

B-24 ポリリン酸蓄積細菌 *Microlunatus phosphovor*

を溶菌するバクテリオファージ(ΦMp2) のゲノム解析

○北坂真一^{1*}・小貫元治²・佐藤弘泰¹・味埜俊¹・小田和賢³

¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻 (〒277-8561 千葉県柏市柏の葉 5-1-5)

² 東京大学サステナビリティ学連携研究機構(IR3S) (〒113-8654 東京都文京区本郷 7-3-1)

³ 東北大学大学院農学研究科農学部資源生物科学専攻 (〒989-6711 宮城県大崎市鳴子温泉字蓬田 232-3)

E-mail: kitasaka@mw.k.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

近年活性汚泥中にバクテリオファージが存在する事が知られるようになってきた。それらバクテリオファージについてはごく限られた情報しか得られておらず、水処理性能との関連さえも十分なことがわかっていない。しかし、バクテリオファージは宿主である細菌を溶菌する事が知られており、廃水処理の分野において、バクテリオファージに関する基礎的な知見を集積していく事が重要であると我々は考えている。

ΦMP2 は、2003 年に Lee et al. が分離したポリリン酸蓄積細菌 *Microlunatus phosphovor* に特異的に感染するバクテリオファージであり、鎖長 23kbp の二重鎖 DNA を持つ。本研究ではショットガン・シーケンシング法により ΦMP2 のゲノムを解析することを試みた。

2. 実験方法

(1) ΦMP2 の培養と精製

本研究室にてストック溶液として 4℃で保存していた ΦMP2 ファージ液 10 μL と対数増殖期の *M. phosphovor* JCM9379 株培養液 100 μL を混合し、25℃で 25 分間培養した。この混合液を、ソフトアガー (0.7%アガロース) と混合し、あらかじめ撒かれたアガー培地 (1.5%アガー) に注いだ。これらのプレートを 25℃で 3 日培養した。これら培地は 1L 当たり、ペプトン 0.02g、イーストエキス 0.46g、酢酸ナトリウム 3 水和物 0.225g、塩化カルシウム 2 水和物 0.045g、塩化マグネシウム 6 水和物 0.455g を含む。

前培養が終了した後、単一のプラーク (ΦMP2) を採取し、あらかじめ用意した対数増殖期の *M. phosphovor* 培養液に摂取して、3 日間 25 度で ΦMP2 をさらに培養した。その後、培養液にクロロホルムを最終濃度が 0.1% となるように加え、ボルテックスでよく攪拌した。その後、5000 × g、10 分にて遠心分離を行い、上澄みを 0.2 μL 孔径のニトロセルロース膜でろ過し、*M. phosphovor* を除去した。

(3) DNA の濃縮・抽出・精製

DNA の濃縮は、100kDa の限外濾過フィルター (Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Amicon) を用いた限外濾過により行った。また、DNA の抽出および精製は Wizard® Lambda Preps DNA Purification System を用いて行った。DNA の抽出・精製の状態はアガロースゲル電気泳動 (100V、12 分) によって分離しエチジウムブロマイドにより染色し蛍光観察して確認した。

(4) ショットガン・シーケンシング

ショットガン・ライブラリーを作成するにあたり、まず抽出 DNA を超音波処理でランダムに短く切った。次にクローニングであるが、ライゲーションでは Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) を、形質転換では QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を使用した。

以上のようにして作られたクローン・ライブラリーから DNA を回収し、PCR で増幅して、その産物を精製し、シーケンシングを行った。解析には ABI3100 (Applied

Biosystems)を用いた。ただし、一部はタカラバイオ(株)および Macrogen Inc.のシークエンシングサービスを利用した。

(5) 情報解析

データの解析では、シークエンシング結果の評価、塩基配列のつなぎあわせ(コンティグ配列の作成)、オープンリーディングフレーム(ORF)の検索、ORF に対する近縁遺伝子の検索や比較という手順を踏んだ。

シークエンシング結果の評価、コンティグ配列の作成、ORF の検索は DNASIS pro(日立ソフトウェアエンジニアリング)を用いて行った。ORF に近縁なタンパク質の検索には DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)の BLAST を用いた。

3. 結果と考察

最終的に 401 個のクローンから 206,585bp のシークエンス情報をえることができた。各クローンから得られた挿入 DNA 断片の長さの平均は 515.2bp であった。Lee et al. (2003)では制限酵素処理により生じた断片の長さから ϕ MP2 の全長を 23kbp 程度とした。今回解読した塩基長はその約 9 倍にあたる。

これら塩基配列をつなぎあわせることで、5021bp, 3372bp, 4170bp, 3917bp の 4 つのコンティグ(計 16,480bp)を得ることができた。

これらコンティグ中に、3つのフレームシフトがあり得る事および両方向に転写されうる事を考慮し、開始コドンおよび終止コドン(の候補)の位置を見いだした。さらに、アミノ酸残基数 50 以上のものを選び出し、BLAST を用いて近縁の遺伝子を検索した。BLAST に候補とされた遺伝子の内、E-value(偶然一致する期待値)が 0.001 以下のものを抽出した。この作業によって、33 個の ORF とそれに相同性を示す遺伝子が残った。表 1 に、今回見つかった ORF に相同性を示した遺伝子の一覧を示す。

