

平成22年 5月18日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17018003

研究課題名（和文）環境修復・環境生態に関する先導的ゲノム研究

研究課題名（英文）Innovative genomics and metagenomics of environmental bacteria able to degrade organic pollutants

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

様々な汚染物質も含む各種難分解性化合物分解能を有する土壌環境細菌が本来の土壌生態系で示す生きざまの解明をめざし、全ゲノム配列を解読した細菌において、当該環境での生存に極めて重要な遺伝子と本環境で特異的に発現する多数の遺伝子座を同定した。また、環境修復細菌群と土壌環境との相互作用の解明をめざし、汚染物質添加土壌における菌叢や汚染物質分解酵素遺伝子を含む遺伝子プールの経時的変動様式をメタゲノム的手法も用いて提示した。

研究成果の概要（英文）：

Environmental bacteria able to degrade various recalcitrant and xenobiotic compounds play important roles in the removal of organic pollutants. To know the survival and proliferation strategies of such bacteria in their native niche, the genetic loci very important in the survival and specifically induced in the soil environment were identified at the genomic levels using two phylogenetically distant strains. Metagenomic analysis was also conducted to clarify the mode how the bacterial population in the soil responded to the exposure of organic pollutants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	25,000,000	0	25,000,000
2006年度	22,100,000	0	22,100,000
2007年度	22,100,000	0	22,100,000
2008年度	20,000,000	0	20,000,000
2009年度	20,000,000	0	20,000,000
総計	109,200,000	0	109,200,000

研究分野：ゲノム微生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：細菌、土壌、環境汚染、環境修復、ゲノム、メタゲノム、発現制御、細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

各種有機化合物の分解能が強い環境細菌は、生態系での円滑な物質循環に必須の構成員であり、難分解性化合物で汚染された環境の修復にも大きな役割を果たしているが、多様な自然環境での当該生物機能の発現様式は実験室環境とは異なる。一方、環境汚染物質の微

生物分解に関する従来の研究は、培養可能でかつ、汚染物質を完全分解して炭素・エネルギー源として使用可能な細菌株の研究に限定されていたが、自然環境で99%以上を占める培養困難細菌群が汚染物質分解に果たす役割やこれら細菌群が有する分解酵素遺伝子群は未知であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、環境汚染物質も含む多様な化合物分解能や地球規模での炭素循環に関与する環境細菌を対象にして、実験室系と生態系でのゲノム情報発現の相違を規定する要因の提示、そして、汚染環境とゲノムの相互作用の解明、を目的とした。具体的な研究の第1として、グラム陰性で多様な有機化合物分解能を持つ*Burkholderia multivorans*とグラム陽性でPCBや様々な環境汚染芳香族化合物分解能を持つ*Rhodococcus jostii*という互いに進化系統的関係が低い菌株を用い、(1)実験室系でのゲノム情報発現とその制御ネットワークの解明、(2)土壤生態系でゲノム情報発現を解析するための複数技術の構築と、これらを用いた土壤生態系でのゲノム情報発現を解明する。また、第2に、汚染物質添加という環境要因付加時の土壤において、汚染物質分解酵素遺伝子を含む遺伝子プールの経時的変動をメタゲノムの観点から解析し、環境修復菌群と土壤環境との相互作用を解明する。

## 3. 研究の方法

研究開始時点で全ゲノム配列決定が完了していなかった*B. multivorans*と*R. jostii*について、決定作業を終了させる。複数レプリコンからゲノムが構成される両株ゲノムのアノテーションを行ない、各レプリコンの構成原理と特色を他細菌株ゲノムと比較することで提示する。また、ゲノム情報から芳香族化合物などの各種炭素源分解資化能を予想し、各菌株での実際の炭素源代謝能を検討する。

実験室系でのゲノム情報発現とその制御ネットワークの解明では、各種炭素源や鉄濃度の変化に伴うゲノム情報発現変動を、レポーター遺伝子を用いた遺伝学手法やマイクロアレイ、RT-PCRを用いた解析する。炭素源に関しては、特にカタボライト抑制現象に焦点を当てる。また、環境要因変動の情報伝達に関わる統括的発現制御因子の機能的多面性と発現制御の分子機構を同様の手法で解析する。

