

# *Vibrio marinus* の低温生育に関する 遺伝子の探索

日野まど香, 小柳恵美, 根占順子, 波多野昌二

(西九州大学健康栄養学科)

(平成17年12月8日受理)

## Search for a Cold Shock Gene from the Psychrophilic Marine Bacterium *Vibrio marinus* and its Sequence

Madoka HINO, Megumi KOYANAGI, Junko NEJIME, Shoji HATANO

(Department of Health and Nutrition Science, Nishikyushu University)

(Accepted December 8, 2005)

### Abstract

We searched a cold shock protein (*csp*) gene of the psychrophilic marine bacterium *Vibrio marinus* by polymerase chain reaction (PCR) method using a pair of degenerate primers. The degenerate oligonucleotide primers (*csp1*, *csp2* and *csp3*) were designed on the basis of the conserved sequences of the major cold shock proteins. The PCR reactions using a pair of *csp1* or *csp2* primers generated an appropriately sized product from *V. marinus*. The PCR product by a pair of *csp1* primers was sequenced by PCR direct sequence method. The deduced amino acid sequence showed high sequence similarities with the major cold shock proteins of *Escherichia coli* (51%) and *Salmonella typhimurium* (49%). Furthermore, this gene included two nucleic acids binding-like motifs, RNP1 and RNP2. These results suggest that *V. marinus* has a *csp* gene and this gene may function as a RNA chaperone for cold adaptation.

Key words : cold shock      低温ショック  
psychrophilic marine bacterium      好冷性海洋細菌  
polymerase chain reaction (PCR)      複製連鎖反応

## 1. 緒 言

細菌は生育できる温度範囲の違いによって、高温性、中温性、低温性細菌に大別される。さらに、低温環境下で生育可能であるが最適生育温度が20℃をこえるものを低温菌、最適生育温度が15℃以下で生育上限温度が20℃前後のものを好冷菌と呼んでいる<sup>1)</sup>。地球上の生物圏の80%近くが低温環境下にあり、細菌は自然の至るところに生息していることから、様々な低温ストレスに適応・応答する戦略をもっていることが明らかになって来ている。

これまでに、中温菌の低温応答は、*Escherichia coli* 及び *Bacillus subtilis* について盛んに研究が行われ<sup>2,3)</sup>、低温ストレスつまり生育下限温度付近に急激に温度シフト（コールドショック）を与えると、細胞内のタンパク質合成が変化することが報告されている。このコールドショックにより新たに誘導されたタンパク質はコールドショックタンパク質(Csp)とよばれ、リボソーム結合タンパク質、翻訳因子、DNAジャイレースなどに加え、CspAとそのファミリータンパク質であることが報告されている<sup>4)</sup>。このファミリータンパク質は、アミノ酸数70前後の小さいタンパク質で、*E. coli* においては *cspA* ~ *cspI* の9個の遺伝子によりコードされ、そのうちCspA, CspB, CspG, CspIが低温ショックにより誘導される。また、CspAは2つのRNA結合モチーフ (RNP1, RNP2) を介して、一本鎖RNAおよび一本鎖DNAに結合するが、二本鎖DNAへの結合能は持たないことから、低温下でmRNA上に形成される二次構造を解消するRNAシャペロンとして活性を有し、低温下での翻訳活性の維持に働くと考えられている<sup>5)</sup>。

また、低温菌のCspについては、*Pseudomonas fragi*, *Bacillus psychrophilus*, *Arthrobacter globiformis* 等を使って研究が行われ、中温菌といくつか異なった点が報告されている<sup>6)</sup>。さらに、低温菌には、低温下で継続的に発現する低温下での生存に根源的に必要と考えられる低温

蓄積タンパク質(Cap)と呼ばれる一群のタンパク質が存在することも知られている。

しかしながら、好冷菌を用いた研究は非常に少なく、低温ストレスに対する適応・応答機構について不明な点が多い。本研究で用いた *Vibrio marinus* は、海洋から単離された最適温度が15℃の好冷菌である。この菌については、今までに malic dehydrogenaseをはじめとした酵素が、中温菌のものよりも、低温で活性が維持され、活性適温および失活温度が低い傾向である<sup>9,11)</sup>ことや、多価不飽和脂肪酸合成系酵素の遺伝子解析<sup>12)</sup>が行われているなど若干の知見が得られている。しかしながら、中温菌や低温菌にコールドショックを与えたときに発現される *csp* 遺伝子が、*V. marinus* でもコールドショックを与えると発現されるのか、それとも低温環境下で生育するために *csp* 遺伝子は常時発現しているのか等、低温生育について不明な点が多い。

