

深海から分離された好圧性微生物 *Shewanella violacea* DSS12株及び *Moritella japonica* DSK-1株の遺伝子導入系の確立

福地 順子*¹ 佐藤 孝子*² 加藤 千明*^{1,3}
伊藤 政博*⁴ 掘越 弘毅*²

琉球海溝から分離された *Shewanella violacea* DSS12株及び日本海溝から分離された *Moritella japonica* DSK-1株はどちらも好圧性微生物であり、これらの菌株からは加圧応答を示す遺伝子群が単離されてきた。さらに好圧性微生物の遺伝学を確立するために、これらの菌株に遺伝子を導入することを検討した。まず、*Escherichia coli* S17-1株を用いた接合伝達法により抗生物質耐性株を得ることに成功した。しかし、プラスミド調製は常法では困難であったので、菌体をメタノール処理後Plasmid prep kit (MO BIO社)を用いる抽出法を開発し、かなり改善が見られた。得られたプラスミドは電気泳動またはPCR法で検出した。その結果、DSS12株からは広宿主域ベクターpKT231, Col E1系プラスミドpTS4及びp15A系プラスミドpACYC184が、またDSK-1株からは広宿主域ベクターpRK415及びシャトルベクターpTH10が検出され、好圧性微生物における形質転換が初めて確認された。

キーワード：好圧性微生物、形質転換、接合伝達

The host-vector system for Deep-sea piezophilic bacteria, *Shewanella violacea* DSS12 and *Moritella japonica* DSK-1

Junko FUKUCHI*⁵ Takako SATO*⁶ Chiaki KATO*^{5,7}
Masahiro ITO*⁸ Koki HORIKOSHI*⁶

Deep-sea bacteria adapt to the extreme environment, such as high pressure and cold temperature. *Shewanella violacea* DSS12 and *Moritella japonica* DSK-1 isolated from deep-sea mud samples obtained at Ryukyu Trench and Japan Trench, respectively, have ability to grow up to 70 MPa. Those bacteria have unique mechanisms of gene expression for response to high pressure. For establishing gene transformation systems into those strains, bacterial conjugation method was used with *Escherichia coli* S17-1, which has ability to transfer bearing plasmid DNAs to other microorganisms. As a result, the broad host range vector, pKT231, Col EI plasmid, pTS4, and p15A plasmid, pACYC184 were successfully introduced to DSS12. Furthermore, the broad host range vector, pRK415, and the shuttle vector, pTH10, were transformed to DSK-1. This is a novel host-vector system for piezophilic bacteria for molecular genetic analysis of pressure adaptation mechanisms.

Keywords : Piezophilic bacteria, Transformation, Bacterial conjugation

*1 東京工業大学大学院生命理工学研究科
*2 海洋科学技術センター極限環境生物フロンティア研究システム
*3 海洋科学技術センター海洋生態・環境研究部
*4 東洋大学生命科学部
*5 Department of Bio-information, Tokyo Institute of technology
*6 The DEEPSTAR Group, JAMSTEC
*7 Department of Marine Ecosystem and Environment, JAMSTEC
*8 Faculty of Life Sciences, Toyo University

1. はじめに

琉球海溝深度5,110m由来の堆積物試料から分離された *Shewanella violacea* DSS12株 (以降DSS12株と略す), 及び日本海溝深度6,356m由来の堆積物試料から分離された *Moritella japonica* DSK-1株 (以降DSK-1株と略す)は, 共に高水圧に適応して生育する好圧性微生物である。これらの菌株は, 大気圧下でも70MPaといった高圧下でも同程度に生育できる特性をもち, 圧力に応答する代謝や遺伝子レベルでの適応機構を調べるために非常に使いやすい微生物である。このため, これらの菌株からさまざまな遺伝子群, 特に加圧応答を示す遺伝子群がクローニングされ, 大腸菌内及び試験管内で解析が進められてきた¹⁻⁴⁾。しかし, それら遺伝子を本来持っている好圧性微生物内で遺伝子が圧力によりどのように制御されているか詳しくは調べられておらず, 機能が検証されていない遺伝子も多い。そこで, 好圧性微生物における遺伝学を確立するために, これらの菌株を宿主とする遺伝子導入方法を検討することは非常に重要と考えられる。しかしながら, これまでに行われた深海由来の耐圧性微生物へのプラスミド導入の例は *Photobacterium profundum* SS9株のみであり, しかもこの菌株は高水圧下での生育に乏しいためにほとんど圧力適応能を有しておらず, 高水圧への適応機構解析には不相当と考えられた。従って, 大腸菌内及び試験管内において遺伝子発現の高圧下での応答に関する解析が進んでいるDSS12株その他の好圧性細菌の遺伝子導入系を新たに確立する必要性があった。

