

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14877

研究課題名(和文) 複合微生物系と極貧環境下での生育能から環境細菌の実環境での生き様に迫る

研究課題名(英文) Behavior of environmental bacteria in microbial community and oligotrophic growth state

研究代表者

永田 裕二 (Nagata, Yuji)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30237531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：難分解性有機塩素系殺虫剤分解細菌とその分離源となった細菌コミュニティをモデルとし、複合微生物系と極貧環境下での生育能に着目した研究を実施し、非分解細菌の分解コミュニティにおける重要性を示す結果、ならびにある種のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を高発現させることでCO₂の固定を伴い有機炭素源非添加の無機固体培地上で生育可能となる現象が環境細菌が広く有する普遍性の高いものであることを示す結果を得た。さらに、これら現象の機構解明に繋がる多くの知見を得、環境細菌の実環境での環境浄化への応用のための理論的基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：We studied on behavior of environmental bacteria in microbial community and oligotrophic growth state by using a bacteria degrading recalcitrant organochlorine insecticide and a microbial community from which the bacterial strain was isolated as models. We showed (i) the importance of non-degrading bacterial strains in the community and (ii) the generality of the phenomenon that environmental bacteria can grow on the solid minimal salt medium without addition of any carbon source accompanying CO₂ fixation by expression of the alcohol dehydrogenase gene, and obtained a lot of knowledge leading to the elucidation of the mechanisms of these phenomena. A theoretical foundation for the practical application of bacteria in real environments has been established.

研究分野：応用微生物学

キーワード：oligotroph 複合生物系 炭酸固定

1. 研究開始当初の背景

好氣的条件下での環境汚染物質分解浄化を目標として、様々な環境汚染物質を唯一の炭素源・エネルギー源として好氣的条件下で生育可能な多くの細菌株が純粋分離され、当該分解代謝経路・分解酵素・分解関与遺伝子群に関して詳細な解析がなされてきた。しかし、これら分解能を有する単離細菌株を当該物質汚染環境に接種しても、接種菌が当該環境に定着せず、定着した場合でも十分な分解能力を発現しないため、期待される効果が得られない問題が判明している。申請者らは、典型的な土壤常在細菌 *Burkholderia multivorans* 株の実環境を擬した土壤マイクロコズムでの「生き様」を理解する研究を実施し、本株の様々な物質代謝に関与する遺伝子群などが土壤環境特異的に誘導されること、土壤環境での生残に鉄ホメオスタシスを司る global regulator である Fur が重要であることなどを遺伝学的手法を用いて明らかにした。さらに、実環境では分解細菌株が非分解細菌株を含むコミュニティ状態で汚染物質の分解代謝を行っていることや、従属栄養細菌株が極貧環境下で CO₂ の固定を伴って生育することが環境細菌の実環境での「生き様」の理解に重要である知見を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、難分解性有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) 分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS 株とその分離源となった γ -HCH 分解細菌コミュニティ EB2 をモデルとし、複合微生物系と極貧環境下での生育能の2点に着目した研究を実施する。具体的には、(1) TKS 株は γ -HCH 添加無機固体培地上で他細菌株と共存するコミュニティ状態の場合に、単独の場合より長期間分解能を維持する巨大コロニーを形成する、(2) TKS 株で類縁細菌株 *Sphingobium japonicum* UT26 株由来アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*adhX*) を高発現させることで CO₂ の固定を伴い有機炭素源非添加の無機固体培地上で生育可能となる、という2つの興味深い現象の機構を解明し、本株の実環境での「生き様」に関する理解を深め、実環境での環境浄化への応用のための理論的基盤を構築することを目的とする

3. 研究の方法

(1) 複合生物系に関する研究

TKS 株は、HCH 汚染環境試料を元に γ -HCH を唯一の炭素源とした無機液体培地による集積培養で得られた細菌コミュニティ EB2 から単離された。EB2 は固体培地上で TKS 株単独の場合よりも長期間に渡って持続的に γ -HCH 分解能を発揮する巨大なコロニーを形成する。メタゲノム解析により、EB2 は

分解菌 TKS 株と複数種の非分解菌によって構成されていることが明らかとなっている。さらに、EB2 から分解細菌 TKS 株に加え、*Pseudomonas* sp. TKP 株、*Cupriavidus* sp. TKC 株などが単離されている。本研究では、EB2 の安定性と特性、ならびに単離株の性質、および関係性について検討した。

(2) 極貧環境下での生育に関する研究

TKS 株は UT26 株由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* を高発現させることで有機炭素源非添加の無機培地でコロニー形成可能になる。TKS 株自身も *adhX* ホモログを有しているが、本株は UT26 株に比べて遺伝的に不安定であり、遺伝学的解析が困難であるため、本研究では、主に UT26 株を用いて、*adhX* 関与の oligotrophic growth (以下、OG 表現型) に関する研究を実施した。

