

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380049

研究課題名（和文）環境細菌の生態学的振舞の最初期過程に関する分子生物学的解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of the earliest step of ecological interaction of environmental bacteria

研究代表者

加藤 純一 (KATO JUNICHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：90231258

研究成果の概要（和文）：

Pseudomonas 属細菌は植物関連物質のエチレン、アミノ酸、リンゴ酸に誘引応答を見出した。そしてその走化性センサーとして *P. aeruginosa* PA26541（エチレン）*P. putida* Pput_3489（アミノ酸）、*P. aeruginosa* PA2652（リンゴ酸）の特定に成功した。また、トリクロロエチレン(TCE)分解細菌の *P. putida* F1 の TCE 走化性を解析し、その正の走化性センサーとして Pput_6181、負の走化性センサーとして Pput_3489 を特定した。

研究成果の概要（英文）：

We found that *Pseudomonas* strains show chemotactic responses to plant-related compounds including amino acids, malate, and ethylene. We identified *P. aeruginosa* PA26541, *P. putida* Pput_3489, and *P. aeruginosa* PA2652 as chemotactic sensory proteins for ethylene, amino acids, and malate, respectively. Molecular analysis of chemotaxis to trichloroethylene (TCE) in TCE-degrading bacterium *P. putida* F1 revealed that Pput_6181 and Pput_3489 serve as sensory proteins for positive and negative chemotaxis to TCE, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：生態学的振舞い、走化性、生物相互作用、バイオレメディエーション、センサー

1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物は多くの場合、植物や動物などのほかの生物に寄生したり、共生したり、あるいは感染して生息している。こうした微生物の生物相互作用は、当然ながら、まず当該生物同士が出会うことから始まるはずである。環境中における微生物の物質代謝（物質変換）もまた然り。まず微生物が対象となる物質と接触して初めて開始する。こうした、環境中における微生物と生物や物質との遭遇は偶然が支配しているのであろうか？それとも、何らかの機能を発揮して目的の生物もしくは物質を探しだし、積極的に接触しているのであろうか？

環境細菌の多くは運動性を示す。彼らはただ動いているだけではなく、好ましい化学物質には集積し、好ましくない化学物質からは忌避する走化性を示す。走化性の機能を支える運動器官である鞭毛モーターと走化性シグナル伝達系は、50~100もの遺伝子で構成されている。数億年以上の自然淘汰の圧力のもとで進化してきたにもかかわらず、多くの環境細菌が多数の遺伝子を必要とする運動性/走化性を保持し続けているという事実は、運動性/走化性が大きなアドバンテージをもたらしていることを強く示唆するものである。生物相互作用や物質代謝は環境細菌の生息に重要な生態学的挙動である。とするならば、環境細菌と相互作用の相手となる生物および代謝の対象となる物質との遭遇（すなわち生態学的挙動の最初期過程）に走化性が関与していると考えるのは、不合理とはいえないであろう。こうした走化性 vs 生態学的挙動をめぐる考えは、1960年代の走化性研究初期から提案されてきたが、その証明はいまだなされていない。そこで本研究では、生態学的挙動の最初期過程と走化性との関連を解明するために必要な基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

生態学的最初期過程は、科学的に面白い研究対象であるに留まらず、応用研究的にも重要な研究対象である。たとえば、環境汚染物質分解細菌を用いて現場でのバイオレメディエーション(in situ バイオレメディエーション)を行う場合、当該分解細菌が対象の汚染物質に対して集積応答（正の走化性）を示すならばバイオレメディエーションは加速されると期待される。反対に汚染物質から逃避（負の走化性）を示すならば、バイオレメディエーションの効率は低下しよう。また、たとえば *Pseudomonas fluorescens* や

Pseudomonas putida は植物根に寄生してコロニーを形成することで、その植物の成長を促進する効果をもたらす。*Pseudomonas syringae* は植物の傷口から感染して植物に疾病を起こす。もしこれらの生物相互作用の最初期過程に走化性が関与しているならば、走化性を制御することで環境細菌の寄生や感染をコントロールできると考えられる。