土壤生態系でゲノム情報発現解析のために、土壤に接種した細菌株からトランスクリプトーム解析レベルでゲノム構成全遺伝子転写量測定に適した全RNA抽出技術を構築し、本RNAと実験室系培養菌から調製したRNAを用いたトランスクリプトーム解析で、土壤特異的発現遺伝子の同定とその機能解析を行う。また、土壤で特異的に発現する遺伝子群と土壤での生存に必須・重要な遺伝子群のカタログ化に各々適したIVET (In Vivo Expression Technology) と STM (Signature-Tagged Mutagenesis)の構築し、各該当遺伝子の同定と機能を明らかにする。これら解析を通じて、土壤系と実験室系でのゲノム情報発現の相違を規定する因子を提示する。

環境修復菌群と土壤環境との相互作用解明においては、(1)汚染物質がすでに存在している自然環境由来のメタゲノムから、当該物質分解活性を担う酵素遺伝子を宿主細菌の培養を割愛した遺伝学的手法により直接取得・解

析し、既知の分解酵素遺伝子との構造的並びに機能的相違を明らかにする。また、(2)閉鎖系の人工的汚染化土壤を作製し、汚染物質残存量や、メタゲノムDNA塩基配列の第2世代シーケンサーでの大規模解読による菌叢変動と分解酵素遺伝子群を含む各種遺伝子の変動を、経時的に検討する。一方、本土系から実際に分解能を備えた酵素遺伝子や菌株を単離・解析し、メタゲノムDNA由来遺伝子との対応付けを行う。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム構造と炭素源資化能の解析

1本の線状染色体と3本の大型線状プラスミドを持って9.7 Mbの*R. jostii*ゲノムには、多様な炭素源利用能に関与すると推定される各種オキシゲナーゼ遺伝子が約120存在し、高い重複性を示す芳香族化合物分解遺伝子群は4種レプリコンに分散していた。一方、3本の環状染色体を持って7.0 Mbの*B. multivorans*ゲノムでは多重染色体性構造を持つ他細菌群とは異なり、*rpoD*や*dnaG*、*polA*、各種生合成系酵素遺伝子を始めとする基本的生命活動に関わる相当数の遺伝子群がプラスミド型複製・維持装置を有して「副染色体」的性質をもつ2.5 Mbの第2染色体にのみ存在するという特徴を示した。また本菌では、安息香酸やアントラニル酸、ホモゲンチジン酸を始めとする多種の芳香族化合物の分解能を支配する遺伝子群が第2染色体に局在することが多い特色も見出した。さらに、検討した95種の糖や有機酸などのうちの75化合物に対する酸化能を本株は示した。

### (2) 実験室系でのゲノム情報発現

① *R. jostii*のPCB分解能に関わるビフェニル分解酵素(*bph*)遺伝子群の誘導発現は、二成分制御系BphST支配下にあり、ビフェニルを含む多様な芳香族化合物に応答したBphSTが5つの*bph*プロモーターを直接転写活性化することを証明した。一方、グルコースやフラクトース存在下での*bph*遺伝子群転写抑制というカタボライト抑制現象を見出し、本抑制現象には*bphST*の転写抑制に起因することを示した。両糖によるカタボライト抑制にはトランスポーターやPTS系関連タンパク質が関わっていた。また、ビフェニル存在下で200以上の遺伝子の転写が誘導され、その半数がビフェニルや他芳香族化合物の分解に直接関与しない機能未知遺伝子であった。

② *B. multivorans*を宿主とした外来性芳香族化合物分解酵素遺伝子群の研究過程で、グルコースによる2つの異なるカタボライト抑制現象を見出した。抑制系の第1はクロロカテコール分解遺伝子群導入株で、基質となる3-クロロ安息香酸(3CB)の消費がグルコース存在下では抑制される現象であった。第2のカタボライト抑制は、別のグラム陰性細菌株由来*bph*遺伝子群を導入した株で、グルコースやガラクトース存在下での*bph*遺伝子群の転写抑制であったが、この抑制には、*B. multivorans*染色体支配の二成分制御系BphPQが関与し、菌の生存・増殖に必須と強く示唆されたBphQは様々な糖や有機酸、アミノ酸