以上の研究から得られる知見を総合し、環境細菌の実環境での「生き様」に関する理解を深め、環境汚染物質分解細菌を実環境で効果的に利用するための具体的方法を提示する。

4. 研究成果

(1) 複合生物系に関する研究

・EB2 を γ -HCH 含有無機液体培地で5回の植継ぎを行ったところ、 γ -HCH 分解効率は上昇したが、分解菌と思われる *Sphingobium* 属の割合が著しく増加することはなく、むしろ非分解細菌と思われる細菌属の割合の方が多くなった。すなわち、非分解細菌が存在することの γ -HCH 分解コミュニティとしての優位性が確認された。

・16S rRNA 遺伝子配列による菌層解析からコミュニティ内での存在割合が高いと考えられる分解菌 TKS 株、非分解菌の TKC 株と TKP 株の土壤での生残性を調べた結果、TKC 株は接種後1週間以内にコロニー形成能を持つ細胞数が増加したが、TKS 株と TKP 株は徐々に減少し、土壤に定着できなかった。しかし、TKS 株は TKC 株と混合して滅菌土壤に接種された場合に増殖でき、土壤環境への定着において他者を必要とする場合があることが明らかとなった。

・TKC 株は、一部の低栄養性培地にて、TKS 株と混合して固体培地に接種すると、TKS 株コロニーに向かって細胞増殖をするという興味深い現象を見出した。この結果は、TKC 株が積極的に TKS 株とコミュニティを形成する可能性を示している。さらに、本表現型を示さない TKC 株の突然変異株を取得した。今後、これら株の変異部位を同定することで、本現象の機構解明に繋がる知見が得られると期待される。

・TKC 株のコロニーが TKS 株のコロニーと接すると、TKS 株も生育領域を拡大する現象が観察された。すなわち、TKC 株の存在は、TKS 株にとってもメリットがあると考えら

れる。

(2) 極貧環境下での生育に関する研究

・UT26 株の *adhX* を高発現させると、UT26 株のみならず TKS 株や系統的に離れた細菌株でも OG 表現型が観察されることを確認した。すなわち、OG 表現型は環境細菌に広く観察される普遍性の高い現象であることが示唆された。

・*adhX* と近接して存在するアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊しても OG 表現型は失われなかった。すなわち、本現象に特定のアルコール基質がアルデヒドを経て代謝される過程が関与している可能性は低いと考えられる。

・UT26 株由来のミューテーター株を利用して、*adhX* の高発現が「起こりやすい」突然変異であることを明示した。さらに、これら突然変異株の *adhX* 上流の推定プロモーター領域には変異が見出されず、かつ当該領域のプロモーター活性が突然変異株で野生株に比べて著しく上昇したことから、*adhX* の高発現は、発現抑制因子の脱抑制変異によるものである可能性が強く示唆された。今後、これら突然変異株のリシーケンシングを行うことで、発現抑制因子が同定できると期待される。

・本現象に関与する遺伝因子を次世代型シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に明らかにするシステムを構築した。

(3) 総括

複合生物系の研究においては、非分解細菌がコミュニティに存在することの優位性を明示すると共に、非分解菌が分解菌に向かってコロニー伸長するという大変興味深い現象を見つけた。また、本現象の機構解明の手掛かりとなる突然変異株の取得にも成功した。一方、極貧環境下での生育に関する研究では、我々が見出した OG 表現型という興味深い現象が、普遍性が高く、環境細菌が広く有する低栄養環境適応機構である可能性を示す結果を得た。残念ながら研究期間内に本機構の全貌解明には至らなかったが、そのための系の構築には成功し、また、機構解明の手掛かりとなる多くの知見を得た。

以上、本研究で得られた成果は、今後、国際学術誌等で発表する予定である。本研究の最終目的である実環境での環境浄化への応用のための理論的基盤の構築という面では、汚染環境への (i) 分解細菌の非分解細菌との共接種、(ii) OG 表現型を示す分解細菌の接種、という理論に基づいた具体的方法論の提示に繋がる知見を得ることができ、当初の目的はほぼ達成できたと考えている。

また、本研究で扱った環境細菌を対象とし

た関連研究の成果も多く得られた。このように、今回の科学研究費の受領が研究代表者らの行っている環境細菌に関する一連の研究をさらに進展させる上で多大な援助になったことはいうまでもなく、ここに心から感謝の意を表したい。また、本研究に携わった大学院学生および研究協力者の諸氏にもこの機会にあわせて謝意を表したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件 全て査読有り)

1. **Ohtsubo Y, Sasaki H, Nagata Y, Tsuda M.** Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA Research* (2018)
accepted for publication
2. **Kishida K, Ogawa N, Ichihashi E, Kato H, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Establishment of plasmid vector and allelic exchange mutagenesis systems in a mycobacterial strain that is able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biosci Biotechnol Biochem* **82**: in press (2018)
DOI: 10.1080/09168451.2018.1445522.
3. **Sato T, Nonoyama S, Kimura A, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M.** The small protein HemP is a transcriptional activator for the hemin uptake operon in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e00479-17 (2017)
DOI: 10.1128/aem.00479-17
4. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** Compounds that enhance the tailing activity of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 6520 (2017)
DOI: 10.1038/s41598-017-04765-8
5. **Sugawara M, Tsukui T, Kaneko T, Ohtsubo Y, Sato S, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Minamisawa K.** Complete genome sequence of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122, a nitrogen-fixing soybean symbiont. *Genome A.* **5**:e01743-16 (2017)
DOI: 10.1128/genomeA.01743-16
6. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 41769 (2017)
DOI: 10.1038/srep41769
7. **Kishida K, Inoue K, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** Conjugative transfer system of IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7: characterization of its *oriT* region and relaxase and host range of conjugative system. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e02359-16 (2017)
DOI: 10.1128/AEM.02359-16

