

臨海熱水湧出域における耐塩性・超好熱ウイルスの分子系統解析と 有用酵素遺伝子の探索

土居 克実¹, 藤野 泰寛², 田代 康介¹

¹九州大学大学院農学研究院, ²九州大学基幹教育院

概要 海洋の熱水湧出孔は、原始地球の環境を残し生命進化の過程を知る好材料であるが、アクセスに多大な困難を有する。また、そのような環境に生息するウイルス・バクテリオファージ(ファージ)は、海洋の物質循環や遺伝子の水平伝播に重要な役割を果たすと推測されているが、それらの研究例は僅かしかない。そこで、海底熱水湧出孔と近似した環境を持つ臨海域の温泉からウイルスやファージを探索し、その性状を解析すると共に新たな遺伝子資源としての探索を行った。

長崎県小浜温泉の堆積物(75°C, pH 7.5)を分離源として、好熱性・耐塩性ファージを分離した。それらのうち、ファージ ϕ OH2 は λ ファージ様の *Siphoviridae* 科に分類され、ファージ ϕ OH3 は *Inoviridae* 科に分類される繊維状ファージであった。 ϕ OH2、 ϕ OH3 は共に turbid plaque を形成し、溶原性ファージであると考えられた。これらファージの、熱・pH 安定性を試験したところ、50~60°C、pH 5~9 で 90%以上の生残率を示した。また、両ファージの耐塩性を試験したところ、0.1~0.5 M で 80%以上の生存性を示した。

2 種のファージのゲノム構造を解析したところ、 ϕ OH2 は 38,099 bp の二本鎖 DNA で 60 個の ORF が推定された。これらの ORF は溶菌酵素群、DNA 組換え酵素群、構造タンパク質群がクラスター構造をとっていた。一方、 ϕ OH3 は一本鎖 DNA をもち、宿主細胞中で二本鎖の複製形態(RF)をとることが分かった。 ϕ OH3 RF DNA は 5,688 bp で 6 個の ORF が推定されたが、既報のタンパク質をコードする遺伝子との間に相同性は認められなかった。

これら耐熱性ファージ由来の酵素のうち、溶菌酵素 Endolysin と Holin の量産に成功した。活性部位の PGRP ドメインと細胞壁結合部位の LysM ドメインを持つ ϕ OH2 Endolysin は Ni-NTA アフィニティーカラムで精製し、100 ng/ml で *G. kaustophilus* に対し溶菌作用を示し、活性の最適温度および最適 pH がそれぞれ 70°C と 7 であることが分かった。また、20 分間の加熱処理後、85°C では 90%以上、100°C でもおよそ 40% 残存活性がみられ、優れた耐熱性を示した。さらに、pH 5~10 での 3 時間処理後でも、大きな活性の低下はみられなかった。*G. kaustophilus* 以外にも、宿主である *T. thermophilus*、*E. coli* や *L. johnsonii* に対しても溶菌活性の確認ができた。これまで耐熱性溶菌酵素の報告例は少なく、特に PGRP ドメインを持つ耐熱性溶菌酵素の機能解析としては本研究が初めての報告である。Holin は pColdTF を用い融合タンパク質として発現させることに成功し、同様に優れた耐熱性、pH 安定性を持つことが示された。

1. 研究目的

F. Twort によって 1915 年に発見されて以来、細菌ウイルスであるファージは地球上に 1 億種以上が存在すると推測される膨大な未利用遺伝子資源である。ファージはそれらの形態や保有する核酸分子の種類により、*Siphoviridae*、*Myoviridae*、*Podoviridae*、*Inoviridae* などに

分類されるが未だに全容は未解明である(Ackermann 2011)。その膨大な資源のうち、大腸菌に感染する λ ファージはファージベクターなどの遺伝子工学のツールとして利用されており、M13 ファージはファージディスプレイによる抗体生産に用いられ、さらに、T4 ファージは DNA リガーゼなどの供給源として幅広く用いられている。また、

MRSA などの多剤耐性菌の出現により、治療困難な院内感染症に対し、ファージセラピーが治療法として有効性を示している(Henry and Debarbieux 2012)。

さらに有用なファージ(ウイルス)資源の探索には海洋が重要な役割を果たすと考えられる。地表の多くを占める海洋は生命起源の場であるが、海洋におけるファージ数は 10^7 /ml と算出されており、海の生態系や物質循環に重要な影響を及ぼすことが報告されている(Fuhrman 1999; Weinbauer 2004)。また、海洋の深部の熱水湧出孔などからは、アーキアなど分子系統樹の根元に位置する生物が単離されており、原始地球に最も近い環境と考えられている。一般にウイルスは宿主より古い遺伝情報をもつことが知られており、深海の熱水湧出域は生命進化の根源に位置する遺伝情報をもつウイルスやファージが生息する可能性がある。ところが、深海の熱水湧出孔からの試料採取は困難であり、さらには、ウイルス単離には特殊技法を要するためと高温の海水からのウイルス探索は困難とされてきた。

そこで、本研究では海岸に面し、地下深くの海水がマグマによって温められ、 100°C 近い地熱熱水が噴出する小浜温泉の熱水に着目し、これらから極限環境微生物に感染性を示すファージの分離を試みた。それらの特性やゲノム構造を明らかにすることで、始原生命の遺伝情報が理解できるだけでなく、ファージの感染機構を追究することで一本鎖核酸から二本鎖 DNA への転換や、ファージが介在する遺伝子の水平伝播の有り様も理解できると考えられる。さらに、ゲノム情報に基づいて、発現系を構築し、ファージタンパク質の機能解析を行うことを目的とした。特に、耐熱性抗菌剤として期待される溶菌酵素 Endolysin および Holin に注目し、研究を行った。