の分解・酸化に必要な制御因子であった。**BphQ**を介したカタボライト抑制には、やはり**PTS**が関与すると強く示唆された。さらに、本菌の広範な化合物分解能は鉄レギュロン統括的転写制御因子**Fur**の機能発揮が必要である場合が多いことも判明した。本菌**Fur**は、(a)細胞がグルコースやガラクトースを始めとする数多くの糖源や**TCA**回路を構成する多数化合物、安息香酸を炭素源として効率的に使用するために必須で、(b)活性窒素種**NO**の除去にも重要な役割を果たし、また、(c)過酸化水素ストレスレギュロン転写制御因子**OxyR**と遺伝的相互作用を有する、という特色を見出した。

### (3) 生態系でゲノム情報発現

① 滅菌土壌に接種した**B. multivorans**や**R. jostii**から、マイクロアレイ解析に使用可能な高純度RNAを大量に抽出する方法を独自に確立した。続いて、土壌に接種した**R. jostii**から抽出したRNAを用いてアレイ解析を実施することで、土壌で特異的に転写上昇する遺伝子群を165個に絞り込んだが、これらの遺伝子構成として、代謝関連遺伝子が44%、複製・修復・転写・翻訳関連遺伝子が7%、機能未知遺伝子が47%を占めた。土壌環境特異的に発現上昇する当該遺伝子群のうち、亜硝酸代謝遺伝子群の亜硝酸還元酵素遺伝子が土壌での窒素源獲得に関与すると示唆された。

② 土壌で特異的に発現する**B. multivorans**遺伝子群を取得するために、プロモーターを欠く**lacZ**遺伝子をレポーターとする**IVET**系を構築し、滅菌土壌で特異的に発現する遺伝子群の大規模スクリーニングを行った。本菌ゲノム上のランダムな部位に当該**lacZ**遺伝子を組み込んだ誘導体株を58,000程取得し、滅菌土壌接種・70日後の寒天培地回収操作などを行い、転写が土壌特異的に起きる遺伝子座を116同定した。これら遺伝子座の約半数は第2染色体上に位置付けられ、土壌特異的発現遺伝子数が相対的に多い本染色体は、土壌環境での生存や増殖、適応に重要であることが判明した。同定した116の遺伝子座のうち、炭素源・エネルギー源の取り込みや代謝関連遺伝子座が42%、細胞表層構成関連遺伝子座が9%を占めた。炭素源・エネルギー源代謝関連遺伝子座は、様々なアミノ酸や脂肪酸、有機酸を炭素源として代謝するための機能を担っていたが、この中には、リグニンモノマーであるアントラニル酸をはじめとする各種芳香族化合物の分解に関与する遺伝子座が多い特色が認められた。このような知見は、**B. multivorans**が土壌において植物遺体由来化合物を炭素源としていたことを強く示唆する。また、マロン酸分解に関わる遺伝子座の転写が、やはり植物遺体由来で、腐植土を多様な環境に広範に存在するフミン酸で誘導される新規の知見も実験室系の研究から判明した。一方、細胞表層構成関連遺伝子座には、**LPS**や菌体外多糖、そして、細胞表層タンパク質の合成などに関わる遺伝子が複数存在しており、これら遺伝子群転写量増大により産生される細胞表層構成物質は、菌体の土壌粒子表面への安定的付着に寄与していると示唆され

た。また、本研究で基本的に用いてきた花崗岩質土壌で特異的に発現した30程の遺伝子について、土壌学的に異なる水田低地土壌での発現、花崗岩質土壌の水抽出液並びに酢酸エチル抽出液での発現を検討した。いずれの遺伝子も基本的には水田低地土壌でも発現することを確認したが、2種抽出液を用いた解析で、片方抽出液でのみ発現する遺伝子、両方で発現する遺伝子、両方でも発現しない遺伝子のグループに分類できた。6割を占めた最後のグループの遺伝子の転写には、両溶媒でも抽出されなかった化学物質が土壌物理的要因の関与が示唆された。

③ 土壌での生存に必須な**B. multivorans**遺伝子群を取得するために必要な36種類のトランスポゾン構築し、各トランスポゾンの挿入変異株を192株ずつ、計6,912株単離した。挿入したトランスポゾンが互いに異なる36株を1つのバッチにプールした計192バッチを滅菌並びに非滅菌土壌に接種した土壌から回収した全DNAを鋳型とし、36種トランスポゾンを各々特異的に増幅可能なプライマー対を用いたリアルタイムPCRで、増幅が検出できないトランスポゾン挿入変異株のスクリーニングを実施することで、非滅菌土壌において、生存に必須と想定された5遺伝子のトランスポゾン挿入突然変異体候補を取得した。このうち、上述の**fur**や**RNA helicase**をコードしてmRNAプロセシングに関与する機能を担う**hrpA**の変異株は非滅菌土壌での生存性が著しく低下していた。毒性がたいへん高い活性酸素・窒素種の除去系酵素遺伝子群の転写促進に**Fur**は必須であり、非滅菌土壌に共存する他生物が産生する活性酸素・窒素種により、**fur**変異株の生存性が著しく損なわれたと示唆された。一方、このようなストレスの多い非滅菌土壌環境では、新生されるRNAの高次構造の維持機能が極めて重要であるとも推定された。

