

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		極限環境に存在する未知・未利用機能遺伝子を掘り起こす基盤的ツールの開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of basic tool for exploring unknown functional genes from extreme environment			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)モロノ	名)ユウキ	研究期間 B	2017 ~ 2018 年
	漢字 CB	諸野	祐樹	報告年度 YR	2018 年
	ローマ字 CZ	Morono	Yuuki	研究機関名	海洋研究開発機構
研究代表者 CD 所属機関・職名		国立研究開発法人 海洋研究開発機構 高知コア研究所 グループリーダー代理			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。) 地球表面積の 7 割を占める海底下には分離・培養に至っていない多くの未知系統微生物群が優占種として存在することが明らかとなっている。本研究ではこれら未知の遺伝子機能を直接解析する方法として基質誘導による機能遺伝子発現解析(SIGEX:Substrate Induced Gene Expression)を応用し、未知微生物の生態解明と未知遺伝資源の開拓とを成し遂げる基盤的ツールの構築を目標とした。 SIGEX では、大腸菌などを宿主とするゲノムライブラリーを構築し、環境条件や基質の添加による遺伝子発現誘導を行う。ライブラリー中の挿入 DNA 断片がこの誘導にตอบสนองすれば宿主が蛍光を発し、これをセルソーターによって高速選別、調節領域および機能遺伝子を効率的に取得する。このゲノムライブラリーのサイズを可能な限り大きく取ること、および、海底下を含め、微生物生命圏の大部分を占める無酸素(嫌気)環境での誘導実験を可能とすることが、基盤的ツールとして最も重要な点であると考えた。 トポイソメラーゼ化したベクター、ベクターとインサート比の最適化、およびゲノム断片サイズ分画を実施することにより、>800bp の DNA 断片を$>10^6$のクローンバリエーションで作成することに成功した。また、従来用いられてきた <i>gfp</i> 遺伝子に代えて <i>evoglow</i> 遺伝子をレポーターとして用いることで、嫌気環境でも誘導実験が可能なシステムとして構築した。下北半島沖やマンガクラスト由来の抽出 DNA を用いて構築したライブラリーについて、MinION シーケンサーを用いた網羅的塩基配列解析を実施し、ライブラリー中の遺伝子配列カタログを作製した(結果の解析を実施中)。ハロゲン化フェノールやマンガンの基質による誘導実験を実施中であり、将来的には深海底下で繰り広げられる生物の代謝活動、海底資源のライフサイクルに関与する微生物機能の特定、さらには生命生存の極限に位置する環境微生物の生態解明にもつなげたい。					
キーワード FA	海底下生命圏	基質誘導	ゲノムライブラリー	緑色蛍光タンパク質	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

The substrate-induced gene expression (SIGEX) method is a gene-screening approach that uses a promoter trap-type vector based on the assumption that general gene expression is induced by substrates of catabolic enzymes and that regulatory elements are often located in proximity to catabolic genes. By placing the gene of green fluorescence protein at downstream of the inserted genome fragment, the gene induction response can be detected by the fluorescence of co-expressed green fluorescence protein. The clone with positive induction response is then isolated by fluorescence-activated cell sorting in high throughput manner. Since SIGEX solely rely on the gene induction response, it can provide potential functional information (at least inducing substrate) independently to the sequence information from database. In this study, we aimed to develop optimized technique to construct genomic library with largest-possible fragment variations and constructed vector that is compatible to the induction anaerobically.

We extracted DNA from subseafloor sediment samples of offshore Shimokita Peninshula, Japan, and manganese crust samples. We introduced evoglow gene into the SIGEX vector so that the expressed protein can be fluorescent form in anaerobic environment. Topoisomerase-attached vector and optimization of vector and insert genomic fragments ratio, we could achieve the genomic library clonal variation of $>10^6$ with inserted fragment size of >800 bp. Gene induction experiments are in progress.