

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380176

研究課題名（和文）環境汚染物質添加土壌での微生物集団応答様式の研究

研究課題名（英文）Response of soil microbial community to exposure of environmental 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）：

汚染土壌での汚染物質微生物分解の実体と本生態系での微生物の適応様式の解明をめざし、環境汚染物質を人為的に添加した閉鎖系土壌をモデル系として、(a)土壌のメタゲノムの生物情報学解析と、(b)実際に分解能を示す各種分解酵素遺伝子群の取得・解析を経時的かつ同時平行的に実施した。この結果、汚染化に伴う棲息細菌集団と各種分解酵素遺伝子群等の変動様式を明らかにし、汚染物質分解に関与したと示唆された遺伝子群とその由来細菌属を提示した。

研究成果の概要（英文）：

Soil microbial communities play very important role in the bioremediation of chemical pollutants. To investigate how such a community responded to and degrade the pollutants, time series analysis of the community in an artificially polluted and closed soil system was carried out by metagenomic sequencing of the community in conjunction with the isolation and characterization of the genes and bacterial strains able to degrade the pollutants. Our analysis strongly suggested the crucial catabolic genes and their host genera involved in the bioremediation in the polluted soil.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：ゲノム微生物学

科研費の分科・細目：境界農学・境界農学

キーワード：環境汚染、細菌、メタゲノム、分解酵素遺伝子

1. 研究開始当初の背景

有害化学物質で土壌が汚染された際、環境浄化における土壌棲息細菌集団の役割は非常に大きく、実際、多くの環境汚染物質分解細菌株が汚染土壌から取得されている。これらの細菌株は、バイオレメディエーション候補株として、また、微生物の迅速な環境適応・進化機構の解明のモデルとして国内外で

盛んに研究が行われ、学術的に新規性のある数々の重要な知見が提示されてきた。ただ、現在までの環境汚染物質分解細菌の研究は、汚染物質を炭素源として完全分解できる単離菌株の実験室系での詳細な研究が中心であり、(a)環境に棲息する99%以上の細菌は既存手法では培養困難であること、(b)汚染環境由来単離菌株の汚染物質分解という機能発

現は、実験室系と複雑な複合生物系である自然環境とでは明瞭に異なること、そして、(c)汚染環境で少数派の微生物が汚染物質分解の中核を担う例が希でないこと、が判明しつつある。また、(d)汚染環境での2種以上の微生物による汚染物質の完全分解が推測されている。従って、自然界における環境汚染物質分解微生物の持つ分解酵素遺伝子の存在様式や機能発現、共存微生物との相互作用による汚染物質の分解、という根源的問題を解決する必要があり、この解決は生態系での汚染物質微生物分解の真の実体と汚染生態系での微生物の適応・進化の提示のみならず、実際の環境浄化への微生物の着実かつ効率的な利用に不可欠で重要な基盤的知見の提示に繋がる。ただ、これら根源的問題解明をめざす研究を開放生態系である実際汚染環境で実施した例は数多くあるが、開放生態系では、その生物的並びに非生物的な多種環境因子の量的並びに質的変動の予期が極めて困難であり、学術的に再現性・信頼度の高い研究成果の取得が極めて困難であった。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、環境汚染物質を添加した閉鎖系土壌をモデル系として、棲息細菌とその集団の変動様式、これら細菌集団由来の複数分解酵素遺伝子群の構造と量的変動様式、そして、分解細菌を含む棲息細菌集団の汚染物質に対する適応・進化様式、の時間軸に伴う全体像を様々な微生物学的手法を有機的に組み合わせ検討し、これら結果を統合して、汚染生態系での汚染物質微生物分解の実体と本生態系での微生物の適応・進化様式の提示を目的とした。具体的には、3種環境汚染物質(多環芳香族化合物のフェナントレン、PCB 代替化合物としてビフェニル、ダイオキシン代替化合物としてカルバゾール)を同時添加した閉鎖系土壌をモデル系として、(a)土壌のメタゲノムの生物情報学解析と、(b)実際に分解能を示す各種分解酵素遺伝子群の取得・解析を経時的かつ同時平行的に実施することで、棲息細菌集団と各種分解酵素遺伝子群等の汚染化による変動様式を総合的に解析し、土壌細菌集団の人工的環境汚染物質添加に対する適応様式の解明をめざした。