近年, バイオテクノロジーの発達により, 生物への遺伝子導入法が種々開発されつつある。しかし, それらの方法は陸上由来の生物を対象としており, 海洋生物には適さないことが多い。そこで本研究においてはまず, プラスミド導入方法として, 古典的であり微生物間では普遍性の高い接合伝達法を用いた。接合伝達法は, 菌同士の接合によってプラスミドを供与菌から受容菌へ導入する方法であり, 受容菌が受けるダメージが少ないという利点がある。二親伝達法は, 自己伝達能を担う *tra* 領域が染色体に組み込まれた *Escherichia coli* S17-1⁵⁾ (以降S17-1株と略す)をプラスミド

供与菌とし, 受容菌と共培養することで, *tra*の働きによりプラスミドを供与菌から受容菌に導入することができる。我々はこの二親伝達法を用いることにより, 高水圧下でも生育の良好な好圧性微生物であるDSS12株に広宿主域ベクター pKT231, pUC系プラスミド pTS4, p15A系プラスミド pACYC184, また同じく好圧性微生物であるDSK-1株には広宿主域ベクター pRK415及び大腸菌とグラム陽性菌のシャトルベクター pTH10を導入することに初めて成功したのでここに報告する。

2. 実験方法

2.1. 使用菌株及びプラスミド, 菌株の培養条件

二親伝達法において, 大腸菌S17-1株をプラスミド供与菌とした。プラスミド受容菌として, 好圧性微生物DSS12株のリファンピシン耐性株DSS12R株及びDSK-1株を用いた(表1)。また, 使用したプラスミドは表2に示した。

S17-1株は37℃においてストレプトマイシン (10 µg/ml)を加えたLB培地で培養した。DSS12R株及びDSK-1株は, 8℃においてMB2216培地で培養した。DSS12R株のみ培地にリファンピシン (10 µg/ml)を加えた。

2.2. プラスミド供与菌の調製

二親伝達法でプラスミド供与菌として用いたS17-1株のコンピテントセルは, 常法である塩化カルシウム法により調製した。S17-1株を対数増殖期まで培養後, 集菌し, 50 mM CaCl₂で2回洗浄してコンピテントセルとした。このコンピテントセル20 µlにDNA 2.5~5 ngを加えて, 氷上にて30分インキュベーション後, 42℃, 45秒間のヒートショックを与えた。その後SOC培地200 µlを加えて, 37℃で2時間培養した。抗生物質を含むLB寒天培地に培養液を塗布後, 37℃で一晩培養し, 形質転換株を得た。常法にてプラスミドを調製し, 1×TAEバッファー, アガロースS (和光純薬)を使用したゲルで電気泳動し, 供与菌であるS17-1株が目的プラスミドを保持していることを確認した。

表1 使用した菌株

recA: DNA修復機構 *res*: 制限酵素 *tra*: 自己伝達機能 *mod*: DNA修飾機構 *Sm^r*: ストレプトマイシン耐性
Rf^r: リファンピシン耐性

Table 1 Genotypic and growth characteristics of bacterial strains.

recA: DNA replication, *res*: restriction enzymes, *tra*: DNA transformation, *mod*: DNA modification, *Sm^r*: Streptomycin resistance, *Rf^r*: Rifampicin resistance

菌株	形質転換に関わる遺伝子型	生育至適温度(℃)
プラスミド供与菌		
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>recA-res-tra+mod+ Sm^r</i>	37
プラスミド受容菌		
<i>Shewanella violacea</i> DSS12R	<i>Rf^r</i>	8
<i>Moritella japonica</i> DSK-1	野生型	10

表2 使用したプラスミド

Tc: テトラサイクリン Km: カナマイシン Sm: ストレプトマイシン Cm: クロラムフェニコール Amp: ア
ンピシリン Em: エリスロマイシン mob: tra(自己伝達機能)によって伝達される能力

Table 2 Characteristics of plasmids used in this study.