### (4) 環境修復菌群-環境相互作用に関わるメタゲノムの解析

① 各種芳香族汚染物質が多量含まれる工業廃水処理活性汚泥環境に存在する分解遺伝子の存在様態を検討した。本環境から抽出したメタゲノムで、計3.4 Gbの当該DNAフォスミドライブラリーを大腸菌宿主下で構築した。各種芳香族化合物の好氣的分解経路の共通化合物であるカテコールを黄色産物に変換可能なカテコール2,3-ジオキシゲナーゼ(EDO)活性をスクリーニングし、38フォスミドクロン上で活性のあるEDO遺伝子を同定した。これらフォスミドクロンのEDO遺伝子の周辺構造の解析の結果、芳香族化合物の完全分解に必要な全酵素遺伝子群がクラスターを形成している例は希で、毒性の高いフェノールやカテコールの分解に必要な遺伝子セットの一部のみがクラスター化している場合が多かった。従って、工業廃水処理活性汚泥環境に存在する分解遺伝子群は、毒性の高い化合物から細胞を守る機能も果たしていると示唆された。さらに、複数フォスミドクロン上のメタゲノムDNA断片から37 kbの環状プラスミドを*in silico*で構築でき、芳香族初発水酸化

酵素及び EDO の遺伝子群クラスターとともに、プラスミドの複製・維持に関する遺伝子が存在していた。以上のように活性スクリーニングと陽性クローン約 1.5 Mb の構造並びに機能解析により、自然環境での分解酵素遺伝子の存在様態やマイクロ進化を提示できた。

② 3CB とフェナントレン、ビフェニル、カルバゾールで同時汚染化した土壤では、3CB は汚染後 1 週間で消失したが、他 3 種化合物は 4 週目から減少を始め、10 週目でほとんど検出できなくなった。一方、当該土壤から回収した DNA を鋳型とし、16S rRNA 遺伝子の PCR-DGGE 解析や塩基配列決定による解析から、汚染土壤での細菌叢は、汚染前と比べて、1 週目で既に変動が見られた後に 6 週目で著しく変動しており、12 週目では汚染前に戻っていく傾向が認められた。さらに、3CB に関わる *Burkholderia* 型 *benA* 遺伝子が 1 週目に、多環芳香族化合物初発分解に関わる *Mycobacterium* 型 *podA* 遺伝子が 6 週目に検出可能になるとともに、7 週目の汚染土壤からフェナントレン分解能を備えた *Mycobacterium* 属と *Paenibacillus* 属の細菌株が取得できた。以上のような経時的変動様式を踏まえ、汚染直前土壤、3、6、12 週目の汚染並びに非汚染土壤から調製した合計 7 つのメタゲノム試料について、Illumina GAIIx により大規模塩基配列決定作業を実施し、リード長 60 塩基のもの(各試料で約 1000 万リード)について、解析を行った。汚染土壤 DNA のコンテイング形成率は非汚染土壤のそれに比べ有意に高く、汚染土壤での遺伝子プールの多様性低下が判明した。一方、全リードから 16S rRNA 遺伝子を検索して属レベルでの菌叢変動を検討したところ、汚染土壤では、3 週目の時点で *Burkholderia* 属細菌の比率が大幅に上昇し、その後の 6、12 週目と時間が経過するにつれて、その比率は減少していく傾向が認められた。また、各土壤での 16S rRNA 遺伝子解析による菌叢構成属の分布様式は、KEGG への全リードの BLAST 検索で得たトップヒット遺伝子推定由来細菌属の分布構成と正の相関性を示した。さらに、後者検索でのトップヒット遺伝子推定由来細菌属は汚染後 3 週目の時点で大きく変動しており、12 週目には汚染前状態に戻っていく傾向がやはり認められた。一方、トップヒット遺伝子に関して更なる解析を行うと、汚染後の時間経過に伴い、その相対的量が一定の遺伝子群のほかに、減少する遺伝子群とともに逆に上昇する遺伝子群が多く認められた。トップヒット遺伝子とその相対的数量を KEGG Pathways の様々な代謝経路の酵素遺伝子群にマッピングしたところ、汚染に用いたビフェニルの分解経路酵素遺伝子群については、プロテオバクテリア由来の *bph* 遺伝子群の相対的量が汚染土壤で上昇していた。このようにメタゲノム配列を KEGG などのデータベースで検索することで、汚染後の細菌叢変動と分解酵素遺伝子を含む遺伝子プール変動の様式を提示可能であった。これとは別に、フェナントレン好気分解経路の酵素遺伝子群をメタゲノム DNA から相同性検索で見つけ出し、汚染後の時間経過に伴って

