

1. 好塩、好アルカリ細菌のスクリーニングおよび突然変異株の作製

1-1. 廃グリセロール利用可能な微生物のスクリーニング

土壌、池等からサンプルを収集し、炭素源としてグリセロール3%を添加したSOT改培地(後述)を用いてスクリーニングを本年度も継続しておこなった。

50mg程度の土壌などを1 mlの蒸留水に懸濁し、上清をSOT改培地に添加し、30℃で1週間集積培養後、懸濁したものをナイルレッド 0.5 μg/ml、3%グリセロールを含むSOT改培地プレートに植菌し、30℃にて、2日培養し、発生した菌株を365 nmの紫外光で蛍光発光させることで、PHAを生産する *Halomonas* sp. KM-1株等の菌株を選抜した。約20株(一部重複あり)の菌株が得られたが、いずれもKM-1株よりも生育が遅く、PHA生産も僅かであった。そこで、以下の検討を、主に *Halomonas* sp. KM-1株で行った。

廃グリセロール利用菌のスクリーニング

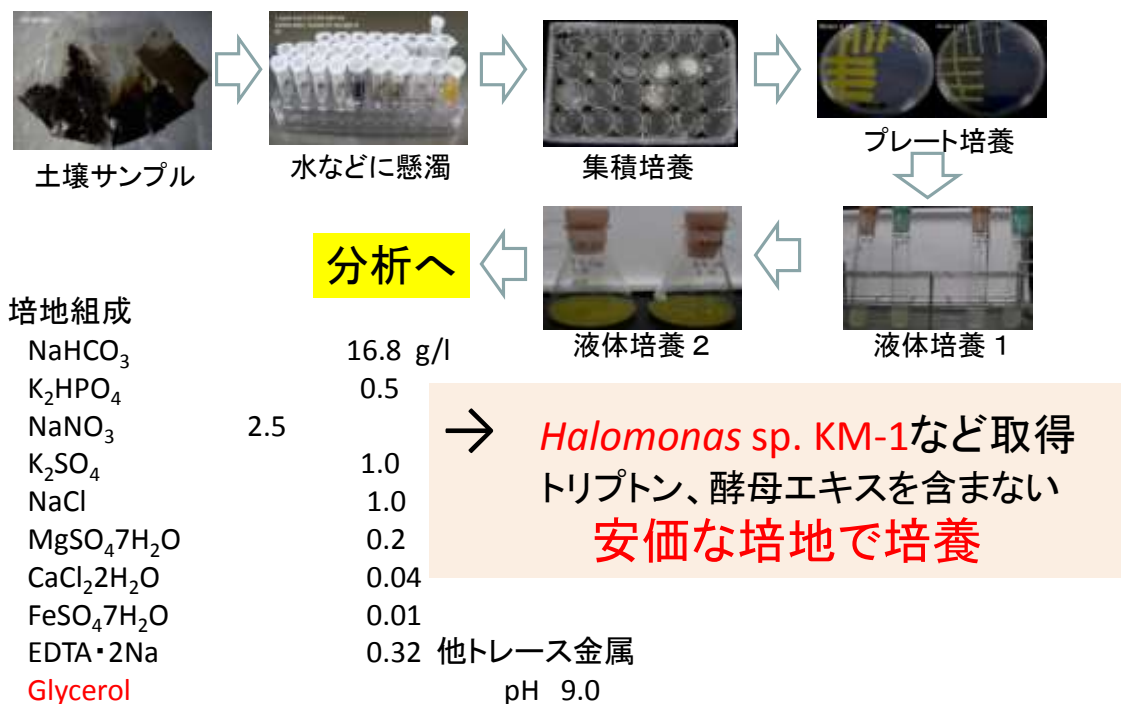


図1. スクリーニング手法の概説

(培地名) SOT 改 (*Spirulina platensis* Medium 改) pH8.9±0.1

(培地組成) NaHCO₃ 1.68 g, K₂HPO₄ 50 mg, NaNO₃ 250 mg, K₂SO₄ 100 mg,
NaCl 100 mg, MgSO₄·7H₂O 20 mg, CaCl₂·2H₂O 4 mg, FeSO₄·7H₂O 1 mg,
Na₂ EDTA 8 mg, A5+Co 溶液 0.1 ml