走化性シグナル伝達系は、走化性物質を感知するメチル受容走化性蛋白質(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)と、MCPからのシグナルを情報処理して鞭毛モーターの回転方向を制御する細胞内シグナル伝達系から成る。運動性細菌は複数のMCPを有しているが、それらMCPは共通の細胞内シグナル伝達系にシグナルを伝達している。したがって、ある運動性細菌がどのような物質を誘引物質もしくは忌避物質として感知するかは、その菌が有しているMCPのレパートリーによって決定される。MCPは特徴的な44アミノ酸残基のコンセンサス配列を持つことから、MCP候補遺伝子の特定は極めて容易にできる。しかし、特定されたMCPがどのような物質を感知するかを明らかにするのは非常に難しく、環境細菌のMCPで機能が特性化されたものはほとんどない。しかし、走化性と生態学的挙動の最初期過程との関連の解明を目指すならば、それに関与すると思われるMCPを特定する必要がある。そこで本研究では、上述のバイオレメディエーションと植物-環境細菌相互作用に焦点をあて、次項を研究目的とした。

(1) 植物成長促進効果を有する *P. fluorescens* の植物関連物質に対する走化性の分子生物学的解析。植物関連物質としては、根から分泌される主要成分である

(2) 重要な環境汚染物質であるトリクロロエチレン(TCE)を分解する *P. putida* F1のTCE走化性の分子生物学的解析—TCEに対するMCPの特定—

3. 研究の方法

(1) 菌体の培養：*Pseudomonas aeruginosa* は37℃、その他の菌株は28℃で振とう培養した。培地は最少培地であるT₀培地(J. Bacteriol. 86:222 [1963])を用いた。トルエン曝露する場合には、トルエンが入った小試験管を培養容器に入れ、トルエン蒸気を供給することにより行った。

(2) 走化性アッセイ：キャピラリーアッセイ (Appl. Environ. Microbiol. 58:2250 [1992])およびアガロースプラグアッセイ (J. Bacteriol. 188: 6700 [2006])により走化性

を測定した。

(3) 定量的リアルタイム PCR : Roche Light Cycler 1.5 を用い、製造者指定の使用法にしたがって定量的リアルタイム PCR を行い、特定の mRNA を定量した。総 RNA は NucleoSpin RNA II キット (Macherey-Nagel) を用いて抽出・精製した。

4. 研究成果

(1) *Pseudomonas* 属細菌の植物関連物質に対する走化性

試験した植物関連物質は、植物ホルモンであるエチレンと根から分泌される有機物である。根から分泌される主な有機物は成分比が大きい糖、アミノ酸、有機酸について試験した。

1-1 植物ホルモンエチレンへの走化性

以前の研究から *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 は TCE に対して正の走化性を示す潜在性を有していること、*mcpA*(PA0180)がその MCP をコードしていることが判明している(J. Bacteriol. 188: 6700-6702 [2006])。McpA は TCE だけでなく、ジクロロエチレン、テトラクロロエチレンをも感知する。このことから、McpA は植物ホルモンでもあるエチレンも感知するのではないかと考えた。そこで、エチレンガスで飽和した試料から作成したアガロースプラグを用い、エチレンに対する走化性をアガロースプラグ法で試験した。その結果、*P. aeruginosa* PAO1 株を始めとして *P. putida* KT2440、*P. fluorescens* IFO 14086 および *P. syringae* IAM 12022 がエチレンに対して正の走化性を示すことが分かった(図 4-1)。TCE の MCP である McpA