量的増加のある当該遺伝子群に注目したところ、本化合物分解で初発水酸化に関わる遺伝子は *Mycobacterium* 型であり、分解の下流酵素遺伝子はプロテオバクテリア型であった。このことから、本化合物の土壤での完全分解には異門に属する 2 つ以上の細菌株による協調的代謝が関与する可能性が高いことを見出した。なお、汚染物質は分解酵素遺伝子以外の遺伝子群のプール変動をも引き起こすという多面性を新たに提示できた。

上記の塩基配列レベルに基づく汚染土壤のメタゲノム解析とともに、当該メタゲノムからの機能性分解酵素遺伝子の取得も同時並行的に実施した。まず、メタゲノム塩基配列から見出した *Mycobacterium* 型フェナントレン初発水酸化酵素遺伝子のコンテイング配列を用いたサザン法により、汚染後 6 週目のメタゲノムコスミドライブラリーから、本遺伝子を含むクローンを取得した。本コスミド上のメタゲノム DNA の構造とその機能を解析し、本 DNA 支配の酵素活性の検討と、取得済みのフェナントレン分解 *Mycobacterium* 属細菌の当該分解酵素遺伝子との対応付けを実施した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 件) すべて査読有り

- ① Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M.: Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by *in vivo* expression technology. Environ. Microbiol. (in press)(2010)
- ② Lang, G., Ogawa, N.: Mutational analysis of the inducer recognition sites of the LysR-type transcriptional regulator TfdT of *Burkholderia* sp. NK8. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 1085-1094 (2009)
- ③ Uchiyama, T., Miyazaki, K.: Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. Curr. Opin. Biotechnol. 20: 616-622 (2009)
- ④ Suenaga, H., 6 人, Tsuda, M., Miyazaki, K.: Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis, ISME J. 3: 1335-1348 (2009)
- ⑤ Suenaga, H., Mizuta, S., Miyazaki, K.: The molecular basis for adaptive evolution in novel extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome, FEMS Microbiol. Ecol. 69: 472-480 (2009)
- ⑥ Wang, Y., Morimoto, S., Ogawa, N., Oomori, T., Fujii, T.: An improved method to extract RNA from soil with efficient removal of humic acids. J. Appl. Microbiol. 107: 1168-1177 (2009)
- ⑦ Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M.: Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. J. Bacteriol. 190: 6281-6289 (2008)
- ⑧ Ohtsubo, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Nagata, Y., Tsuda, M.: GenomeMatcher: a graphical user

interface for DNA sequence comparison. BMC Bioinformatics 9: 376 (2008)