そこで、本研究では、好冷菌の低温生育について解明することを目的として、まずは、中温菌や低温菌に存在する低温生育に関与する遺伝子の一つである *csp* 遺伝子が *V. marinus* にも存在するか探索を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株

*Vibrio marinus* MP-1は、ATCC (American Type Culture Collection) より購入した。

### 2.2 DNAの抽出

*V. marinus* 株を3%食塩添加普通ブイヨン(栄研化学社製)液体培地5 mlに接種し、17時間、15℃で培養後、1 mlをマイクロチューブにとり遠心分離(15000 g, 5分)をした。上清を取り除き、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 100 µlを加え攪拌後、100℃で5分加熱することによりDNAを抽出した。遠心分離(15000 g, 5分)後、その上清を鋳型DNAとした。

表1 degenerateプライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列	プライマー設計の基になる遺伝子名
<i>csp1F</i>	CCCGAATTCGGTAHAGTAAAATGGTTYAACKC	<i>Escherichia coli</i> ( <i>cspA</i> , <i>cspB</i> ), <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>cspB</i> ),
<i>csp1R</i>	CCCGGATCCGGTTACGTTASCWGCTKSHGGDCC	<i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>cspL</i> )
<i>csp2F</i>	GGTTTAATGTAGACAARGGNTTYGGNTTYAT	<i>Escherichia coli</i> ( <i>cspA</i> ), <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>cspB</i> )
<i>csp2R</i>	TAGTAGGTACCRRTTNGCNGCYTGNGGNCC	
<i>csp3F</i>	GGNMHIGTNAARTGGTTYAA	<i>Escherichia coli</i> ( <i>cspA</i> , <i>cspB</i> , <i>cspC</i> , <i>cspD</i> , <i>cspE</i> , <i>cspF</i> , <i>cspG</i> )
<i>csp3R</i>	AARTGNACRAANACRTC	

F: forward primer R: reverse primer

### 2.3 degenerate プライマーの作成

degenerate プライマーは、既知の *csp* 配列より推測された保存配列をもとに、3組のプライマー (*csp1*, *csp2*, *csp3*) を設計した (表1)。尚、*csp1* プライマーは *Escherichia coli cspA* と *cspB*, *Bacillus subtilis cspB*, *Listeria monocytogenes cspL* の低温誘導性主要コールドショックの遺伝子配列をもとに、フォワードとリバースの2種類を設計した。同様に、*csp2* プライマーは、*E. coli cspA* と *B. subtilis cspB* より、*csp3* プライマーは *E. coli cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD*, *cspE*, *cspF*, *cspG* より設計した。プライマー合成はシグマジェノシスジャパン株式会社に依頼した。

### 2.4 degenerate PCRによるDNAの増幅

調製したDNAを鋳型として、degenerate PCRを行った。DNAポリメラーゼとして、*Ex Taq* ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を使用し、反応溶液の組成は使用マニュアルに従って、鋳型DNA 1  $\mu$ g, 100 mM degenerate プライマー 0.5  $\mu$ l, 5 unit/ $\mu$ l DNAポリメラーゼ 0.5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP (デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液) 溶液 4  $\mu$ l, 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH8.3) 5  $\mu$ l を加え、滅菌水で反応系の全量が50  $\mu$ l になるようにした。DNAの増幅は、サーマルサイクラー (アステック社製 PC701, 0.5  $\mu$ l ブロック) を使用し、45サイクルの熱変性 (94°C, 1分), アニーリング (*csp1*; 50°C, *csp2*; 55°C, *csp3*; 30°C, 1分), DNA伸長反応 (72°C, 2分) を行った。

### 2.5 DNAの電気泳動

degenerate PCR終了後の反応液10  $\mu$ l にローディングバッファー (グリセリン30%, プロモフェノブルー0.25%, 滅菌水69.75%) 1  $\mu$ l を混和後、1%アガロースゲル (フナコシ社製, アガロース36GU) に注入し、ミニ水平電気泳動システム (バイオ社製) を用いて100 Vで40分間泳動した。泳動終了後、DNAをエチジウムブロマイド溶液で染色し、泳動図をトランスイルミネーター (フナコシ社製) で観察した。