2. 研究方法

2.1 ファージの探索・分離

長崎県小浜温泉排水口 (75°C , pH 7.2) 沈殿物サンプルを回収し、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を指示菌として、TT 培地(Polypepton 0.8%; Yeast extract 0.4%; NaCl 0.2%; pH 7.2) を用いた二重寒天法により *Thermus* 属ファージの探索・分離を行った。分離したファージは SM buffer (50 mM Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 7 mM MgSO_4 ; 0.01% Gelatin; pH 7.5) 中に懸濁し、保存した。

2.2 表現型解析

ファージの形態を明らかにするため、ネガティブ染色法を用いた透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。次に、6 種類の *Thermus* 属菌株等を宿主としたスポットテストにより宿主域を検討した。また、種々の条件、即ち、各温度 (50°C ~ 90°C)、pH 7、1 時間、および各 pH (3~11)、 60°C で 24 時間静置したファージを *T. thermophilus* HB8 に感染させ、プラーク形成数を基にファージの熱・pH 安定性を試験した。同様に、ファージ粒子を各 NaCl 濃度 (0 M ~ 3 M)、 25°C 、pH 7 の SM buffer 中で 24 時間静置後、感染性を調べることで保存溶液中におけるファージの耐塩性を試験した。

2.3 一段増殖曲線

未吸着ファージを除いたファージ感染 *T. thermophilus* HB8 細胞を TT 液体培地に懸濁し、 70°C 、振盪培養 (160 rpm) を行い、120 分まで 10 分毎に回収した細胞液を別に増殖させた *T. thermophilus* HB8 に感染させ、形成したプラーク数から一段増殖曲線を作成した。

2.4 ファージ粒子の精製

遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4°C) により菌体残渣を除いた約 1,010 pfu/ml のファージ液 1,000 ml に DNase および RNase をそれぞれ終濃度 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、 37°C 、30 分処理を行った後、PEG 沈殿を行った。沈殿をスクロース密度勾配超遠心分離によりファージ粒子を精製した。

2.5 ファージ DNA の抽出と精製

超遠心分離にて精製したファージ粒子を SDS 処理、Proteinase K 処理を行った後、フェノール・クロロホルム処理により抽出し、エタノール沈殿して回収した。また、繊維状ファージは宿主細胞中の Replicative form (RF) DNA を Xprep Plasmid DNA Mini Kit (アズワン) により抽出・精製した。

2.6 ファージゲノム DNA の塩基配列決定と遺伝子解析

精製したファージゲノムは、454 シークエンシングシステム (Roche) にて Pyrosequence を行った。他方、繊維状ファージゲノムは各種制限酵素処理後、pUC18 ベクターに挿入し、*Escherichia coli* DH5 α に形質転換した。得られたクローンから組換えプラスミド DNA を精製し、Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ (Life Technologies) を用いて塩基配列を解読した。

それぞれ得られた塩基配列を Microbial Genome

Annotation Pipeline (MiGAP) に投入すると共に BLAST 解析により相同性解析を行った。

2. 7 ファージ溶菌酵素の大量発現

目的のタンパク質を大量に生産するため、ファージゲノムを鋳型とし、PCR 増幅後、発現ベクター pET21a および pColdTF を用いた大腸菌の大量発現系を構築した。発現用の大腸菌は *E. coli* BL21 (DE3) または Rosetta2 (DE3) pLysS を用いた。

大腸菌を 100 µg/ml のアンピシリンを加えた LB 培地で OD₆₀₀ = 0.6 まで培養し、0.1 mM IPTG 添加して 25°C で一晩培養を行った。発現タンパク質は、培養した大腸菌を超音波破碎後、遠心分離して上清を回収し、熱処理 (55°C, 30 min) 後、Ni-NTA アフィニティーカラムで精製した。

2. 8 溶菌酵素の活性評価

溶菌活性を検討するため、指示菌を培養後、集菌し PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.5) を用いて洗浄後、PBS buffer に

再懸濁した。溶菌活性は、指示菌に溶菌酵素を添加し、OD₄₅₀ 減少を計測した。また、酵素の耐熱性は各温度で 20 分静置後、12,000 rpm で 20 分遠心して、上澄み液を指示菌を混合した二重寒天に滴下し、一晩培養して溶菌ゾーンを確認した。

3. 研究結果

3. 1 熱水からの耐熱性ファージの分離

小浜温泉熱水を用い、二重寒天法により *T. thermophilus* HB8 に感染する耐熱性ファージを分離できた。これらのうち、溶菌性の高いファージ φOH2 は turbid plaque とその周縁に溶菌酵素による溶菌ゾーンを形成し、他方、プラーク数の多い φOH3 は小さい turbid plaque を形成した (Fig. 1)。また、それぞれのファージについて宿主域を調べると、φOH2 は *T. thermophilus* に属数菌株と *Geobacillus kaustophilus* に感染性を示したが、φOH3 は *T. thermophilus* HB8 のみに感染性を示した (Table 1)。