- ⑨ Roberts, A.P., 9人, Tsuda, M., Berg, D.E.: Revised nomenclature for transposable genetic elements. Plasmid 60: 167-173 (2008)
- ⑩ Shimoda, Y., 2人, Minamisawa, K., 3人, Tsuda, M., 5人, Tabata, S., Sato, S.: Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics. DNA Res. 15: 297-308 (2008)
- ⑪ Yuhara, S., 4人, Tsuda, M.: Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. Microbiology 154: 1763-1774 (2008)
- ⑫ Wang, Y., 4人, T., Ogawa, N., Fukuda, M., Fujii, T.: Detection of *bphAa* gene expression of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 in soil using a new method for RNA preparation from soil. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 694-701 (2008)
- ⑬ Patrauchan, M.A., 4人, Fukuda, M., 2人, Eltis, L.D.: Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. J. Bacteriol. 190: 37-47 (2008)
- ⑭ Ono, A., 4人, Tsuda, M.: Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. App. Microbiol. Biotechnol. 74: 501-510 (2007)
- ⑮ Iwasaki, T., 4人, Fukuda, M.: Characterization of two biphenyl dioxygenases for biphenyl/PCB degradation in a PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 993-1002 (2007)
- ⑯ Ito, N., 10人, Tsuda, M., Mitsui, M., Minamisawa, K.: Global gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* cultured with vanillin, vanillate, 4-hydroxybenzoate, and protocatechuate. Microbes Environ. 21: 240-250 (2006)
- ⑰ Iwasaki, T, Miyauchi, K, Masai, E, Fukuda, M.: Multiple-subunit genes of the aromatic-ring hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5396-5402 (2006)
- ⑱ McLeod, M.P., 24人, Fukuda, M., 2人, Eltis, L.D.: The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 15582-15587 (2006)
- ⑲ Ohtsubo, Y., Goto, H., Nagata, Y., Kudo, T., Tsuda, M.: Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading  $\beta$ -proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. Mol. Microbiol. 60: 1563-1575 (2006)
- ⑳ Sota, M., 6人, Tsuda, M.: Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene

spread by a tyrosine recombinase. J. Bacteriol. 188: 4057-4067 (2006)

- Nagata, Y., 5人, Tsuda, M.: Organization and localization of the *dnaA* and *dnaK* gene regions on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. J. Biosci. Bioeng. 99: 603-610 (2005)
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y., Tsuda, M.: High-temperature-induced transposition of IS elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1822-1828 (2005)
- Lang, G., Ogawa, N., Tanaka, Y, Fujii, T., Fulthope, R.R., Fukuda, M., Miyashita, K.: Two kinds of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from 2,4-dichlorophenoxyacetate-degrading *Sphingomonas* sp. strain TFD44. Biochem. Biophys. Res. Comm. 332: 941-948 (2005)
- Morimoto, S., Togami, K., Ogawa, N., Hasebe, A., Fujii, T.: Analysis of a bacterial community in 3-chlorobenzoate-contaminated soil by PCR-DGGE targeting 16S rDNA and the benzoate 1,2-dioxygenase gene (*benA*). Microbes Environ. 20: 151-159 (2005)

[学会発表] (計 17 件) 招待講演のみ記載

- ① 津田雅孝: 環境汚染土壌における微生物集団のメタゲノム解析. 第57回日本生態学会, 2010年3月15日, 東京
- ② 宮崎健太郎: メタゲノム機能解析とその応用研究. 糸状菌分子生物学研究会, 2009年11月19日, 東京
- ③ M. Tsuda, E. Nishiyama, Y. Nagata, Y. Ohtsubo: Bacterial genes specifically induced in soil environment. NIAES International Symposium: "Challenges for Agro-Environmental Research in Monsoon Asia", Oct. 5, 2009, Tsukuba
- ④ Y. Nagata, Y. Ohtsubo, M. Tsuda: Molecular genetic approaches for elucidating adaptive strategies of bacteria in soil. ISSM satellite symposium "Environmental genomics". Nov. 15, 2008, Tokyo
- ⑤ 小川直人, 福田雅夫: 土壌からのRNA抽出と細菌の遺伝子発現解析. 第60回日本生物工学会大会, 2008年8月29日, 仙台
- ⑥ M. Fukuda: Development of degradation pathways for chlorinated organic pollutants. The 4th International Symposium of Environmental Biotechnology, Aug. 13, 2008, Tainan, Taiwan
- ⑦ 福田雅夫: PCB分解菌の全ゲノム解明と環境に応答した遺伝子発現の網羅的解析, 日本土壤微生物学会2008年度大会, 2008年6月13日, 静岡
- ⑧ 南澤究: ゲノム情報に基づいた植物共生細菌の環境応答と物質循環機能の解明. 日本土壤微生物学会2008年度大会, 2008年6月13日, 静岡
- ⑨ 津田雅孝: 多重染色体性の *Burkholderia multivorans* のゲノム構造と土壌でのゲノム情報発現. 日本土壤微生物学会 2008年度大会. 2008年6月13日, 静岡
- ⑩ 宮崎健太郎: メタゲノムを利用したプレ