### 2.6 塩基配列解析およびホモロジー検索

*csp* 遺伝子と推定された増幅DNAをアガロースゲルより切り出し、PCRダイレクトシーケンス法による塩基配列解析に用いた。塩基配列解析は、東洋紡ジーンアナリシス株式会社に依頼した。明らかになった配列をもとにアミノ酸配列を推定し、データベースのBLASTによりホモロジー検索を行い、増幅DNAの機能を予測した。

## 3. 実験結果

### 3.1 *csp* プライマーによるdegenerate PCR

3組のdegenerateプライマー (*csp1*, *csp2*, *csp3*) を用いて、PCRを行った結果、*csp1* と *csp2* プライマーを用いたときにだけ、複数のバンド、つまりDNAの増幅がみられた (図1)。NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース上で、*E. coli* の *cspA* は219 bp, *cspB* は216 bp, *B. subtilis* の *cspB* は204 bp, *L. monocytogenes* の *cspL* は201 bp, *V. parahaemolyticus* のコールドショックに関与するタンパク質の遺伝子は207 bpであることが登録されている。今回の実験より、*V. marinus* にも200 bp付近にDNAの増幅が認められた (図1, 矢印で示す)。したがって、これらのDNAが、*V. marinus* の *csp* 遺伝子ではないかと推測し、さらに塩基配列の解析を行った。

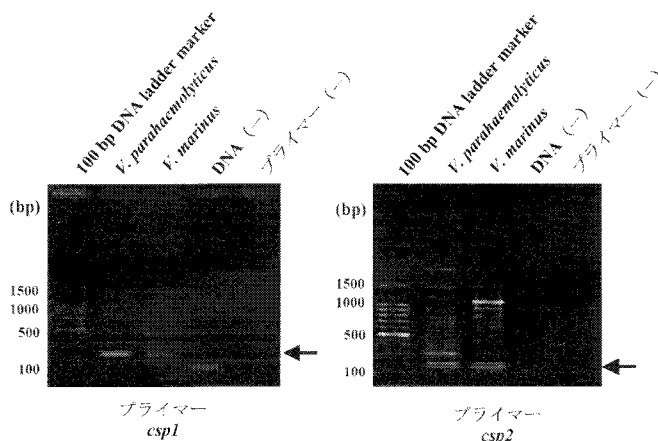


図1 degenerate PCR産物のアガロースゲル電気泳動結果

矢印は、*csp* 遺伝子と推定されるバンドであり、このバンドを切り出して塩基配列を調べた。

### 3.2 塩基配列解析およびホモロジー検索

*csp1* と *csp2* プライマーによる増幅DNAの塩基配列解析を行った結果、*csp2* プライマーによる増幅DNAは、類似したサイズの増幅DNAが混在し、塩基配列を解析することができなかった。一方、*csp1* プライマーによる増幅DNAは、完全に塩基配列を同定することはできなかったが、179の塩基配列を明らかにすることができた (図2)。得られた配列を6通りのアミノ酸配列に変換し、ORF (open reading frame) を決定後、それによりホモロジー検索を行った。その結果、*E. coli* のコールドショックタンパク質の *cspA* 遺伝子 (51%) や *S. typhimurium* のコールドショック様タンパク質の *cspJ* 遺伝子 (49%) をはじめとした、コールドショックタンパク質及びコールドショック様タンパク質の遺伝子と高い相同性を示した (表2)。高い相同性を示した遺伝子は、深海低温性細菌 *Shewanella violacea* のコールドショック様タンパク質

遺伝子以外は中温菌の遺伝子であった。また、推定されたアミノ酸配列には、Cspに存在することが知られているRNA結合モチーフ、RNP1(KGFGFI)とRNP2(VFVHF)とほぼ類似したKVFGFI(RNP1)とVXAHF(RNP2)の配列が存在していた(図3)。

```

1      10      20      30      40
AANCTAAAGGCTCTTCGGTTTCATTCACAAACAAGAAAACGGTCCCNGAC
X L K V F G F I P N K K T V X D
          RNP1
50      60      70      80      90
GTGTTNGCTCACTTCAGCNCTATCANNANGGACGGCTTNNNTGCACTT
V X A H F S X I X X D G X X A L
          RNP2
100     110     120     130     140
NCAGANAACCAAAAAGTTGAGTTCACNCTTGGCTCGCATGGCCAAAAA
X X N Q K V E F T V A S H G Q K
150     160     170
GGNCCNNCAGCTGNTAACGTAACCGGATCCGGGC
G P X A X N V T G S G