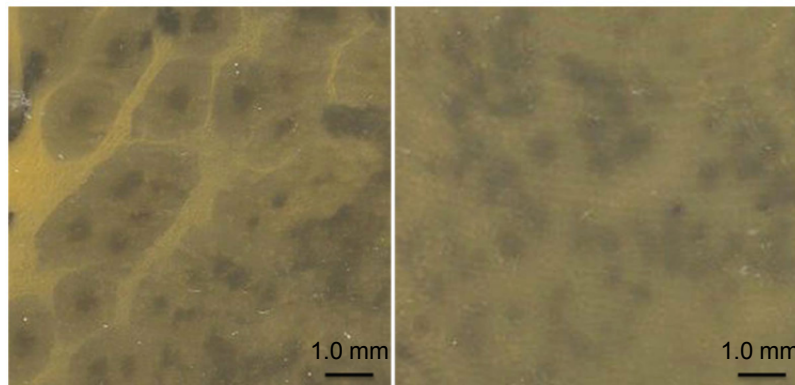


Fig. 1. 分離ファージのプラーク形状。(左)φOH2, (右)φOH3

Table 1. 分離ファージの宿主域

Host	φOH1	φOH2	φOH3	φOH4	φOH5	φOH6
<i>T. thermophilus</i> HB8	+	Δ	Δ	+	+	+
<i>T. thermophilus</i> AT62	+	+	-	+	-	-
<i>T. thermophilus</i> HB27	+	+	-	-	-	+
<i>T. thermophilus</i> TMY	(+)	-	-	-	-	-
<i>T. aquaticus</i> YT1	(+)	-	-	-	-	-
<i>T. thermophilus</i> Fiji3 A.1	(+)	-	-	-	-	-
<i>G. kaustophilus</i> NBRC 102445	-	Δ	-	-	-	-
<i>S. tokodaii</i> strain7	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> JM109	-	-	-	-	-	-

+: clear plaque, Δ; turbid plaque, -; no plaque, (+); opaque plaque

3. 2 形態による分離ファージの分類

ネガティブ染色法により、 ϕ OH2 と ϕ OH3 の形態を観察したところ、 ϕ OH2 は頭部直径 87 nm、尾部長 420 nm の λ 様ファージで *Siphoviridae* 科に分類された。他方、 ϕ OH3 は長さ約 830 nm、幅 8 nm の繊維状ファージで *Inoviridae* 科に分類できた (Fig. 2)。

3. 3 分離ファージの安定性

熱安定性試験の結果、 ϕ OH2 と ϕ OH3 はともに 60°C ~ 75°C の熱処理においても 80% 以上の生存率を示すなど、高い熱安定性を示した (Fig. 3)。また pH 安定性試験より、 ϕ OH3 は pH 5 ~ 9 の処理後も 50% 以上の感染性を示した (Fig. 4)。さらに ϕ OH3 は 0.1 ~ 0.5 M の NaCl 存在下で、

80% 以上の生存率を示した (Fig. 5)。

3. 4 ϕ OH3 の一段増殖曲線と宿主細胞内における ϕ OH3 ゲノムの挙動

ϕ OH3 の一段増殖曲線を求めたところ、 ϕ OH3 は 60 分間の潜伏期間とそれに続く 40 分間の放出期間があり、burst size は 109 PFU/cell であった (Fig. 6 (A))。

次に ϕ OH3 ファージ感染 HB8 細胞から核酸を経時的に抽出したところ、 ϕ OH3 の RF DNA と考えられる二本鎖 DNA が感染後 50 分 ~ 80 分に検出され、同時に ϕ OH3 の一本鎖 DNA も感染後 50 分 ~ 80 分に検出された (Fig. 6 (B))。