3. 研究の方法

本研究に先立ち、特定土壌を前述3種環境汚染物質に同時添加した閉鎖系土壌と対照として非添加の閉鎖系土壌に関して、(a)添加汚染物質の残存量解析、(b)広範な環境に存在することが判明していた既知分解酵素遺伝子群の検出と定量化、(c)PCR-DGGE法や16S rRNA 遺伝子配列決定による菌叢変動検討、そして、(d)汚染直前と汚染後の6並びに12

週目に調製したメタゲノムでの大規模な16S rRNA 遺伝子配列決定とショットガンシーケンシングをIllumina社とRoche社の各シーケンサーを用いて実施してきた。本研究では以下の手法により研究を実施した。

(1) メタゲノムの塩基配列決定による解析

汚染後1、3、24週目土壌並びに対照非汚染土壌由来メタゲノムDNA試料での、大規模な16S rRNA 遺伝子配列決定と上記の各シーケンサーを用いて実施した。この結果、既に決定していた汚染直前と汚染後2時点で調製して塩基配列を解読していたメタゲノムDNA試料も含めた計11試料について、16S rRNA 遺伝子配列とランダム塩基配列が得られた。16S rRNA 遺伝子に関しては、RDPデータベース(DB)を基本として自ら構築したin-house DBを用いた相同性検索により、属以上レベルでの菌叢解析を行い、時間経過に伴う細菌叢変動様式を提示した。変動が激しかった属細菌については、その絶対数の増減の検討を、保存してあった土壌から新たに調製したメタゲノムと属特異的16S rRNA 遺伝子プライマーを用いたPCRで実施した。ランダム塩基配列に関してはNCBI-nr DBを用いた相同性検索を行い、相同性検索で見出した様々な機能遺伝子全てについて、クローリにした各遺伝子の長さで補正を加え、各メタゲノム試料での相対量の変動様式を提示した。また、相同性を示した各遺伝子について、KEGG DBを用いた検索により、当該遺伝子の(a)由来する細菌属、(b)支配する代謝酵素・経路、そして、(c)経時的な量的変動、を検討した。

(2) 分解機能発揮可能な汚染土壌由来酵素遺伝子の取得と解析

フェナントレンやビフェニル、カルバゾールの初発水酸化酵素で実際に分解機能発揮可能な汚染土壌由来酵素遺伝子を遺伝学的手法で取得するために、やはり多環のナフタレンの完全分解環境細菌からその初発水酸化酵素遺伝子を破壊した誘導体株を受容菌にして、メタゲノムのコスミドライブラリーを形質転換し、インドールからインディゴ産生能を獲得した転換体を取得した。転換体内コスミド支配のインディゴ産生能を司る遺伝子の特定と既知遺伝子に対する新規性、周辺遺伝子群構造の解明、そして、(1)で得たメタゲノムのラインダム塩基配列との相同性検索によるメタゲノム内での経時的変動の検討を行った。

(3) 汚染土壌由来の汚染物質分解細菌株の取得と解析

フェナントレンを完全又は部分分解可能な細菌は本化合物添加寒天培地でコロニー周辺にクリアゾーンを形成する。冷凍保存し

ていた汚染土壌由来の微生物集団を本培地に塗布し、クリアゾーン形成菌株を単離した。また、フェナントレンまたはビフェニルを添加した無機最小液体培地に微生物集団を接種後、集積培養することで、いずれかを炭素・エネルギー源にできる菌株の取得を実施した。単離菌株の分類学的同定と既知分解酵素遺伝子の有無を検討し、一部菌株に関してはゲノムのドラフト塩基配列を決定した。

(4) 滅菌化土壌への既得微生物集団の移植と集団組成の変動

ガンマ線滅菌化土壌に、汚染化土壌から回収していた微生物集団を接種後、一定期間の馴養を経て、3-クロロ安息香酸(3CB)を汚染物質として添加、さらに本汚染土壌で培養した。集団接種後で3CB添加の前と後の複数時点での土壌メタゲノムを調製し、各時点でのメタゲノムの16S rRNA 遺伝子群を大規模決定し、菌叢の変動解析を行った。