タンパク質工学. 日本蛋白質科学会, 2008年6月12日, 東京

- ⑪ M. Fukuda: A versatile metabolic system in a *Rhodococcus* PCB degrader. The 24th International Symposium on the Frontier of Microbiology: Resources, Environment, and Genome, Jan. 25, 2008, Okayama
- ⑫ 福田雅夫: PCB分解菌の芳香族分解遺伝子発現制御と環境応答. 極限環境微生物学会第8回シンポジウム, 2007年7月3日, 横浜
- ⑬ 津田雅孝, 西山依里, 宮腰昌利, 永田裕二, 大坪嘉行: 生態系での細菌ゲノム情報発現. 極限環境微生物学会第8回シンポジウム, 2007年7月3日, 横浜
- ⑭ M. Fukuda: Rhodococcus catabolic genes and enzymes. BBSRC International Workshop: Developing a Scientific Strategy for Investigating and Exploiting the Biology of *Rhodococcus*, Sep. 19, 2006, Belfast, UK
- ⑮ 津田雅孝, 小野玲, 宮崎亮, 府中玄樹, 永田裕二: 機能発現に基づく環境汚染物質分解酵素遺伝子の生態系からの直接的取得と解析. 第59回日本生物工学会大会, 2007年9月25日, 東広島
- ⑯ 津田雅孝: 多重染色体をもつ環境細菌のゲノム. 第7回日本進化学会, 2005年8月26日, 仙台
- ⑰ M. Fukuda: Function of duplicated degradation genes in a rhodococcal PCB degrader. Industrial Microbiology and Biotechnology Meeting 2005, Aug. 25, 2005, Chicago, USA.

〔図書〕(計7件)

- ① 永田裕二, 津田雅孝: 環境汚染物質分解細菌のメタゲノミクス. 「難培養微生物研究の最新技術II」シーエムシー出版. pp. 211-219. (2010)
- ② 永田裕二, 津田雅孝: カイメン共在細菌メタゲノム中の環境汚染物質分解酵素遺伝子相同配列の解析. 「マリンメタゲノムの有効利用」シーエムシー出版. pp. 166-178 (2009)
- ③ 宮崎健太郎: 新規酵素取得のためのメタゲノム利用技術開発. 「マリンメタゲノムの有効利用」シーエムシー出版. pp. 55-66 (2009)
- ④ Sota, M., Yano, H., Tsuda, M.: Bacterial class II catabolic transposons. In "DNA Transposable Elements Research" Nova Science Publishers. pp. 23-67. (2008)
- ⑤ 津田雅孝: メタゲノム. 「微生物の事典」朝倉書店. pp. 661-663 (2008)
- ⑥ 永田裕二, 津田雅孝: 難培養性細菌も研究対象とするメタゲノム解析. 「バイオフィルムの基礎と制御」エヌ・ディー・エス社. pp. 103-111. (2008)
- ⑦ 津田雅孝, 永田裕二, 大坪嘉行: 土壌環境細菌の比較ゲノム. 「比較ゲノム学から読み解く生命システム」秀潤社. pp. 166-172 (2007)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

- ①名称: 新規な芳香環水酸化酵素及びその遺伝子  
発明者: 末永光, 宮崎健太郎  
権利者: 同上  
種類: 特許権  
番号: 特願 2008-214862  
出願年月日: 2008年8月25日  
国内外の別: 国内
- ②名称: 酵素遺伝子スクリーニング法  
発明者: 内山拓, 宮崎健太郎  
権利者: 同上  
種類: 特許権  
番号: 特願 2008-200172  
取得年月日: 2008年8月1日  
国内外の別: 国内

〔その他〕 ホームページ

- ① 比較ゲノム解析ツール: GenomeMatcher, <http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gm/gmhome.html>
- ② *Rhodococcus* ゲノムデータベース: Rhodococcus Genome Project, <http://www.rhodococcus.ca/index.jsp>
- ③ Macroarray analysis page of *Bradyrhizobium japonicum*: <http://orca10.bio.sci.osaka-u.ac.jp/array02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

福田 雅夫 (FUKUDA MASAO)  
長岡技術科学大学・工学部・教授  
研究者番号: 20134512  
藤井 毅 (FUJII TAKESHI)  
農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・領域長  
研究者番号: 00354100

南澤 究 (MINAMISAWA KIWAMU)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号: 70167667

小川 直人 (OGAWA NAOTO)  
静岡大学・農学部・教授  
研究者番号: 60354031

宮崎 健太郎 (MIYAZAKI KENTARO)  
産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・グループ長  
研究者番号: 60344123