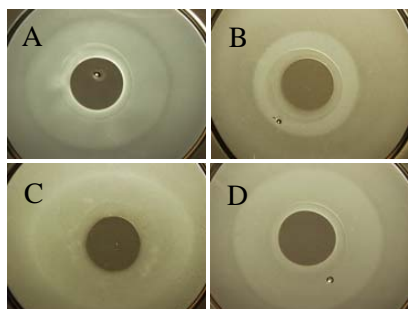


図 4-1 *Pseudomonas* 属細菌のエチレンに対する走化性応答。エチレンで飽和した試料からアガロースプラグを作成し *P. aeruginosa* PAO1 (A)、*P. putida* KT2440 (B)、*P. fluorescens* IFO 14086 (C) および *P. syringae* IAM 12022 のエチレン走化性を試験した。

がエチレンの感知にも関与しているかを試験するため、*P. aeruginosa* PAO1 株の *mcpA* 遺伝子破壊株について走化性試験を行ったところ、親株と同様のエチレン走化性を示し

た。このことから、エチレンは McpA 以外の MCP によって感知されていることが分かった。そこで、*P. aeruginosa* PAO1 株の MCP 遺伝子破壊株ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、*tlpQ* (PA2654) がエチレン走化性を示さないこと、また変異株への *tlpQ* の導入によりエチレン走化性が復帰することから、TlpQ がエチレンの走化性センサーであることが分かった。すでに公開済みの *P. putida*、*P. fluorescens* および *P. syringae* のゲノムデータに対して Blast 検索を行ったところ、それぞれホモログ (AAN69158, ABA75508 および AAY37721) を有することが分かった。おそらくこれらホモログ MCP がエチレン走化性のセンサーとして機能していると思われる。

1-2 アミノ酸に対する走化性

多くの運動性細菌にとってアミノ酸は強い誘引物質である。これまでの研究から、*P. aeruginosa* PAO1 は PctA、PctB および PctC がアミノ酸の MCP として機能していることが明らかになっている (J. Bacteriol. 177:7019-7025 [1995], Microbiology 143:3223-3229 [1997])。そこで、*P. putida* の PctA ホモログがアミノ酸 MCP として機

表 4-1 *P. aeruginosa* Δ pctABC 変異株の アミノ酸走化性に及ぼす *P. putida* F1 の Pput_3489 の影響

アミノ酸	<i>P. aeruginosa</i> Δ pctABC +pUCP18	<i>P. aeruginosa</i> Δ pctABC +pMH3489
Gly	-	++
Ala	-	++
Val	-	-
Leu	-	-
Ile	-	+
Met	-	+++
Pro	-	-
Phe	-	++
Trp	-	-
Ser	-	+++
Thr	-	++
Asn	-	+++
Tyr	-	+
Gln	-	++
Cys	-	++
Lys	-	-
Arg	-	-
His	-	-
Asp	-	-
Glu	-	-

- : 応答なし、+ : 誘引応答

能するか調べた。*P. putida* F1 のゲノム配列に対して Blast 検索を行った結果、Pput_3489 が PctA と最も高い相同性をしめす MCP 遺伝子であることが分かった。そこで、PCR により *P. putida* F1 のゲノムから Pput_3489 を増幅して広宿主域ベクターである pUCP18(Gene 97:109-112 [1991])にクローニングした。得られたプラスミド pMH3489 を *P. aeruginosa* PAO1 株の *pctABC* 三重破壊株 (Microbiology 143:3223-3229 [1997]) Δ *pctABC* 株に導入してそれぞれのアミノ酸に対する走化性をキャピラリーアッセイで試験した。*P. aeruginosa* Δ *pctABC* 株はいずれのアミノ酸にも応答しないが、pMH3489 の導入により、11 のアミノ酸に対する走化性応答が復帰した (表 4-1)。このことから、*P. putida* F1 株の Pput_3489 は 11 種類のアミノ酸を感知する MCP であることが示された。ちなみに、*P. fluorescens* および *P. syringae* とも PctA のホモログを有していることが、ゲノムデータから分かっている。