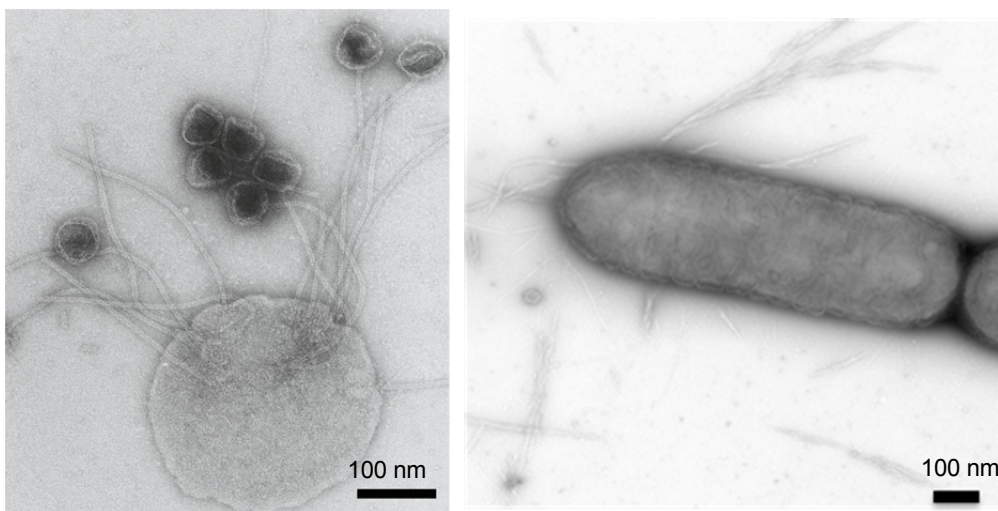


Fig. 2. ネガティブ染色法による分離ファージの電子顕微鏡写真。(上) ϕ OH2、(下) ϕ OH3。

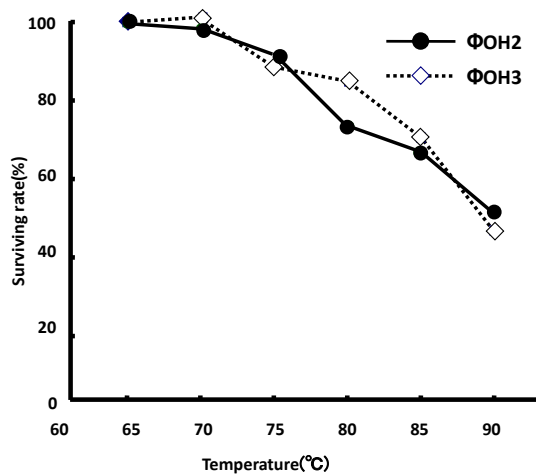


Fig. 3. 分離ファージの耐熱性

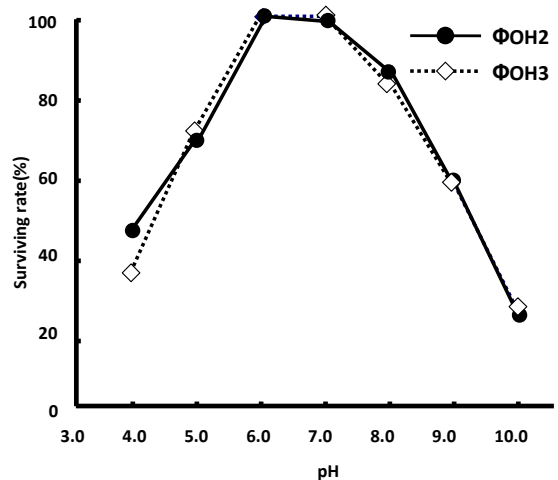


Fig. 4. 分離ファージの pH 安定性

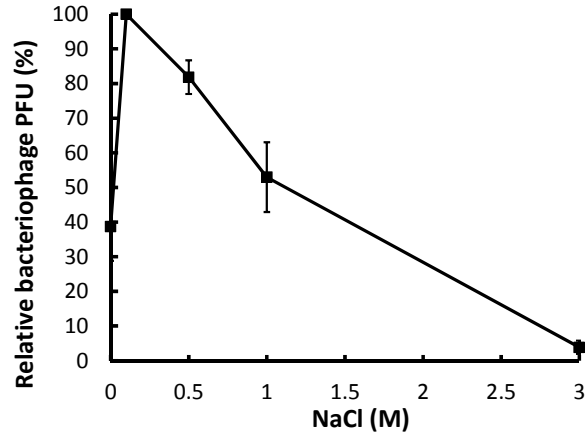


Fig. 5. ϕ OH3 の耐塩性

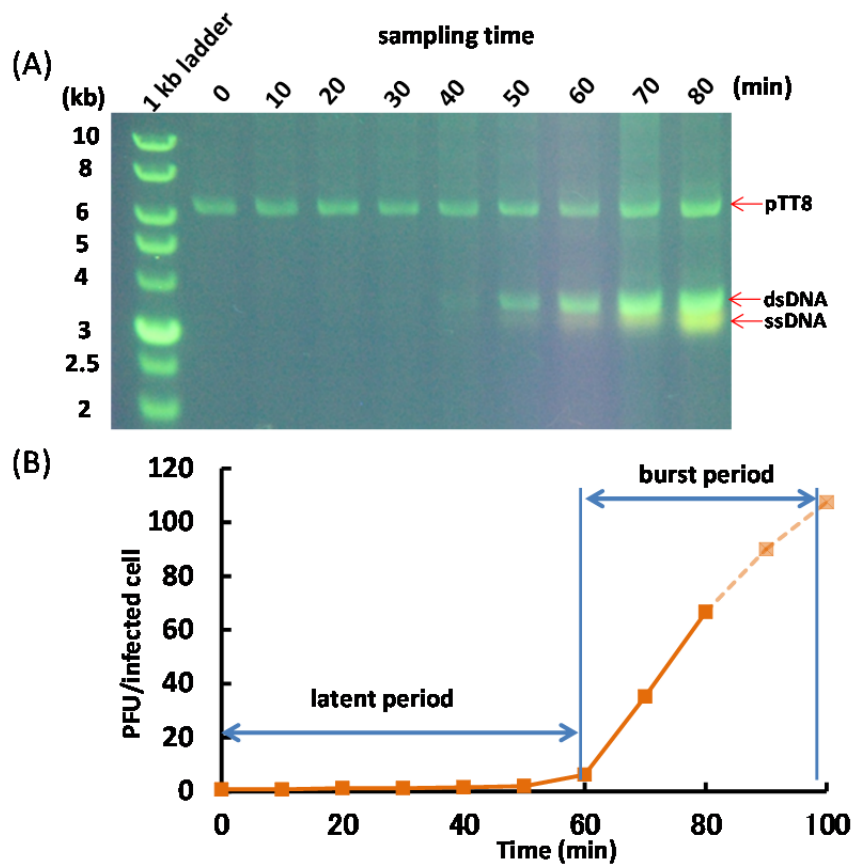


Fig. 6. ϕ OH3 ゲノムの宿主細胞内挙動 (A) と ϕ OH3 の一段増殖曲線 (B)

3. 5 ファージのゲノム構造

ϕ OH2 ゲノムを Pyrosequencing により解読したところ、その GC 含量は 44.69%、ゲノムサイズは 38,099 bp で 60 個の ORF が推定され、溶菌、DNA 代謝、構造タンパク質に関わる遺伝子がそれぞれクラスター構造をとっていた (Fig. 7)。これらの多くは *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5 ゲノム遺伝子と高い相同性を示した。

一方、 ϕ OH3 RF は GC 含量 58.03% で 5,688 bp の環状 DNA で 6 個の ORF がアノテートされたが、それらは全て *Thermus aquaticus* Y51MC23 ゲノム上の hypothetical protein と相同性を示したが (Fig. 8)、既知のファージ遺伝子とは有意な相同性を示さなかった。また、これまで *Thermus* 属の繊維状ファージでゲノム構造が明らかにされたものはなく、今回の ϕ OH3 が世界初の報告となった。