Tc: Tetracyclin, Km: Kanamycin, Sm: Streptomycin, Cm: Chloramphenicol, Amp: Ampicilin,
Em: Erythromycin, mob: Mobility of DNA between cells by tra (transformation)

プラスミド	大きさ(Kb)	複製起点	抗生物質耐性	特徴
pRK415	10.5	RK2	Tc	広宿主域(IncP) mob + <i>Shewanella</i> 属菌株でも維持
pKT231	13.0	RSF1010	Km Sm	広宿主域(IncQ) mob + <i>P. profundum</i> SS9株でも維持
pACYC184	4.2	p15A	Tc Cm	<i>E. coli</i> で維持
pTS4	2.7	pUC	Amp Cm	<i>E. coli</i> で維持
pTH10	5.0	pC194 pUC	Km Em	大腸菌とのシャトルベクター, グラム陽性菌に於いて広宿主域

2.3. 接合伝達法による形質転換

プラスミド供与菌は対数増殖期初期 ($OD_{660}=0.3$) まで、プラスミド受容菌は対数増殖期後期 ($OD_{660}=1.0$) まで培養した。これらをそれぞれ集菌し、プラスミド供与菌とプラスミド受容菌の菌体量比をほぼ1:1あるいは0.5:1となるようにして、MB2216液体培地で2種の菌体を懸濁、混合した。これを抗生物質を含まないMB2216寒天培地に塗布し、20℃で1晩あるいは10℃で1週間培養し、接合を行った。接合後、プレートから菌体を掻き取り、次にこれを抗生物質を含む寒天培地に塗布して8℃で培養し、形質転換株を選択した。これより抗生物質耐性を示した菌株を、形質転換していない受容菌と抗生物質を含む寒天培地上で生育比較し、抗生物質耐性を持つことを再度確認した。次にプラスミド調製により遺伝子導入の確認を行った。

2.4. プラスミドの大量調製と検出

抗生物質耐性を示した菌株より、アルカリSDS法、あるいはUltraClean Plasmid Prep Kit (MO BIO社)を用いてプラスミドの大量調製を行い、その検出を試みた。

常法であるアルカリSDS法では、DSS12R株及びDSK-1株の形質転換株を対数増殖期後期まで、MB2216培地100mlで震盪培養し、集菌(5,000rpm, 15分, 4℃で遠心)した。Sol. I (50mM グルコース, 25mM トリス塩酸(pH8), 10mM EDTA (pH8)) 5mlで懸濁し、リゾチーム(10mg/ml) 0.5mlを加えて菌体が溶けるまで静かに攪拌した。Sol. II (0.2N NaOH, 1% SDS) 10mlを加えて5~10分転倒混和し、氷冷Sol. III (3 M 酢酸カリウム, 11.5%酢酸) 7.5mlを加えて転倒混和し、氷上に10分置いた。遠心(9,000rpm, 15分, 4℃)後に、上清を沈澱を入れないように取り、イソプロパノール沈澱を行った。70% エタノールで洗浄し、TE 3 mlに溶解した。氷冷5 M LiCl 3 mlを加えて混合し、イソプロパノール沈澱を行った。70% エタノールで洗浄してTE (20 μ g/ml RNase) 500 μ lに溶かし、室温で30分 RNase処理を行った。PEG沈澱を行い、TE 200 μ lに溶かしてフェノール処理を行った。エタノール沈澱を行い、70% エタノールで洗浄しTE 20 μ lに溶かした。1×TAEバッファーあるいは1/2×TBEバッファーにてアガロースゲルで電気泳動を行い、プラスミドを確認した。プラスミドが確認でき