1-3 有機酸に対する走化性

ついで糖と有機酸に対する走化性を検討した。まず、MCP 遺伝子破壊株のライブラリーが構築できている *P. aeruginosa* PAO1 株を用いて糖 (アラビノース、グルコース、マルトース、ラムノース、スクロース、フルクトースおよびキシロース) と有機酸 (酢酸、酪酸、蔞酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸およびピルビン酸) に対する走化性を測定した。その結果、誘引応答を示したのはリンゴ酸だけであった。リンゴ酸走化性に関与する MCP を特定するため *P. aeruginosa* PAO1 株の MCP 遺伝子破壊株ライブラリーのリンゴ酸走化性を試験した (図 4-2)。その

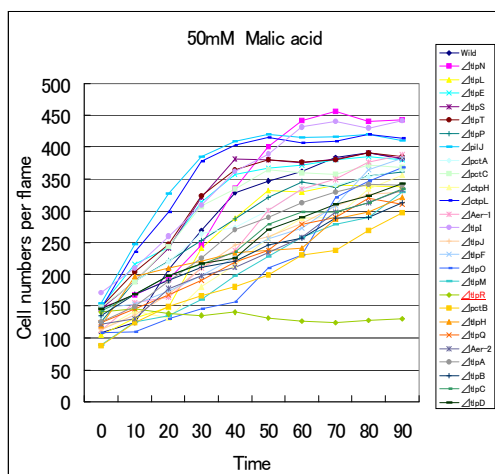


図 4-2 *P. aeruginosa* MCP 遺伝子破壊株の 50 mM リンゴ酸に対する走化性応答。菌体懸濁液に 50 mM リンゴ酸と 1%アガロースを含むガラスキャピラリーを挿入した後、顕

微画像をビデオで録画した。そして、ビデオ画面上の細胞数の経時変化をグラフ化した。

結果、*tlpR*(PA2652)破壊株がリンゴ酸に対して応答しないこと、また、*tlpR* の導入で相補されることから、TlpR がリンゴ酸走化性のセンサーであることが分かった。定量的 PCR を用いて増殖基質 (グルコース、リンゴ酸およびクエン酸) が *tlpR* の転写に及ぼす影響を調べたが、*tlpR* の転写は構成的であった。次に、*P. fluorescens* Pf0-1 の有機酸に対する応答を調べた。その結果、この株は *P. aeruginosa* PAO1 株と同様にリンゴ酸に対して強い誘引応答を示すだけでなく、コハク酸、フマル酸やクエン酸に対しても誘引応答を示すことが分かった (図 4-3)。*P. fluorescens* は TlpR のホモログを有しているため、現在、その遺伝子破壊株を作成し、TlpR がこれら有機酸の感知に関わっているか調べている。

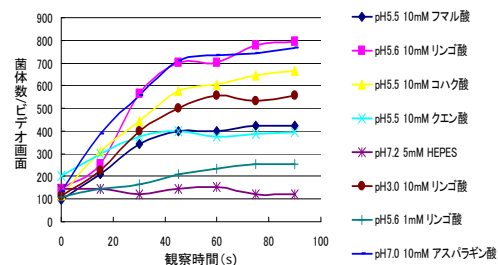


図 4-3 *P. fluorescens* Pf0-1 のリンゴ酸、クエン酸、フマル酸、コハク酸に対する走化性応答

(2) *P. putida* F1 の TCE に対する走化性

トルエン共存下で TCE を共酸化分解する *P. putida* F1 は TCE に対して正の走化性を示すことが知られている (Parales, et al. Appl. Environ. Microbiol. 66:4098-4104 [2000])。この TCE 走化性はトルエン存在下で誘導発現し、TCE 分解系には依存していない。しかし、どの MCP が TCE のセンサーなのかは不明であった。そこで、*P. putida* F1 の TCE の MCP の特定を行った。ついで、*P. putida* F1 が併せ持っている TCE に対する負の走化性応答の MCP の特定も行った。