4. 研究成果

(1) メタゲノムの塩基配列決定による解析

汚染土壌と対照としての非汚染土壌のメタゲノム11試料の16S rRNA 遺伝子の大规模塩基配列解析で、汚染後1週目から急激な菌叢変動が汚染土壌でのみ認められ、検討した24週目までβ-プロテオバクテリアの*Burkholderia* 属細菌が優占菌群となったが、その後の本属細菌の相対的割合は減少し、24週目には汚染前の菌叢構成への回帰傾向が認められた。また、汚染後の3週目以降に始まる汚染物質分解が盛んな6週目にはグラム陽性の*Mycobacterium* 属細菌の割合が上昇していた特徴を見出した。定量PCRを用いた検討で、土壌での上記両属細菌数の絶対的増加を示した。また、一度優占化した*Burkholderia* 属細菌の減少は、多環芳香族微生物分解時に生じる活性酸素が*Burkholderia* 属細菌溶原化ファージDNAの切り出しと溶菌サイクルを誘導し、宿主細菌を殺すことに起因すると推測された。一方、メタゲノムのランダム配列の大規模塩基配列解析で、全リードの約1/4は何らかの細菌遺伝子に帰属できたが、汚染化で大きく変動する代謝パスウェイ帰属遺伝子群並びに変動しない代謝パスウェイ帰属遺伝子群が見出され、土壌微生物集団は遺伝情報ポテンシャルを減少させることなく迅速に汚染環境に適応していたと示唆された。一方、6週目において、フェナントレンとビフェニルの初発分解酵素遺伝子の相対的存在量が最も高く、その多くは*Mycobacterium* 属由来遺伝子と想定された。ただ、初発分解以降の更なる分解に関わる酵素群の遺伝子は*Burkholderia* 属細菌由来と推定され、汚染物質の完全分解への異なる細菌門による協調分解が示唆された。また、汚染

後3週経過以降にカルバゾールの微生物分解が認められたが、その既知初発分解酵素遺伝子と相同性を示す遺伝子は経時的調製メタゲノム試料で検出できず、汚染化土壌での本化合物初発分解には未知微生物酵素が関与したと強く示唆された。

(2) 分解機能発揮可能な汚染土壌由来酵素遺伝子の取得と解析

ナフタレン完全分解環境細菌の初発水酸化酵素遺伝子を破壊した誘導体株を受容菌にして、汚染土壌由来メタゲノムのコスミドライブラリーを形質転換し、インドールからインディゴ産生能を獲得した29の転換体を取得した。これらコスミド上のインサートにはナフタレン分解初発水酸化酵素遺伝子と相同性を示すDNA領域は存在しなかった。5つのコスミド上のインサートの全塩基配列の決定とインディゴ産生能に関わる遺伝子を特定した。当該遺伝子を用いたサザン解析から、29コスミド上のインサートは4種の異なるDNAに分類できた。そして、4つのインディゴ産生能に関わる遺伝子のうちの3つとその周辺遺伝子群は、それぞれフェノール、ナフトエ酸、3-ヒドロキシビフェニルやその類縁化合物の分解に関与することが判明、或いは示唆された。これら遺伝子産物のフェナントレンやビフェニル、カルバゾール分解能の更なる詳細な検討が必要であるものの、4コスミド由来インサートは、汚染土壌で3化合物分解が著しい時期由来のメタゲノムにのみ大幅な量的上昇が認められたことから、当該汚染土壌でのこれら化合物の分解への関与が強く示唆された。