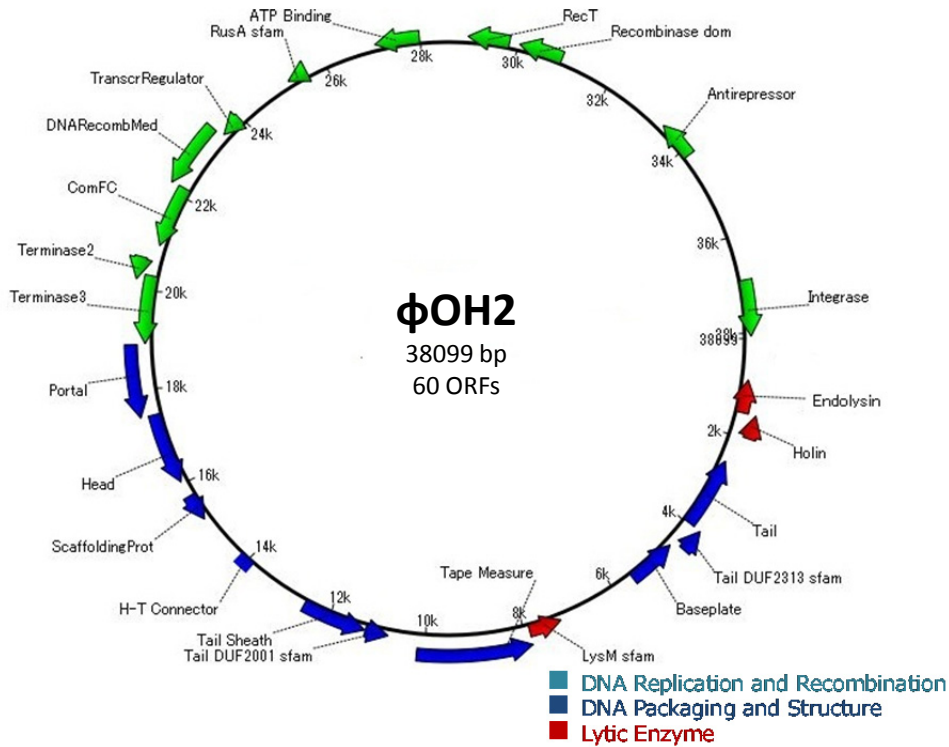


Fig. 7. ϕ OH2 のゲノム構造

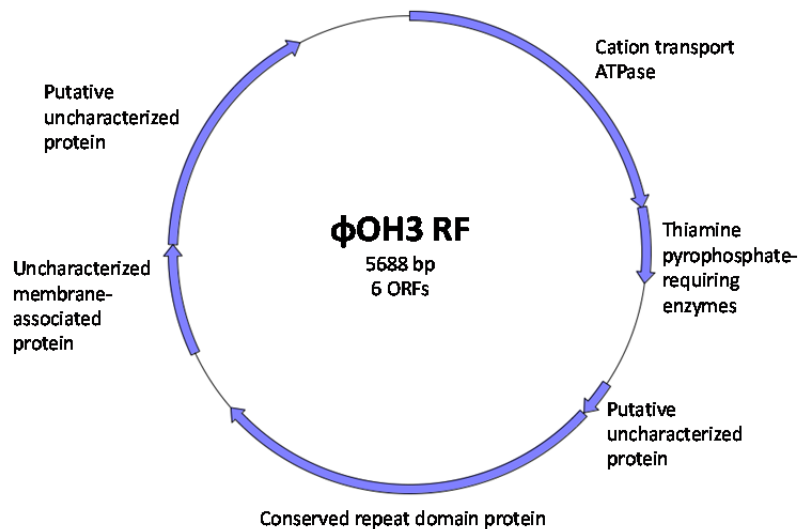


Fig. 8. ϕ OH3 のゲノム構造

3. 6 ϕ OH2 Holin の溶菌活性と安定性

大腸菌で ϕ OH2 Holin の発現誘導を行ったところ、IPTG 添加15分後に指示菌の濁度が劇的に下がり、Holin の抗菌作用を確認できたが (Fig. 9)、十分量のタンパク質は得られなかった。そこで、毒性を抑えるため発現ベクター pColdTF を用い Holin を融合タンパク質として発現させ、大量生産に成功した。

3. 7 ϕ OH2 Endolysin の溶菌活性と安定性

ϕ OH2 ゲノム上よりクローニングした Endolysin は、100 ng/ml で *G. kaustophilus* に対し溶菌作用を示し (Fig. 10 (A))、活性の至適温度および最適 pH がそれぞれ 70°C と 7 であることが分かった (Fig. 10 (B))。また、20分間の加熱処理後、85°C では 90%以上、100°C でもおよそ 40% 残存活性がみられ、優れた耐熱性を示した (Fig. 11)。