2-1 *P. putida* F1 の TCE の正の走化性 MCP の特定

P. aeruginosa PAO1 株で特定された TCE の正の走化性センサー-McpA のホモログは *P. putida* F1 のゲノムには見出されなかった。そこで、Parales らが見出した TCE 走化性がトルエンで誘導されるとの知見を利用して絞り込みを行った。*P. putida* F1 は 27 の MCP 候補遺伝子を有している。そこで、トルエン曝露条件および非曝露条件で培養した *P. putida* F1 から総 RNA を調製して定量的リアルタイム PCR を行い、これら 27 の遺

伝子の転写を比較検討した。その結果、Pput_5574, Pput6181, Pput7976, Pput8329, Pput8936, Pput_9549の6遺伝子がトルエン曝露で転写量が増大することが分かった(図4-4)。そこで、これら6遺伝子をPCRで増幅して広宿主域ベクターpUCP18に組み込んで、TCEに対する正の走化性を示さない変異株、*P. aeruginosa* Δ *mcpA* 株に導入した。得られた形質転換株のTCE走化性を調べた結果、Pput_6181の導入によりTCE走化性が復帰することが分かった。さらに*P. putida* F1のPput_6181破壊株を作成してTCE走化性を調べたところ、破壊株はTCE走化性が著しく低下していることから(図4-5)、*P. putida* F1のTCEの主要な走化性センサーはPput_6181であることが明らかになった。

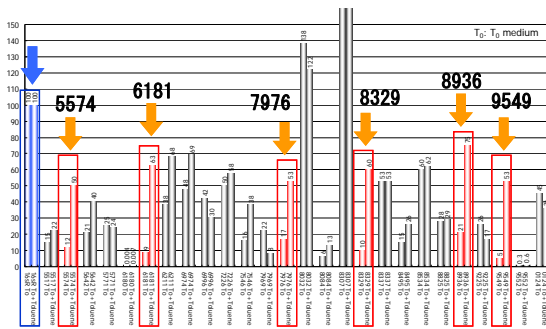


図4-4 *P. putida* F1のMCP遺伝子の転写に及ぼすトルエン曝露の影響。トルエン曝露および非曝露で増殖させた*P. putida* F1から総RNAを抽出し、定量的リアルタイムPCRで27のMCP遺伝子の転写を定量した。6つの遺伝子がトルエン曝露で転写量が高まることが分かった。

2-2 *P. putida* F1のTCEの負のMCPの特定

トルエン非曝露の*P. putida* F1はTCEに対して忌避応答を示すことを発見した。*P. aeruginosa*でもTCEに対する負の走化性は見出されており、アミノ酸走化性センサーであるPctABCが負の走化性センサーとして機能していることが明らかになっている(J. Biosci. Bioeng. 99:396 [2005])。そこで、*P. putida* F1で特定されたアミノ酸走化性センサーPput_3489がTCEに対する負の走化性のセンサーであるか検討した。*P. putida* F1のPput_3489遺伝子破壊株を作成しTCE走化性を調べたところ、親株と比べ忌避応答が減退し、むしろTCEに対して正の走化性を示すようになった(図4-6)。この結果から、Pput_3489が*P. putida* F1の主要な負の走化性センサーであることが示された。