これにグリセロール等の炭素源を加え、蒸留水に溶解し100mlとした。

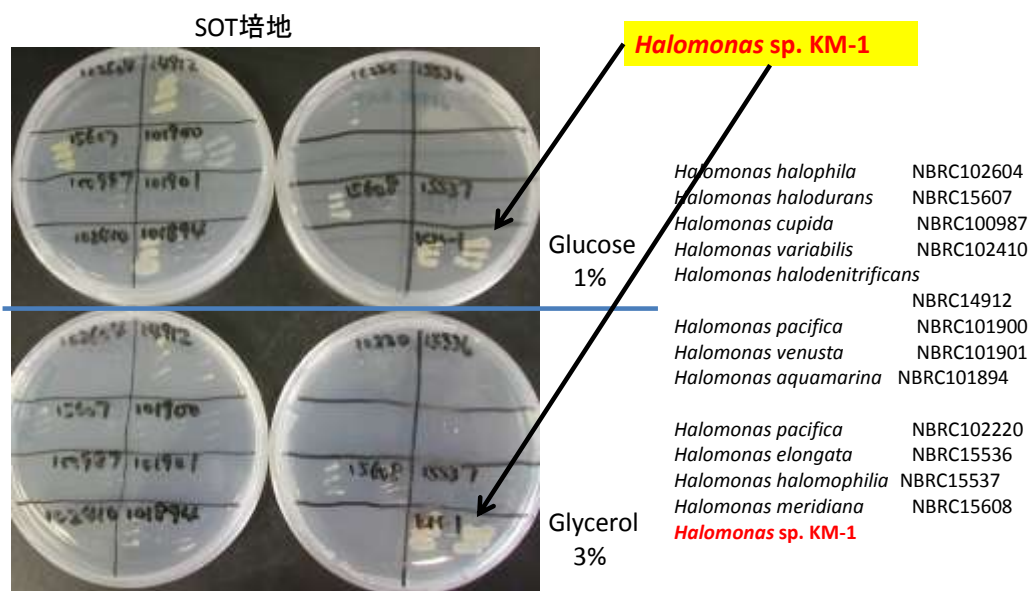
・ A5+Co 溶液

H₃BO₃ 286 mg、MnSO₄·7H₂O 250 mg、ZnSO₄·7H₂O 22.2 mg、CuSO₄·5H₂O 7.9 mg、
Na₂MoO₄·2H₂O 2.1 mg、Co(NO₃)₆H₂O 4.4mg 蒸留水100mlに溶解した。

同時に取得した菌株は、遺伝子分析の結果 *Novosphingobium sp.*、*Sphingomonas sp.* 等であることがわかり、それらの菌株についても PHA 生産の能力などについて分析したが、いずれも *Halomonas sp.* KM-1 株より劣っていた。

また、カルチャーコレクションのハロモナス菌について、SOT 改培地での生育について炭素源をグルコース 1%、またはグリセロール 3%加えて生育を見たところ(図 2)、グルコースでは 13 株中 6 株の生育が認められたのに対し、グリセロールでは 3 株の生育しか認められず、いずれの炭素源においても *Halomonas sp.* KM-1 株の生育可能であり、特にグリセロールにおいては他のハロモナス菌に比べて格段の生育を示した。

炭素源＋栄養塩でのハロモナス菌の生育



***Halomonas sp. KM-1*は、グリセロールを利用するのに適する**

図 2. SOT 培地でのハロモナス菌の生育比較

選抜した *Halomonas* sp. KM-1 株の 16S rRNA を PCR 法により増幅、精製し、その配列 1353 bp (DDBJ Accession Number AB477015) を解析した。BLAST 法で分析の結果、これに類似する菌体は、*Halomonas* sp. Ap-5 (DQ644497, 99% homology)、*Halomonas nitritophilus* (AJ309564, 99%)、*Halomonas* sp. DA03(EU541470, 99%)、*Halomonas* sp. G7 (EF554885, 99%)であり、本菌株を *Halomonas* 属の種と同定し、*Halomonas* sp. KM-1 と命名、特許生物寄託センターに FERM BP-10995 として寄託した。この系統樹を図 3 に示した。