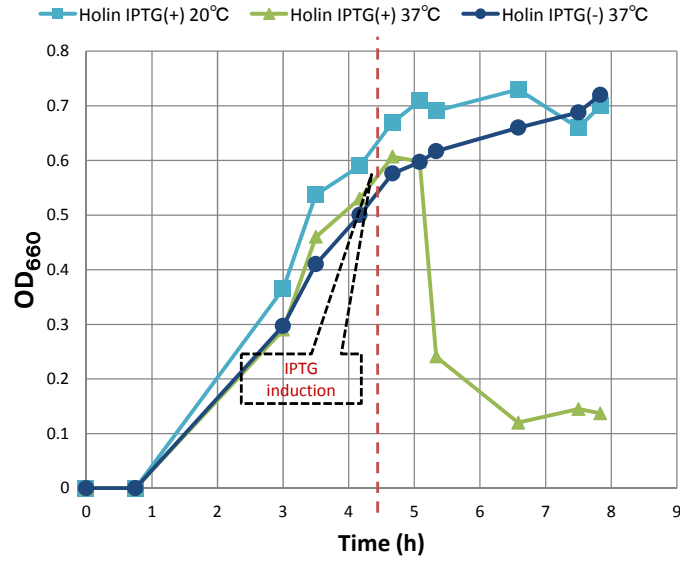


Fig. 9. ϕ OH2 Holin の溶菌活性

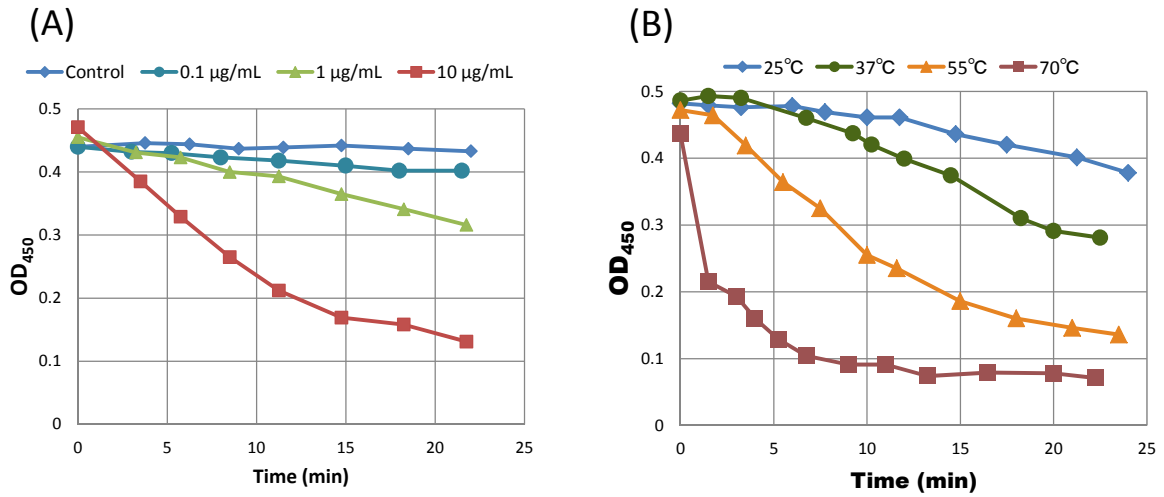


Fig. 10. ϕ OH2 Endolysin の至適酵素濃度 (A) および至適反応温度 (B)

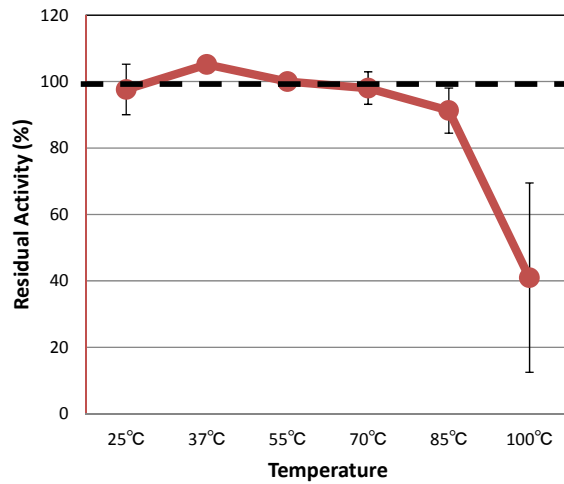


Fig. 11. ϕ OH2 Endolysin の熱安定性

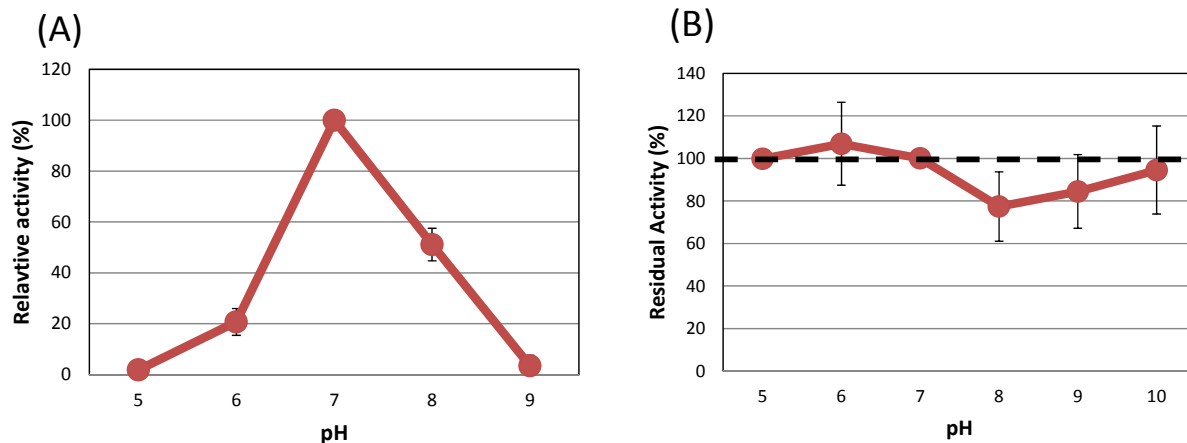


Fig. 12. ϕ OH2 Endolysin の至適 pH (A) と pH 安定性 (B)

さらに、pH 5~10での3時間処理後でも、大きな活性の低下はみられなかった (Fig. 12)。また、*G. kaustophilus* 以外、宿主である *T. thermophilus* はもちろん、*E. coli* や *Lactobacillus johnsonii* に対しても溶菌活性の確認ができた。