見つかった遺伝子のほとんどは、最も近縁な既知の遺伝子ともアミノ酸配列の相同性(identity)が 30%から 40%前後のものがほとんどであり、また、その遺伝子も機能が未知のものがほとんどであった。推定された機能が比較的明らかなものとして、分泌酵素(ORF1)、プロテオホスホグリカン(ORF3,11)、Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (ORF6,7,10,17)、nucleoside-diphosphate-sugar epimerases(ORF8)、ムチン(ORF12)、portal gp5 (ORF14)、HNH homing endonuclease (ORF19)、HNH endonuclease family

protein (ORF20)、Heavy metal transport/detoxification (ORF23)、Proline-rich salivary protein (ORF24)、イニシエーション因子(ORF27,28)、Erythronolide synthase (ORF28)が挙げられる。

また、Gene 13 protein (ORF2) Gp51. HNH homing endonuclease(ORF19)、Gp60 (ORF21)、Gp62 (ORF27)、Gp57 (ORF28)はバクテリオファージの遺伝子である。

場所や読み枠が異なるにもかかわらず、同じ遺伝子との近縁性が示唆された場合が少なからずあった。

これらの ORF の中でも特に、宿主細菌の溶菌に関与する酵素であるエンドヌクレアーゼと高い相同性を示した ORF が 2 つあった。

4. まとめ

今回作った 4 つのコンティグの長さは全部合わせて 16480bp であった。これは Φ MP2 のゲノム全体の 68.7%の長さになる。全長を知るには 240,000bp 分のシークエンシング必要とされているが、今回シークエンシングした配列でコンティグの作成に使用できるものは 206585bp であった。作成したコンティグからは、エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子に近縁な遺伝子が 2 つ見つかった。

5. 参考文献

S. H. Lee, M. Onuki, H. Satoh and T. Mino, Isolation, characterization of bacteriophages specific to *Micrococcus phosphovorans* and their application for rapid host detection, Letters in Applied Microbiology 42 pp. 259-264. 2006.

表1 ORFに相同性を示した遺伝子の一覧

ORF 近縁種	Identities
1 Q413L9_KINRA Hypothetical protein.	145/442 (32%)
Q40UC7_KINRA Type II secretion system protein E.	128/457 (28%)
2 Q05219_VG13_BPML5 Gene 13 protein	106/295 (35%)
Q413M0_KINRA Hypothetical protein.	79/247 (31%)
3 Q4FX62_LEIMA Proteophosphoglycan 5.	72/252 (28%)
4 Q413L9_KINRA Hypothetical protein.	45/133 (33%)
5 Q857L0_BPMB2 Gp13.	76/203 (37%)
6 Q5ZMJ9_SRRM1_CHICK Serine/arginine repetitive matrix protein 1.	53/148 (35%)
7 Q5ZMJ9_SRRM1_CHICK Serine/arginine repetitive matrix protein 1.	46/128 (35%)
8 Q3GYJ0_9ACTO Similar to nucleoside-diphosphate-sugar epimerases.	56/160 (35%)
9 Q05219_VG13_BPML5 Gene 13 protein	64/166 (38%)
Q413M0_KINRA Hypothetical protein.	51/151 (33%)
10 Q5ZMJ9_SRRM1_CHICK Serine/arginine repetitive matrix protein 1.	51/140 (36%)
11 Q8NAM5_HUMAN Hypothetical protein FLJ35107.	46/156 (29%)
Q4FX62_LEIMA Proteophosphoglycan 5.	43/148 (29%)
12 Q8WWQ4_HUMAN Mucin 5 (Fragment).	46/137 (33%)
13 VG13_BPML5 Gene 13 protein	62/151 (41%)
14 Q9ZX72_BPMT4 Putative portal gp5.	38/99 (38%)
15 VG13_BPML5 Gene 13 protein	55/128 (42%)
16 VG13_BPML5 Gene 13 protein	54/135 (40%)
17 Q5ZMJ9_SRRM1_CHICK Serine/arginine repetitive matrix protein 1.	34/83 (40%)
18 Q413L9_KINRA Hypothetical protein.	19/45 (42%)
19 Q854L3_9CAUD Gp51.	51/123 (41%)
Q597W9_9VIRU Putative HNH homing endonuclease	47/172(27%)
20 Q854L3_9CAUD Gp51.	49/121 (40%)
Q4MIQ5_BACCE Prophage LambdaSa2, HNH endonuclease family protein.	37/98 (37%)
21 Q854L3_9CAUD Gp51.	32/58 (55%)
22 Q5J5P4_9CAUD Gp60.	83/270 (30%)
23 Q40UP8_KINRA Heavy metal transport/detoxification	48/147 (32%)
24 Q948Y7_VOLCA VMP3 protein.	37/104 (35%)
Q62107_MOUSE Proline-rich salivary protein (Fragment).	38/112 (33%)
25 Q9B064_BPMB1 Gp57.	27/62 (43%)
26 Q853Z0_9CAUD Gp76.	91/262 (34%)
27 Q22183_CAEEL Hypothetical protein col-122.	32/70 (45%)
Q40UI1_KINRA Initiation factor 2:Small GTP-binding protein domain.	36/104 (34%)
28 Q857G0_BPMB2 Gp62.	64/128 (50%)
Q3WG61_9ACTO Erythronolide synthase (EC 2.3.1.94).	43/127 (33%)
Q40UI1_KINRA Initiation factor 2:Small GTP-binding protein domain.	36/104 (34%)
29 Q857G5_BPMB2 Gp57.	26/90 (28%)
30 Q853Z0_9CAUD Gp76.	32/92 (34%)
31 Q857G0_BPMB2 Gp62.	45/79 (56%)
32 Q857G0_BPMB2 Gp62.	42/80 (52%)
33 VG61_BPML5 Gene 61 protein (Gp61).	29/41 (70%)