```

図2 PCR産物(*cspI*)の塩基配列及び推定アミノ酸配列

RNP1とRNP2は、RNA結合モチーフを示す。

表2 ホモロジー検索結果

タンパク質名	菌名	Identities	Positives
Cold shock protein CspA	<i>Escherichia coli</i>	51%	55%
Cold shock-like protein CspJ	<i>Salmonella typhimurium</i>	49%	54%
Major cold-shock protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>	48%	55%
Cold shock-like protein CspC	<i>Shigella flexneri</i>	48%	51%
Cold shock-like protein CspC	<i>Escherichia coli</i>	48%	51%
Cold shock-like protein CspB	<i>Escherichia coli</i>	47%	50%
Cold shock-like protein CspG	<i>Shewanella violacea</i>	47%	47%
Cold shock protein CspF	<i>Streptomyces coelicolor</i>	46%	53%
Cold shock-like protein CspE	<i>Escherichia coli</i>	45%	56%
Cold shock-like protein CspG	<i>Escherichia coli</i>	45%	54%

```

V. marinus      KVFGFI  FNKKT V X I V X A H F  S X I X X D G X X A L X N Q K V E F T V A S H G Q K P X A X N V T
E. coli CspA   -G---  TPDDGSK  FV--  A-QN--YKS-DEG---S--IE--A---A-G---
S. typhimurium CspJ -G---  TP-DGSK--FV--  A-QSNEFRT-NEN-E---S--EQ-P---S-V---
S. pyogenes CspA  -G---  STENG:Q  F--  A-QTN-FKT-EEG---A-D--EE--R--Q-V-I-
S. flexneri CspC  -G---  TPADGSK  FV--  A-QGN-LKT-AEG-N---EI:QD---A-V---
E. coli CspC     -G---  TPADGSK  FV--  A-QGN-FKT-AEG-N---EI:QD---A-V---
E. coli CspB     -G---  SPVDGSK  FV--  A-QN-NYRT-FEG---T-SIE--A---A-A---
S. violacea CspG -G---  TQDNGSD  FV--  RS-TS--FKT-AEG---S---EQ---LQ-A-
S. coelicolor CspF -G---  AQDGGG--FA-Y-NINAC-YRE-QEG-A-T-DI:TQ---Q-E-I-
E. coli CspE     -G---  TPEDGSK  FV--  A-QTN-FKTLAEG-R---EI:TNGA---S-A-
E. coli CspG     -G---  TPDDGSK  FV--  TAIQSNEFRT-NE-----SI:EQ--R-A-A-
          RNP1          RNP2

```

図3 PCR産物(*cspI*)の推定アミノ酸配列と相溶性の高いタンパク質のアミノ酸配列

—は *V. marinus* と同じアミノ酸残基を示す。  
 :はアミノ酸残基がないことを示す。  
 四角の枠のアミノ酸配列は、RNA結合モチーフ(RNP1とRNP2)に相当する配列を示す。

#### 4. 考 察

ヒートショック応答は、バクテリアからヒトに至るまで盛んに研究されてきたのに対して、コールドショック応答への研究は遅れている。特に、好冷菌についてのコールドショック応答についての研究はほとんど国内外とも行われていない。コールドショック応答の研究は、細菌の低温ストレス下での生育メカニズムの解明や植物や有用細菌における低温耐性獲得への改良にとって非常に重要である。

そこで、本研究では、好冷菌 *Vibrio marinus* の *csp* 遺伝子の探索を degenerate PCR法により行った。その結果、*csp3* プライマーを用いた際にはDNA増幅が認められなかったが、*csp1* 及び *csp2* プライマーを用いた際に推定増幅遺伝子サイズにDNAの増幅が認められた。コールドショックにより発現されるのは、*csp* 遺伝子のうち *cspA*, *cspB*, *cspG*, *cspI* であり、*csp1* 及び *csp2* の2種のプライマーは、このコールドショックで発現される遺伝子をもとに作製されているが、*csp3* プライマーは、コールドショックで発現されない遺伝子も含めた *E. coli* *cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD*, *cspE*, *cspF*, *cspG* により設計されているために、DNAが増幅されなかったと考えられた。本研究では、*csp1* プライマーを用いた際に増幅されたDNAについて、塩基配列解析およびホモロジー検索を行い、増幅されたDNAが *csp* 遺伝子であると推定した。明らかになった塩基配列から推定されたアミノ酸配列と高い相溶性を示したものは、コールドショックタンパク質及びコールドショック様タンパク質の遺伝子のみであり、*V. marinus* に *csp* 遺伝子が存在する可能性は高い。