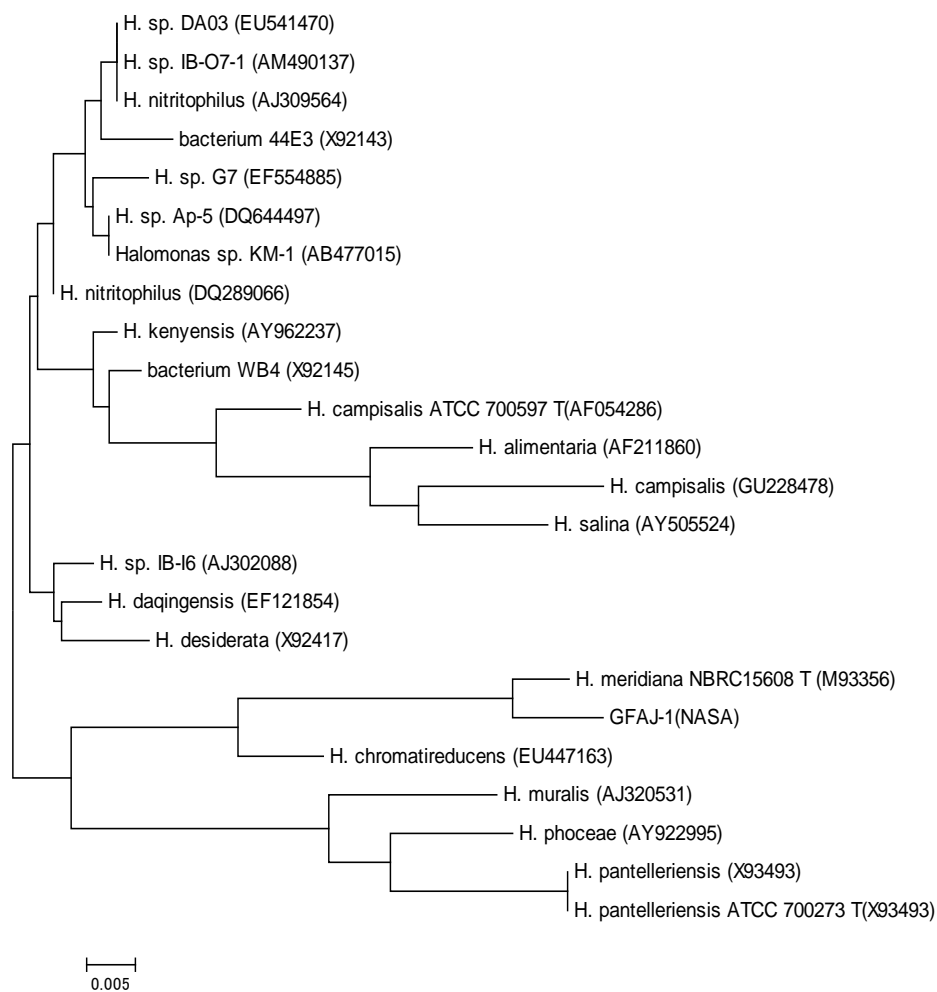


図 3. *Halomonas* sp. KM-1 株の 16SrRNA 配列による系統樹

系統樹は、16S rRNA の遺伝子配列により *Halomonas* sp. KM-1 株の配列を、他のハルモナス菌と比較し、最尤法により作成した。括弧内に GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers を示した。バーは遺伝子変化 1%を示した。

菌株の性状は以下の通りである。37℃にて、24 時間程度培養したコロニーの形状は、直径 1.0~1.5 mm、ごく薄いオレンジ~薄い肌色の色調であり、これを長期に冷蔵保存すると白っぽくなる。形は、円形、隆起状態は半レンズ状、周辺は波状、表面の形状はスムーズ、不透明であり、粘稠性である。 生育当初は薄いオレンジから薄い肌色だが、数日すると白っぽくなる。きれいな単一のコロニーを形成するのは難しく、画線培養の場合連続したコロニー群となりやすい。30%グリセロール溶液を用いて、-80℃付近での凍結法による保管が可能である。