なかった場合は、TaKaRa Ex Taq™ (宝酒造)を用いてPCRを行った。反応条件は、94℃ 30秒, 50℃ 30秒, 72℃ 30秒を40サイクルとした。PCRサンプルを電気泳動し、プラスミドが持つ配列の増幅を確認した。

UltraClean Plasmid prep kit (MO BIO社)は、DSS12R株及びDSK-1株の形質転換株を対数増殖期後期まで、MB2216培地50mlで震盪培養し、集菌後に使用した。また、同量の菌体を、1mlメタノールで3回菌体を洗浄してから使用した。これらを電気泳動にて確認し、プラスミドが確認できなかった場合は、PCR法によって検出した。

3. 結果及び考察

接合伝達法の結果を表3にまとめた。またそれぞれの形質転換株からプラスミド調製した結果を図1~3に示した。

二親伝達法により、DSS12R株では、プラスミドpKT231, pTS4, pACYC184が、DSK-1株では、プラスミドpRK415及びpTH10がそれぞれ導入されたことが、電気泳動によって確認された。これより、DSS12R株でRSF1010, pUC及びp15Aの複製起点が、DSK-1株でRK2及びpUCあるいはpC194の複製起点が認識されること、すなわちそれぞれが好圧性微生物内でも認識されることがわかった。また、これらのプラスミド上の抗生物質耐性遺伝子のプロモーターがDSS12R株及びDSK-1株でも機能することがわかった。pKT231, pRK415のような自然プラスミドは複製のために必要な蛋白を自らコードしており、異なる微生物種間で維持されやすいため、好圧性微生物内での安定な保持が期待される。pUC13由来のpTS4, 及びpACYC184は*E. coli*で維持されるプラスミドであり、pTH10は*E. coli*とグラム陽性菌とのシャトルベクターである。*E. coli*は遺伝学的に好圧性微生物と近縁であるため、これらがDSS12R株及びDSK-1株で維持されたと考えられる。

形質転換効率(形質転換体/受容菌数)は、DSS12R/pKT231が 4.2×10^{-7} , DSS12R/pTS4が 1×10^{-8} , DSS12R/pACYC184が 2×10^{-8} , また、DSK-1/pRK415が 2.4×10^{-8} , DSK-1/pTH10が 1.6×10^{-7} だった。形質転換効率は同じ二親伝達法による他の微生物への形質転換の報告と比較して非常に低いが、これは接合培養の際の温度が低いことに起因すると考えられる。接合伝達には、プラスミドの伝達を担う*E. coli*の活性が高い37℃

での接合が望ましいが、DSS12株、DSK-1株が好冷性であり、25℃にて一晩接合させると、その生育能を失う。このため、DSS12株、DSK-1株が生育能を失わない限界温度付近の20℃で1晩の接合を行うことによりプラスミドが導入された。また、*E.coli*の活性は低いがDSS12株、DSK-1株の生育至適温度付近の10℃で1週間程時間をかけて接合を行うことによってもプラスミドが導入された。

DSK-1株においては、従来のアルカリSDS法による大量調製で、電気泳動あるいはPCR法による目的断片の増幅でプラスミドが検出された(図1、及び図2-A)。プラスミド調製後、電気泳動で確認できずにPCRで検出される理由として、菌体内におけるコピー数が非常に低いことが考えられる。

さらに、DSS12R株では、形質転換株が得られても、そのプラスミドの調製及び検出が困難である。それは、菌体を持つ多糖類のような調製阻害物質がDNAに混入するためと考えられる。同様の現象は以前から菌類や植物由来の核酸抽出の際にも見られ、問題となることが多い。そこでまず、以前DSS12株の染色体DNAの明瞭な電気泳動像を得ることに効果があった1/2×TBEバッファを用いた電気泳動を行うことで、アルカリSDS法でプラスミド調製後にバンドが検出できた(図3-A)。また、プラスミド調製時にDNAと挙動を共にする調製阻害物質として、細胞壁構成成分であるリポポリサッカライドが考えられたため、膜を構成する脂質を取り除くことで調製阻害物質を取り除けるのではないかと考えた。そこで、メタノールで菌体を洗浄してからUltraCleanPlasmid Prep Kit(MO BIO社)でプラスミドを調製したところ、電気泳動にてアルカリSDS法よりも明瞭なバンドを検出することができた(図3-B)。また、従来のアルカリSDS法による大量調製後のPCRで目的とす