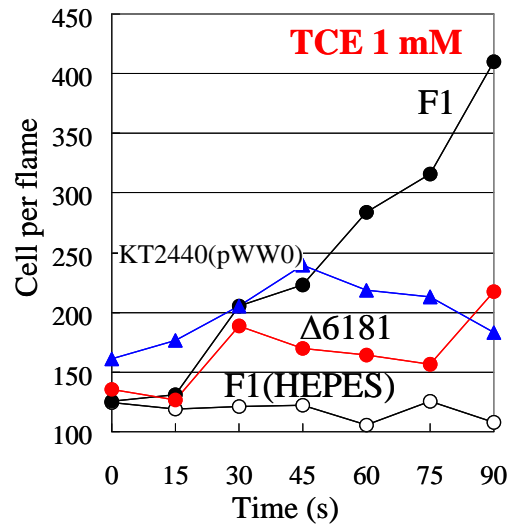


図4-5 *P. putida* F1, F1の Δ Pput_6181変異株の1 mM TCEに対する走化性。キャピラリーアッセイで試験した。

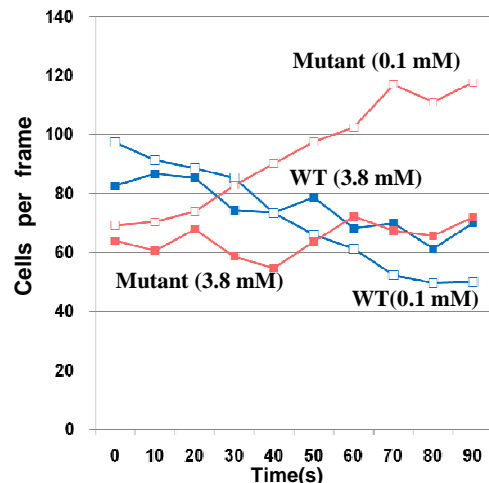


図4-6 *P. putida* F1親株(WT)とPput_3489遺伝子破壊株(Mutant)の0.1 mMおよび3.8 mM TCEに対する走化性応答。キャピラリーアッセイで測定した。

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3件)

- ① J. Kato, H. -E. Kim, N. Takiguchi, A. Kuroda, and H. Ohtake. *Pseudomonas* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. J. Biosci. Bioeng. 106: 1-7 (2008) (査読有).
- ② 加藤純一、金慧恩 環境細菌の走化性—*Pseudomonas*を中心に— J. Environ.

Biotechnol. 7: 93-98 (2007) (査読有).
③H.-E. Kim, M. Shitashiro, A. Kuroda, N. Takiguchi, and **J. Kato**. Ethylene chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species. *Microbes Environment*. 22: 186-189 (2007) (査読有).

〔学会発表〕(計 8 件)

①桑野靖之、米田佳那子、中島田豊、**加藤純二** 植物関連物質に対する *Pseudomonas* 属細菌の走化性の分子機構 日本微生物生態学会第 25 回大会 2009 年 11 月 22 日 (広島大学)

② **加藤純一**、林田通世、中島田豊 *Pseudomonas putida* F1 のトリクロロエチレン走化性センサーの解析 日本生物工学会 2009 年度大会 2009 年 9 月 24 日 (名古屋大学)

③ **J. Kato**, H.-E. Kim, N. Takiguchi Chemotactic transducer proteins for environmental pollutants in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. International Biotechnology Symposium/Exhibition 2008 October 14, 2008 (Dalian, China)

④ **J. Kato**, H.-E. Kim, H. Dabasaki Chemotactic transducer proteins for plant-related compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. International Union of Microbiology Societies 2008 August 6, 2008 (Istanbul, Turkey)

⑤H. E. Kim, **J. Kato** Molecular analysis of bacterial chemotaxis toward plant-related compounds. 2007 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies. October 11, 2007 (Seoul, Korea)

⑥H. E. Kim, **J. Kato** Motile bacteria can sense and move to environmental pollutants. 2007 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies. October 11, 2007 (Seoul, Korea)

⑦金慧恩、黒田章夫、滝口昇、**加藤純一** *Pseudomonas aeruginosa* の環境汚染物質トリクロロエチレンとトルエンに対する走化性の分子機構 日本生物工学会 2007 年度大会 2007 年 9 月 26 日 (広島大学)

⑧金慧恩、黒田章夫、滝口昇、**加藤純一** *Pseudomonas aeruginosa* の植物関連物質への走化性の分子機構 日本生物工学会 2007 年度大会 2007 年 9 月 26 日 (広島大学)

〔図書〕(計 1 件)

① **J. Kato** *Pseudomonas* Motility and Chemotaxis. In *Pseudomonas* (H. A. Rehm ed.), pp. 109-128, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany (2008)

〔その他〕

ホームページ等

http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/kato_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 純一 (KATO JUNICHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：90231258

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：