8. **Tabata M, Ohhata S, Nikawadori Y, Kishida K, Sato T, Kawasumi T, Kato H, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y.** Comparison of the complete genome sequences of four γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res.* **23**: 581-599 (2016)
DOI: 10.1093/dnares/dsw041
9. **Nanasato Y, Namiki S, Ohsima M, Moriuchi R, Konagaya K, Seike N, Otani T, Nagata Y, Tsuda M, Tabei Y.** Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by transgenic hairy root cultures of *Cucurbita moschata* that accumulate recombinant bacterial LinA. *Plant Cell Reports* **35**: 1963-1974 (2016)
DOI: 10.1007/s00299-016-2011-1

〔学会発表〕(計 54 件)

(招待講演、シンポジウム、国際学会、および本研究に直接関係する主な発表 15 件のみを記載)

1. 稲葉慎之介、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝「環境常在細菌に見出された新規低栄養環境適応機構」環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会 2016 年 6 月 13-14 日(広島県、広島市)
2. **Y. Nagata, R. Moriuchi, A. Koyama, Y. Ohtsubo, L. Chrast, J. Damborsky, and M. Tsuda.** Construction of in vivo evolution system for haloalkane dehalogenases. 2nd ASM Conference on Experimental Microbial Evolution, August 4-7, 2016, Washington DC, USA.
3. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane 分解コミュニティのメタゲノム解析」第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 2017 年 3 月 2-4 日(神奈川県、藤沢市)
4. 稲葉慎之介、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「環境常在細菌に見出された新規低栄養環境適応機構に関する研究」日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17-20 日(京都府京都市)
5. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「難分解性有機塩素系殺虫剤の分解細菌コミュニティにおける非分解菌の役割」日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17-20 日(京都府京都市)
6. 永田裕二「環境汚染物質を食べる細菌から微生物進化を探る～細菌の進化機構の解明と微生物機能開発への応用～」(招待講演)日本農芸化学会東北支部シンポジウム「多様な広がりで見せる微生物研究」2017 年 6 月 24 日(青森県弘前市)
7. **S. Inaba, H. Kato, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and Y. Nagata.** Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces the oligotrophic growth with carbon dioxide fixation. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS2017), July 6-13, 2017, Valencia, Spain.
8. 加藤広海、小川なつみ、大坪嘉行、永田裕

二、津田雅孝「利用する：汚染物質分解コンソーシアムにおける非分解菌の役割」(招待講演)第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 2017 年 8 月 29-31 日(宮城県、仙台市)

9. 稲葉慎之介、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「極貧栄養環境での生育能を獲得した好気性従属栄養細菌突然変異株の解析」第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 2017 年 8 月 29-31 日(宮城県、仙台市)
10. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「難分解性有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティに関する研究」第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 2017 年 8 月 29-31 日(宮城県、仙台市)
11. 加藤広海、永田裕二、津田雅孝「土壌細菌叢メタゲノムの時間的変動と細菌間相互作用」(招待講演)第 61 回日本放線菌学会学術講演会 2017 年 11 月 16 日(東京都品川区)
12. 稲葉慎之介、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「好気性従属栄養細菌における極貧栄養環境適応変異株の解析」第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 2018 年 3 月 5-7 日(京都府、京都市)
13. 永田裕二「高度難分解性環境汚染物質分解細菌から微生物進化を探る」(招待講演)日本農芸化学会シンポジウム「微生物の多様性-IFO 寄付講座 10 年の歩み」日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 15-18 日(愛知県名古屋市)
14. 稲葉慎之介、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「好気性従属栄養細菌株由来の極貧栄養環境での生育能を獲得した突然変異株の解析」日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 15-18 日(愛知県名古屋市)
15. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「環境汚染物質の分解細菌コミュニティにおける非分解菌コロニーの分解菌コロニーへの接近現象」日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 15-18 日(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

1. **Nagata Y, Tabata M, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Biodegradation of Organochlorine Pesticides, Chapter 5.1.2 p. 1-30. In Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (ed), *Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition.* ASM Press, Washington, DC. (2016)
DOI: 10.1128/9781555818821.ch5.1.2

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：二本鎖 DNA 末端の加工方法
発明者：大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝
権利者：国立大学法人東北大学
種類：PCT 国際
番号：特願 2016-212620 (国内)、PCT/JP2017/21913
出願年月日：2016 年 10 月 31 日

国内外の別： 国内および国際

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

永田 裕二 (NAGATA YUJI)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：30237531

(2)研究分担者

津田 雅孝 (TSUDA MASATAKA)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：90172022

大坪 嘉行 (OHTSUBO YOSHIYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：40342761

(4)研究協力者

加藤 広海 (KATO HIROMI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：90727265