1-2 *Halomonas* sp. KM-1 株の高度利用に向けた基礎検討

1-2-1 *Halomonas* sp. KM-1 株のゲノムシーケンス解析

株式会社ジナリスに依頼し、以下の手法によりゲノム解析をおこなった。以下は株式会社ジナリスの報告書から引用した。

1-2-1-1 ゲノム配列決定

Roche 社 454 GS FLX シーケンサーを用いた **Pyrosequencing** 法により配列決定を行った。Library は約 3 kb の **Mate-Pair Library** 法を用いて構築した。ゲノム配列決定を行った結果、100 Mb 以上の配列が判読できたが、アセンブルの結果、1,000 個以上の contigs と 48 個の scaffolds (4 kb 以上の scaffolds は 20 個以上) となった。そこで、さらに **Fragment Library** を作製し、配列決定を行い、アセンブリーを行った。その結果を表 1 に示した。

表 1 配列決定の結果

リード数	1,120,000 リード
全リード長 (リンカーを除く)	205 Mb
Contigs N50 (kb)	60.6 kb
Assembly size (Mb)	5.0 Mb
Genome Coverage	41
Large Contigs の数	208 個
Scaffold の数	6 個
Scaffold N50	2.89 Mb
Largest Scaffold	2.89 Mb

1-2-1-2 アノテーション用配列の調製

配列決定された細菌 *Halomonas* sp. KM-1 株のゲノム配列は、合計 7 個の Scaffold (=supercontig) から成り、その総塩基数はギャップも入れて **5,080,931 bp** である。Scaffold 配列の切れ目の遺伝子を解析するために、各 Scaffold の左端に 20 bp のリンカー **XXXXXXXXTTATGTTATGTTATG** を、そして右端に 20 bp のリンカー **CATAACATAACATAAXXXXX** を連結した後、遺伝子同定&アノテーション解析を行う

こととし、塩基配列の総計は、5,081,211bp となった。

1-2-1-3 Scaffold の Genaris Flexible Annotator による解析

遺伝子同定エンジンとして GeneLook3 を搭載した Genaris Flexible Annotator Ver1.31 を用いて遺伝子同定とアノテーション解析を行った。

BLAST 解析は、「COG ベースの蛋白質データベース」と「SWISS-PROT 由来の蛋白質データベースを細菌ゲノムアノテーション用に加工したデータベースに、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 のデータを加えたもの」を用いた。

GeneLook3 による遺伝子予測に関しては default 閾値を用いたアノテーション解析で同定した翻訳領域予測 CDS は 4509 個であった。他の分析の結果では CDS 数は、3911 個から 4628 個であった。リボソーム RNA 遺伝子について、16S rRNA と 23S rRNA に対応する遺伝子が検出された。tRNA 遺伝子は国立遺伝学研究所—山形大学との共同で開発された tRNA 遺伝子予測プログラムである Clover Finder を用いて 57 個検出された。リボソーム RNA オペロン内に tRNA 遺伝子が存在するケースが多いので、tRNA 遺伝子は 57 個以上存在すると予想される。なお、Selenocysteine コドンをもつ遺伝子も 1 個同定され、かつ Selenocysteine コドンに対応する tRNA も検出された。

1-2-1-4 近縁菌ゲノムに対する *Halomonas* sp. KM-1 株 Scaffold 配列のシンテニー解析および整列解析

近縁菌 *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 のゲノムアノテーション解析

近縁菌として *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 を選び、染色体 DNA に対して Genaris Annotation Viewer Ver 1.31 を用いて遺伝子同定&アノテーション解析を行った。上記で得た *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 のアノテーション結果と *Halomonas* sp. KM-1 株の計 7 個の Scaffold 配列に対するアノテーション結果をもとに、Genaris Contig Analyzer Ver 2.31 を用いて、*Halomonas* sp. KM-1 株 Scaffold 配列の *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 に対するシンテニー解析および整列解析を行った。GC skew 解析の結果、GC skew 値の変曲点が Scaffold00001 内と Scaffold00006 内に検出された。dnaN 遺伝子の位置をもとに、Scaffold00006 内の変曲点が染色体 DNA 複製開始部位、Scaffold00001 内の変曲点が染色体 DNA 複製終止部位と予測された。