るバンドが検出されたpTS4とは異なり、プラスミドの検出が全くできなかったpACYC184においても、この方法を用いることにより、PCRで目的とするバンドが検出された(図2-B)。

結果として、高水圧に適応して生育する好圧性微生物の形質転換が初めて確認された。また、調製や検出の困難な好圧性微生物からのプラスミド調製、及び検出の方法を効果的に改善し、形質転換の確認を容易にすることができた。

引用文献

- 1) Li L, Sato T, Fujii. S, Kato C, Horikoshi K. A novel pressure regulated outer membrane protein, Omp-HP75, from deep-sea piezophilic bacterium, *Moritella japonica* : Molecular Biological Society Japan General meeting, Abstract : 622. (1999)
- 2) Kato C, Nakasone K, Qureshi M H, Horikoshi K. How do Deep-sea Microorganisms Respond to Changes in Environmental pressure? : Environmental Stressors and Gene Responses. Elsevier Science, Amsterdam, pp : 277-291. (2000)
- 3) 加藤千明: 深海微生物の環境適応 化学と生物 34(2) : 129-132 (1996)
- 4) 加藤千明、仲宗根薫: 深海微生物の多様性と生理的特性 月刊海洋号外 23: 38-44 (2000)
- 5) Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : Biotechnology 1 (9) : 784-791 (1983)

(原稿受理: 2002年8月27日)

表3 接合伝達法による遺伝子導入の結果

－: 形質転換体 that 得られなかった ○: 電気泳動によって確認した * : PCR法によって目的とする大きさの断片の増幅を確認した

Table 3 Comparison of transformation efficiency by bacterial conjugation.

－: no transformants ○: Plasmids were detected by electrophoresis * : Predicted length fragments from plasmids were amplified by PCR

プラスミド	大きさ (Kb)	複製起点	抗生物質耐性	形質転換効率(形質転換体／受容菌数)	
				DSS12R株	DSK-1株
広宿主域ベクター					
pKT231	13.0	RSF1010	Km Sm	○ 4.2×10^{-7}	—
pRK415	10.5	RK2	Tc	—	* 2.4×10^{-8}
シャトルベクター					
pTH10	5.0	pC194 pUC	Km Em	—	○ 1.6×10^{-7}
大腸菌用ベクター					
pTS4	2.7	pUC	Amp Cm	* 1×10^{-8}	—
pACYC184	4.2	p15A	Tc Cm	* 2×10^{-8}	—

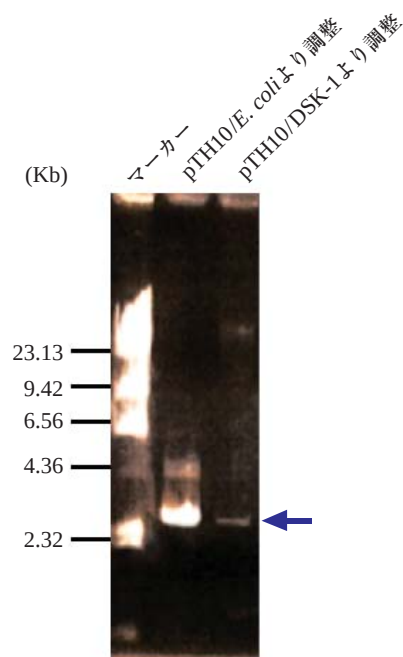


図1 DSK-1株形質転換体からプラスミドを調製し電気泳動した結果
*E. coli*から常法で調製したものと比較。矢印は目的プラスミドの閉環型分子種の位置を示す。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of plasmids extracted from DSK-1 transformants. Plasmids were compared with plasmids extracted from *E. coli* transformants by usual methods. An arrow indicate the position of covalently closed circular plasmids.