今回、degenerate PCR後のDNA増幅断片に、非常に類似したサイズの増幅断片が含まれ、完全に塩基配列を同定することができなかった。よって、今後は、今回明らかになった配列を利用した相溶性の高い新たなプライマーの設計やより確実なPCRを行うための条件を再検討する必要がある。また、コールドショックを与えたときに実際にCspが発現されるのか、もしくは、低温環境でしか生育することができない好冷菌は常時その遺伝子を発現しているかなど、この遺伝子の発現パターンについて解析する必要もある。またさらに、今回明らかになった遺伝子配列には、RNA結合類似モチーフが存在しており、*V. marinus* で発現されるCspが低温下でmRNA上に形成される二次構造を解消するRNAシャペロンとして働いている可能性が推測された。よって、RNAとの結合能やシャペロンとして機能しているか調べることも今後の課題である。

## 5. 要 約

好冷菌も、中温菌や低温菌と同様に低温生育に関与する遺伝子、つまり *csp* 遺伝子をもっているのではないかと考え、好冷菌 *Vibrio marinus* の *csp* 遺伝子の探索を行った。まず、種間で保存されている *csp* の遺伝子配列をもとに3組のdegenerateプライマー (*csp1*, *csp2*, *csp3*) を設計しPCRを行った。その結果、*csp1*, 2プライマーを用いた際に推定遺伝子サイズである200 bp付近にDNAの増幅が認められた。そこで、共雑DNAの少ない *csp1* の増幅DNAの塩基配列解析を行ったところ、179塩基配列を決定することができた。さらに、塩基配列より推定されるアミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行ったところ、大腸菌やサルモネラの *csp* 遺伝子と45%以上の高い相同性を示すことが分かり、好冷菌 *V. marinus* にも *csp* 遺伝子が存在することが推測された。また、この遺伝子の中にはRNP1とRNP2の2つのRNA結合類似モチーフが存在したことから、*V. marinus* のCspもRNAシャペロンとして機能している可能性があると考えられた。

## 6. 参 考 文 献

- 1) R. Y. Morita: *Bacteriol. Rev.*, 39, 144 (1975)
- 2) S. Phadtare: "Bacterial stress response" Edited by G. Storz and R. Hengge-Aronis, p.33 (2000) (ASM Press, Washington, DC)
- 3) K. Yamanaka: "Cold shock response and adaptation" Edited by M. Inouye and K. Yamanaka, p.5 (2000) (Horizon Scientific Press, Norfolk)
- 4) P. L. Graumann, M. A. Marahiel: "Cold shock response and adaptation" Edited by M. Inouye and K. Yamanaka, p.41 (2000) (Horizon Scientific Press, Norfolk)
- 5) S. Phadtare, J. Alsina, M. Inouye: *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 229 (1999)
- 6) W. Jiang, Y. Hou, M. Inouye: *J. Biol. Chem.*, 272, 196 (1997)
- 7) A. M. Gounto, N. J. Russell: "Cold-adapted organisms. Ecology, physiology, enzymology and molecular biology", p. 33 (1999) (Springer Verlag, Berlin)
- 8) M. Hebraud, P. Potier: "Cold shock response and adaptation" Edited by M. Inouye and K. Yamanaka, p.41 (2000) (Horizon Scientific Press, Norfolk)
- 9) P. Langride, R. Y. Morita: *J. Bacteriol.*, 92, 418 (1966)
- 10) L. P. Jones: *Zeit. Allgem. Microbiol.*, 19, 97 (1979)
- 11) P. Mitchell, H. C. Yen, P. F. Mathemeier: *Appl.*

*Environ. Microbio.*, 49, 5, 1332 (1985)

- 12) N. Morita, M. Tamaka, S. Ohgiya, T. Hoshino, K. Kawasaki, I. Yumoto, K. Ishizaki, H. Okuma, A. Ueno: *Biotechnol. Lett.*, 21, 7, 641 (1999)
- 13) S. Fujii, K. Nakasone, K. Horikoshi: *FEMS Microbio. Lett.*, 178, 123 (1999)