

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成19年度～平成20年度

課題番号：19780065

研究課題名（和文） 厳密に制御した低酸素条件下における微生物の機能解析と新規微生物の探索

研究課題名（英文） Isolation of microorganism and characterization of its metabolism under different oxygen concentrations

研究代表者

篠田 吉史 (Shinoda Yoshifumi)

京都学園大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：20434657

研究成果の概要：微好気性細菌 *Magnetospirillum* sp. TS-6 株を異なる酸素濃度条件下で培養し、安息香酸の好気/嫌気代謝の鍵となる3つの酵素の発現を調べた。その結果、1) 好気条件と嫌気条件の両方の代謝経路で機能する安息香酸 CoA リガーゼ (Bcl) の遺伝子は各条件下ではほぼ一定の転写量を示した 2) 好気代謝を担うベンゾイル CoA オキシゲナーゼ (Box) の遺伝子は酸素濃度 0%とそれ以外でゼロ/サムになるように転写されていた 3) 嫌気代謝を担うベンゾイル CoA レダクターゼ (Bcr) の遺伝子は、酸素濃度が減少するにつれて転写量が連続的に増加した。これにより、微好気環境に生息する環境微生物の特徴的な環境応答の一端を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	0	2,200,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

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：微生物機能・環境応答

1. 研究開始当初の背景

芳香族化合物の嫌気条件下における分解は、様々な化合物が変換経路によって特定の化合物に収斂し、それ以後は共通の代謝経路で分解されるという漏斗型のスキームを経る。この結節点となる化合物は中心的代謝中間体と呼ばれ、多くの場合ベンゾイル CoA がその役割を担っている。したがって、ベンゾイル CoA を還元的に脱芳香化して環開裂へと導くベンゾイル CoA レダクターゼ (Bcr) は、この経路全体の鍵酵素となって

いる。一方、芳香族化合物分解性 *Magnetospirillum* 属細菌はこの嫌気分解経路の他に、好気条件下において分子状酸素を用いてベンゼン環を開裂する能力を持つが、これはこれまでの研究から、古典的な安息香酸オキシゲナーゼによる反応ではなく、基質を Bcr と共有した、ベンゾイル CoA オキシゲナーゼ (Box) によると推定された。

Bcr はニトロゲナーゼのように ATP の加水分解によって電子を”活性化”してベンゼン環の安定な構造を破壊する酵素で、精製酵素

は極めて酸素感受性が高いため、脱窒性細菌である *Thauera aromatica* では無酸素条件下でのみ発現、機能すると考えられている。しかし、*Magnetospirillum* sp. TS-6 株においては低酸素条件下においても *bcr* 遺伝子の転写が見られ、有酸素条件下で機能すると考えられる Box との切り替えは転写レベルでは酸素の有無と一致しない。

2. 研究の目的

好気条件と嫌気条件の「境界領域」に生息する微生物の生理学は、病原菌を除いてこれまであまり研究されていない。そうした好気条件下に生息する環境微生物の環境応答メカニズムについて精査することは、環境浄化微生物の挙動の理解などにつながると考えられる。そこで、*Magnetospirillum* sp. TS-6 株の持つ Bcr と Box の2つの酵素、好気、嫌気両条件下で機能すると考えられる安息香酸 CoA リガーゼ (Bcl) の発現調節について調べることで、好気性細菌の微生物機能の一端を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

容器中の酸素濃度 0~20%の異なる条件下で *Magnetospirillum* sp. TS-6 株を培養し、安息香酸代謝の鍵となる3つの酵素の遺伝子の転写量を定量 PCR によって調べた。

4. 研究成果

実験の結果、好気条件と嫌気条件の両方の代謝経路で機能する安息香酸 CoA リガーゼ (Bcl) の遺伝子は各条件下ではほぼ一定の転写量を示した。好気代謝を担うベンゾイル CoA オキシゲナーゼ (Box) の遺伝子は、酸素濃度 0%とそれ以外でゼロ/サムになるように転写されていた。また、嫌気代謝を担うベンゾイル CoA レダクターゼ (Bcr) の遺伝子は、酸素濃度が減少するにつれて転写量が連続的に増加した (図)。

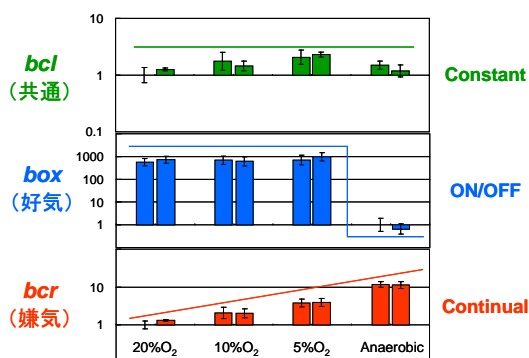


図) 各遺伝子の転写調節の酸素濃度への応答パターンが異なる

Bcr は酸素に触れると失活するため、嫌気条件下でのみ働いているとこれまで考えられ

てきた。したがって、この細菌において Bcr の遺伝子の転写が好気=ゼロ/嫌気=サムではなく、その境界条件において連続可変的に制御されていたことは興味深い発見である。また、Box の制御とは異なる制御機構の支配下にあることも明らかになった。今後はさらに精緻な好気条件を設定できる培養系を確立すると共に、酵素のタンパク質としての生産量とその活性を調べることで、この細菌の Bcr の酸素耐性やその発現制御機構を明らかにすることが課題となる。

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1件)

Kuntze, K., Shinoda, Y., Moutakki, H., McInerney, M. J., Vogt, C., Richnow, H. H., Boll, M.

6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes.

Environmental Microbiology 10 1547-1556 (2008) 査読有

[学会発表] (計1件)

篠田吉史、谷 吉樹、加藤暢夫

Magnetospirillum sp. TS-6 株の安息香酸分解遺伝子の発現に対する曝気条件の影響

2008年度日本農芸化学会大会 2008年3月26日 名城大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyotogakuen.ac.jp/~microbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田吉史 (SHINODA YOSHIFUMI)

京都学園大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号: 20434657