4. 考察

小浜温泉は海水が地下のマグマ貯留層からの熱で熱せられ、地上に湧出する温泉であり、熱水中には、地下熱水湧出孔に生息するファージと近似したファージが分離できると考え、研究を行った。その結果、現在までに異なる6種の耐熱性ファージが分離できたことは、塩を含有する熱水中にもファージは多数生息していることが窺える。Yuらはアイスランド、ニュージーランド、ロシア、米国から115種の *Thermus* 属ファージの分離を報告しているが、それらは、*Myoviridae*、*Siphoviridae*、*Tectiviridae*、*Inoviridae* 科に属し、大半(98種/115種)が *Myoviridae* と *Tectiviridae* であった (Yu et al. 2006)。今回小浜温泉から分離したファージ ϕ OH2 は *Siphoviridae* 科、 ϕ OH3 は *Inoviridae* 科に属することから、分離例が少ないファージであることが分かった。これらは性状が大きく異なるが、共に turbid plaque を形成することから溶原性ファージであると考えられる。このことは、これらファージが高温の海水中で部位特異的組換えを介して形質導入を繰り返していることを意味しており、海底熱水中での遺伝子の水平伝播がファージによって行われていることを示唆している。

それぞれのファージについて詳細な性状を解析すると、まず、 ϕ OH2 は *Siphoviridae* 科に分類され、plaque 外側の

溶菌ゾーンが大きいことから、強力な溶菌酵素を持っていることが示唆された。*Thermus* 属に感染する *Siphoviridae* 科ファージは、P23-45 や P74-26 (Minakhin et al. 2008)、TSP4 (Lin et al. 2010) が研究されているが、 ϕ OH2 は耐熱性および pH 安定性ではこれらファージとほぼ同等であった。さらに、 ϕ OH2 のゲノムサイズは 38,099 bp で、推定される ORF 数は 60 個であったが、既にゲノム配列の決定されている P23-45 (84,201 bp, 117 ORFs) や P74-26 (83,319 bp, 116 ORFs) に比べ小さい。この他、*Myoviridae* 科のファージで *T. thermophilus* HB8 に感染する ϕ YS40 (152,372 bp, 170 ORFs) (Sakaki and Oshima 1975) や *T. thermophilus* HB27 に感染する ϕ TMA (151,483 bp, 168 ORFs) (Tamakoshi et al 2011) などと比較すると ϕ OH2 のゲノムは約 5 分の 1 しかない。また、上記の *Siphoviridae* 科のファージ間、*Myoviridae* 科ファージの間には、高い遺伝子相同性が見出されているが、 ϕ OH2 と相同性を示すものは、主に *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 ゲノム上の putative gene であり、ファージ遺伝子で相同性を示すものは殆どなかった。 ϕ OH2 の起源が同株であるか、同株ゲノムに ϕ OH2 と類縁のファージが溶原化していると考えられるが、 ϕ OH2 は *Geobacillus* 属株と *Thermus* 属株間の水平伝播に機能する新規のファージであると推察される。

アミノ酸配列の相同性検索結果から、 ϕ OH2 Endolysin は活性部位の PGRP ドメインと細胞壁結合部位の LysM ドメインを持つことが分かった。また本酵素は 85°C では 90% 以上、100°C でもおよそ 40% 残存活性がみられ、優れた耐熱性を示した。さらに、pH 5~10 で大きな活性の低下はみられず、高い pH 安定性を示した。これまでの研究では

耐熱性溶菌酵素の報告は少なく、特に PGRP ドメインを持つ耐熱性溶菌酵素の機能解析としては本研究が初めての報告である。

φOH3 は繊維状ファージである *Inoviridae* 科に属するが、*Thermus* 属ファージでは PH75 ファージのみが、capsid タンパク質等の立体構造について研究されている (Pederson *et al*, 2001; Tsuboi 2005) もの、ゲノム構造の報告例はない。φOH3 は高い熱安定性と pH 安定性、耐塩性を示したが、φOH3 は、生育する環境の変化、即ち、熱水泉源の性質の変動による温度や pH の変化に適応するため、高い安定性を備えていると考えられた。φOH3 は *Inoviridae* 科の繊維状ファージであるが、本科に属するファージは一本鎖 DNA を自身の核酸として保持している。繊維状ファージでは、感染後、宿主細胞内に一本鎖 DNA を挿入した後に、一本鎖 DNA は RF DNA と称される環状二本鎖 DNA となり、遺伝子が転写・翻訳され、ファージ粒子が形成される。φOH3 感染細胞内では、感染後 50 分～80 分に RF DNA と一本鎖 DNA も検出された。この結果と一段増殖曲線とを重ねあわせて検討すると、RF DNA は感染後 50 分程度で形成され、ファージ粒子が放出されている間にも RF DNA は経時的に宿主細胞内で継続的に複製・蓄積される一方、一本鎖 DNA は RF DNA に比べ少ない濃度のまま定常的に維持されていると考えられた。また、φOH3 ゲノムは 5,688 bp で 6 個の ORF が推定されたが、これらは全て同じ転写方向であったことから、この転写方向が一本鎖 φOH3 DNA の + 鎖であると推察された。また、上記 ORF が相同性を示したのは *T. aquaticus* Y51MC23 ゲノム上の遺伝子だけであった。φOH3 は turbid plaque を形成し、*Inoviridae* 科の繊維状ファージは宿主ゲノム中に組込まれることが報告されていることから、*T. aquaticus* Y51MC23 株に φOH3 が組込まれている可能性も考えられた。ところが、同株は内陸の温泉から分離されており、海水温泉中から分離された φOH3 がどのような経路で伝播してきたかは非常に興味深い。