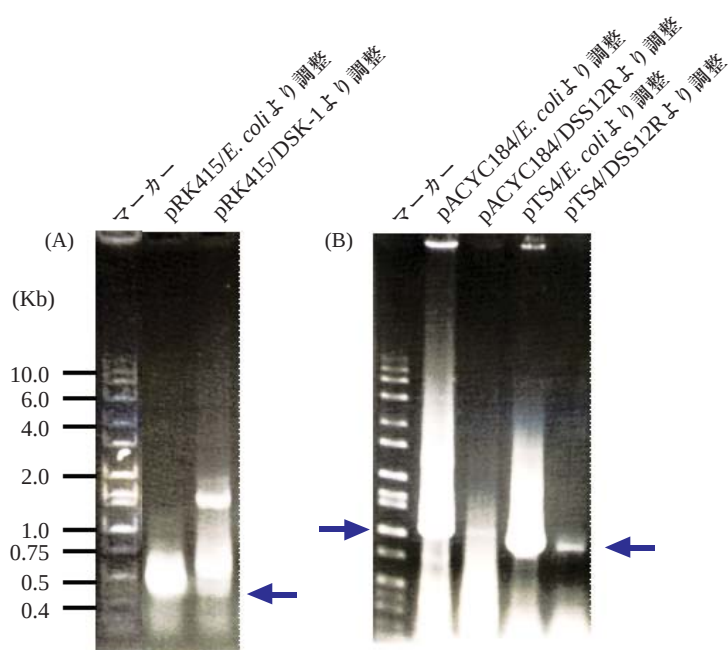


図2 DSS12R株及びDSK-1株形質転換体からプラスミドを調製したサンプルをテンプレートにPCR反応を行い電気泳動した結果
 (A) DSK-1株形質転換体より調製
 (B) DSS12R株形質転換体より調製

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of predicted length fragments by PCR from plasmids extracted from DSS12R and DSK-1 transformants.
 (A) DSK-1 (B) DSS12R

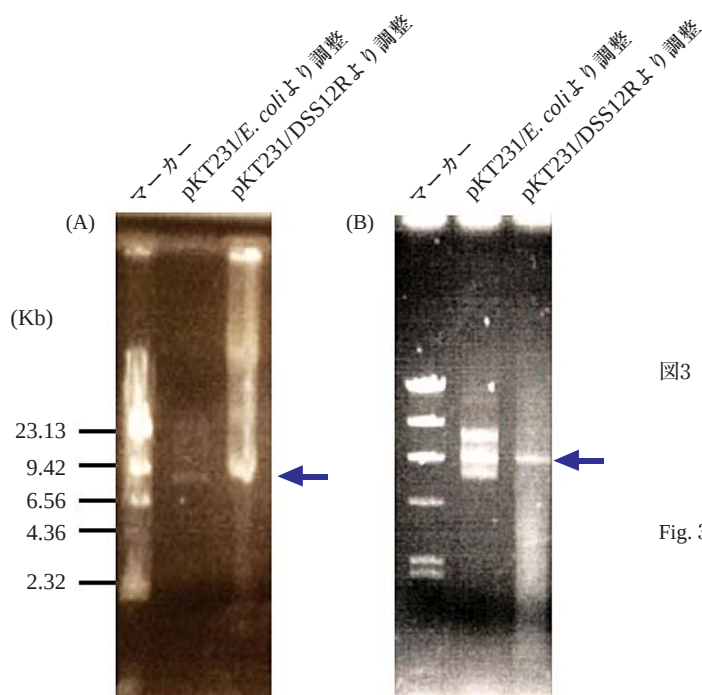


図3 DSS12R株形質転換体からプラスミドを調製し電気泳動した結果
 (A) アルカリSDS法により大量調製後1/2×TBEバッファーを用いた電気泳動
 (B) メタノール処理後UltraClean Plasmid prep kit (MO BIO社)で調製し電気泳動

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of plasmids extracted from DSS12R transformants.
 (A) Plasmids were extracted by alkaline-SDS method. Electrophoresis were done with 1/2×TBE buffer.
 (B) Plasmids were extracted using UltraClean Plasmid prep kit (MO BIO) from methanol treated cells.