シンテニー解析におけるドットプロット解析の結果をもとに、Scaffold00006 (reverse complement)、Scaffold00005、Scaffold00004 (reverse complement)、Scaffold00001 (reverse complement) がこの順で連結することが示唆された。このように連結した場合に、GC skew 値の山の連続性もきれいに揃い、かつ染色体 DNA 複製開始部位と染色体 DNA 複製終止部位の間の距離が右回りと左回りで大きな差がないことから、上記の順番、すなわち Scaffold00006 (reverse complement)、

Scaffold00005、Scaffold00004 (reverse complement)、Scaffold00001 (reverse complement) と並んでいると推察された。

Scaffold00002 は大腸菌ベクター由来のものであり、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 にも全く張り付かないことを確認した。

Scaffold3 からは、Genaris Flexible Annotator Ver1.31 を用いたとき、遺伝子は予測されなかったが、BLAST 解析を別途行ったときに、*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 の aminoglycoside phosphotransferase [Chromohalobacter] と弱い相同性が認められたことから、*Halomoas* sp. KM-1 株由来の断片であることは間違いないが、帰属先は不明である。

なお、7 個すべての Scaffolds について分断された翻訳領域をもとにした Scaffold 間の連結を試みたが、連結すべき Scaffold は見つからなかった。

1-2-1-5 連結 Scaffolds に対する遺伝子同定およびアノテーション解析

遺伝子同定エンジンとして GeneLook3 を搭載した Genaris Flexible Annotator Ver1.31 を用いて遺伝子同定とアノテーション解析を行った。

BLAST 解析は、「COG ベースの蛋白質データベース」と「SWISS-PROT 由来の蛋白質データベースを細菌ゲノムアノテーション用に加工したデータベースに、「*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 のデータを加えたもの」を用いた。

GeneLook3 による遺伝子予測に関しては default 閾値を用いたアノテーション解析で同定した翻訳領域予測 CDS は 4509 個であった。

GeneLook3 による遺伝子予測に関しては default 閾値を用いた上記アノテーション解析で同定した翻訳領域をもとに、KEGG データベースに対する相同性解析も実行した結果も含めたアノテーション解析を実施した。

さらに、default 閾値のもと予測した CDS の配列を教育データとして Glimmer3 を用いて CDS を予測を再度行った。Glimmer3 を用いた場合、false positive 数が上昇するので、予測 CDS 数は 4628 個となった。これらの CDS の開始コドンと終止コードンの位置情報をもとに、Genaris Annotation Viewer (GAV) ver 1.31 を用いてアノテーション解析を行った。

Glimmer3 を用いて遺伝子を予測した場合、正しい遺伝子数よりかなり多く遺伝子が予測される傾向があることが知られている。本菌ゲノムの場合でも、GeneLook では 4454 個であるのに対して、Glimmer3 では 4628 個と予測されている。

Glimmer3 を用いて予測する場合に、正しい CDS のアミノ酸配列情報が必要となるが、本解析においては Genaris Flexible Annotator を用いて予測された 4454 個のデータを教育データとして用いた。Genaris Flexible Annotator を用いた場合に、BLASTP でヒットする遺伝子数は 3911 個であったが、Glimmer3 では BLASTP でヒットする遺伝子数は 3819 個であり、98 個の BLAST ヒット遺伝子の予測漏れが認められた。

以上、Glimmer3 を用いて遺伝子予測を行った場合、正しい遺伝子数よりかなり多く遺伝子が予測される傾向があり、かつ BLAST ヒット遺伝子の予測漏れが高頻度で認められることから、GeneLook による予想 **CDS4454 個** を代表的ものと判断した。

1-3. 突然変異株の育成

Halomonas sp. KM-1 株の、高アルカリ、メタノールなどへの耐性向上のため、ミュートーション手法の開発をおこなった。

対数増殖期の菌体をプレートに塗布し、生存率が一万分の一以下になるよう紫外線を、5-10 分程度照射し、変異体を得た。現在これらの変異株について、高アルカリ、メタノール耐性等について検討している。

Halomonas sp. KM-1 株よりも優れた形質の菌株は得られなかった。