さらに、φOH2 と φOH3 の GC 含量はそれぞれ 44.69% と 58.03% と大きく異なり、共に *T. thermophilus* に感染するファージ間で GC 含量が大きく異なる。よって、両ファージはそれぞれ全く異なる進化を経ており、海水が加熱された熱水中では非常に多様な遺伝子が混在していることが示唆された。

5. 今後の課題

海水が加熱されて噴出している小浜温泉熱水から分離した好熱性・耐塩性ファージ φOH2 と φOH3 の特性解析を行い、これらのファージが既報の耐熱性ファージと大きく異なるゲノム構造を示した。

今後、残りの分離ファージの特性解析、ゲノム解析を行うと共に、φOH2 と φOH3 ゲノムにコードされている他の遺伝子からタンパク質を大量生産し、それらの活性や耐熱性、pH 安定性、耐塩性について解析を行い、立体構造との関連性を含めて考察する予定である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団より研究助成金を賜りました。ここに深甚な感謝の意を申し上げます。

文献等

- Ackermann H-W (2011) Bacteriophage taxonomy. *Microbiol Australia* 32: 90-94.
- Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.
- Henry M, Debarbieux L (2012) Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology* 434: 151-161.
- Lin L, Hong W, Ji X, Han J, Huang L, Wei Y (2010) Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tengchong hot springs in China. *J Basic Microbiol* 50: 452-456.
- Minakhin L, Goel M, Berdygulova Z, Ramanculov E, Florens L, Glazko G, Karamychev VN, Slesarev AI, Kozyavkin SA, Khromov I, Ackermann HW, Washburn M, Mushegian A, Severinov K (2008) Genome comparison and proteomic characterization of *Thermus thermophilus* bacteriophages P23-45 and P74-26: siphoviruses with triplex-forming sequences and the longest known tails. *J Mol Biol* 378: 468-480.
- Pederson DM, Welsh LC, Marvin DA, Sampson M, Perham RN, Yu M, Slater MR (2001) The protein capsid of filamentous bacteriophage PH75 from *Thermus*

- thermophilus*. J Mol Biol 309: 401-421.
- Sakaki Y, Oshima T (1975) Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. J Virol 15: 1449-1453.
- Tamakoshi M, Murakami A, Sugisawa M, Tsuneizumi K, Takeda S, Saheki T, Izumi T, Akiba T, Mitsuoka K, Toh H, Yamashita A, Arisaka F, Hattori M, Oshima T, Yamagishi A (2011) Genomic and proteomic characterization of the large *Myoviridae* bacteriophage ϕ TMA of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. Bacteriophage 1: 152-164.
- Tsuboi M, Benevides JM, Bondre P, Thomas GJ Jr. (2005) Structural details of the thermophilic filamentous bacteriophage PH75 determined by polarized Raman microspectroscopy. Biochemistry 44: 4861-4869.
- Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol. Rev 28: 127-181.
- Yu MX, Slater MR, Ackermann HW (2006) Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. Arch Virol 151: 663-679.

Isolation and Molecular Phylogenetic Analysis of Thermophilic Halotolerant Virus from Coastal Geothermal Area

Katsumi Doi

Faculty of Agriculture, Kyushu University

Summary

Bacteriophage (phage), viruses attacking bacteria, are considered to be the most abundant and diverse biological entities on earth, and more than hundred million phage species are estimated on earth. Phage are continuously regulating microbial ecology and activity, including carbon and nutrient fluxes, food web dynamics, and microbial diversity and diversification. The interest in the applied use of bacteriophages in a diverse range of fields. In sea hydrothermal vent communities, viruses play very important roles. However vent thermophilic phages remain largely unexplored.

Six phages were isolated from sediment of Obama hot spring, Nagasaki, Japan. ϕ OH2 and ϕ OH3 which were isolated phages formed turbid plaques on the double layer agar plates. The phages ϕ OH2 and ϕ OH3 were classified by transmission electron microscopy as a Family *Siphoviridae* and a Family *Inoviridae*, respectively. The thermostability assay showed that ϕ OH2 and ϕ OH3 were most stable at 60°C. ϕ OH2 and ϕ OH3 were most stable at pH 7.0 and pH value didn't markedly affect their survival. The phages also exhibited salt-tolerance at from 0.1 to 0.5 M NaCl.

Nucleotide sequences of the phage genomes were determined. ϕ OH2 contains a double-stranded linear DNA of 38,099 bp, which encodes 60 putative open reading frames (ORFs). The 5,688-nucleotide genome of ϕ OH3 was a circular single-stranded DNA and had a replication form. Six putative ORFs were found in the ϕ OH3 genome, and all predicted proteins showed no similarity to proteins in databases. These results indicated that there are novel phages in sea hydrothermal vent and the phages play roles on horizontal gene transfer.

For further characterization of phage ecology, cloning, expression and purification of the endolysin and holing genes of the ϕ OH2 were done. Based on homology searching result, the endolysin gene showed that it consists of an N-terminal catalytic domain (PGRP domain) and the C-terminal putative lysin motif (LysM) repeat regions. ϕ OH2 endolysin exhibited activity against *G. kaustophilus*, *T. thermophiles*, *L. johnsonii* and *E. coli* strains. Optimal conditions for ϕ OH2 endolysin reactivity were pH 7.0 and 70°C. ϕ OH2 endolysin showed high thermostability, with 40% of initial activity remaining following 20 min of treatment at 100°C. ϕ OH2 holin gene were expressed in *E. coli* with pET21 expression vector as a fusion protein. Although its activity against *E. coli* was detected after 15 min of induction with IPTG, mass production has been achieved. Therefore, the gene was inserted into pColdTF expression vector and was expressed. The purified ϕ OH2 holin also showed high thermostability.