで、より柔軟な応用への道を開くものともいえる。本菌株のゲノム機能解析を行うに当たり、形質転換系は、遺伝子破壊、遺伝子置換、ゲノムの組み込みなどを可能にする点で必須なものである。しかしながら、本菌株における形質転換系はいまだ未開発であり、現在、エレクトロポレーション法および接合伝達法による形質転換を検討中である。

好冷性を有する微生物ゲノムの解析は、世界で初めての例である。特に、本菌株が生産する低温酵素の利用と今後の本菌株ゲノム情報から発見される多くの低温酵素遺伝子群の情報は、低温性酵素工学の創成を促しうる点で、これ

までの微生物ゲノム研究にはなかった視点である。近い将来、低温適応タンパク質の構造プロテオミクスによる、低温適応酵素のもつ立体構造の一般化が可能になる日が来るかもしれない。

- 1) 大和田紘一: 月刊海洋, **24**, 595-000 (1992).
- 2) 加藤千明: 化学と生物, **34**, 129-132 (1996).
- 3) 仲宗根 薫, 加藤千明: 月刊海洋/号外, **23**, 38 (2000).
- 4) C. Kato, T. Sato, and K. Horikoshi: *Biodiv. Conserv.*, **4**, 1-9 (1995).
- 5) Y. Nogi, C. Kato, and K. Horikoshi: *Arch. Microbiol.*, **170**, 331-338 (1998).
- 6) A. Ishii, K. Nakasone, T. Sato, M. Wachi, K. Nagai, and C. Kato: *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 183 (2002).
- 7) C. Kato, C. and Y. Nogi: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 223-230 (2001).
- 8) D. H. Bartlett *et al.*: *Nature*, **342**, 572-574 (1989).
- 9) C. Kato, M. Smorawinska, T. Sato, and K. Horikoshi: *Mar. Biotechnol.*, **2**, 125-129 (1995).
- 10) C. Kato, A. Ikegami, M. Smorawinska, R. Usami, and Horikoshi: *J. Mar. Biotechnol.*, **5**, 210-218 (1997).
- 11) K. Nakasone, A. Ikegami, C. Kato, R. Usami, and Horikoshi: *Extremophiles*, **2**, 149 (1998).
- 12) A. Ikegami, K. Nakasone, M. Fujita, S. Fujii, C. Kato, Usami, and K. Horikoshi: *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 315 (2000).
- 13) A. Ikegami, K. Nakasone, C. Kato, R. Usami, and Horikoshi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 915-9 (2000).
- 14) A. Ikegami, K. Nakasone, C. Kato, Y. Nakamura, I. Yoshikawa, R. Usami, and K. Horikoshi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **192**, 91-000 (2000).
- 15) K. Nakasone, A. Ikegami, H. Kawano, R. Usami, C. Kato, and K. Horikoshi: *Extremophiles*, **6**, 89-95 (2002).