(3) 汚染土壌由来の汚染物質分解細菌株の取得と解析

汚染土壌由来でフェナントレン分解が始まってからの異なる時期の微生物集団の中から完全又は部分分解可能な細菌株を単離した。*Mycobacterium*、*Paenibacillus*、*Dyella* 属に分類されたこれら株のゲノムドラフト塩基配列をRoche社シーケンサーで解読した。また、上記微生物集団をフェナントレンまたはビフェニルを添加した無機最小液体培地に接種、集積培養し、ビフェニル完全分解細菌の取得にも成功した。一方、汚染土壌の異なる時期を微生物集団から、*Burkholderia* 属細菌の選択的単離が可能な固体寒天培地を用いて本属細菌を50株以上単離し、Multi-locus sequence analysis法で種レベルでの分類学的同定を行った結果、異なる時期では単離*Burkholderia* 属細菌株群は異なることを示した。この知見は、メタゲノムでの16S rRNA 遺伝子配列決定における種レベルでの本属細菌の相対的組成の変動様式と矛盾しなかった。

(4) 滅菌化土壌への既得微生物集団の移植と集団組成の変動

一定環境から回収した微生物集団の様々な滅菌化環境への「移植」とその後の菌叢並びに遺伝子レパートリーの変動解析は、本研究で得られた上記成果の信頼性や再現性、変動規定環境要因の明示に繋がると期待した。本研究の一貫使用土壌の滅菌化試料に、汚染化土壌由来微生物集団の移植とその後の約1ヶ月の馴養化後、汚染物質として3-クロロ安息香酸(3CB)の添加し、経時的な菌叢変動を16S rRNA 遺伝子大規模決定で実施した。移植後には増殖速度の速い *Burkholderia* を含む細菌属が優占化したが、これら属の割合はその後減少し、1ヶ月後に菌叢は安定化した。また、3CB添加後4日以内に菌叢の大幅変動がおき、1ヶ月後でも菌叢安定化は認められなかった。このような移植実験の成果は、上記の信頼性や再現性、変動規定環境要因の明示に向けた基盤の確立を示すものであった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件) 全て査読有り

- ① 永山浩史, 菅原智詞, 遠藤諒, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: 機能相補による芳香族化合物複合汚染土壌からの新規分解酵素遺伝子の探索. *J. Environ. Biotechnol.* (in press)
- ② S. Suzuki, T. Ishida, K. Kurokawa, and Y. Akiyama: GHOSTM: A GPU-accelerated homology search tool for metagenomics. *PLoS ONE*, 7: e36060. (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0036060
- ③ Y. Ohtsubo, 4人, Y. Nagata, and M. Tsuda: Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. KKS102 located on integrative and conjugative element. *J. Bacteriol.* 184: 4237-4248 (2012)
- ④ Kimura, S. Yuhara, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Suppression of pleiotrophic phenotypes of *Burkholderia multivorans fur* mutant by *oxyR* mutation. *Microbiology* 158: 1284-1293 (2012)
- ⑤ Y. Nagata, 3人, Y. Ohtsubo, 5人, and M. Tsuda: Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 49: 499-508 (2011)
- ⑥ M. Arumugam, 18人, K. Kurokawa, 19人, MetaHIT Consortium, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and Bork: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174-180 (2011)

- ⑦ E. Nishiyama, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda: Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by in vivo expression technology. *Environ. Microbiol.* 12: 2539-2558 (2010)
- ⑧ H. Mori, F. Maruyama and K. Kurokawa: VITCOMIC: visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences. *BMC Bioinfo.* 11:332, 2010. doi:10.1186/1471-2105-11-332
- ⑨ H. Yano, 3人, Y. Nagata, M. Hattori, M. Tsuda: Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J. Bacteriol.* 192: 4337-4347 (2010)
- ⑩ 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: 芳香族化合物による土壌攪乱における微生物遺伝子プールの変動. *J. Environ. Biotechnol.* 10: 63-70 (2010)
- ⑪ 大坪嘉行, 大坪和香子, 永田裕二, 津田雅孝: ゲノム解析ソフトウェア GenomeMatcher. *化学と生物* 48: 313-319 (2010)

[学会発表] (計 30 件)

- ① 津田雅孝: 環境メタゲノム解析における微生物種. 日本農芸化学会 2013 年大会. 仙台, 2013 年 3 月 24-27 日
- ② M. Tsuda and K. Kurokawa: Time series metagenomic analysis of soil microbial community. International Symposium on Genome Science "Expanding Frontiers of Genome Science" Tokyo, January 9-10, 2013.
- ③ 黒川顕: メタゲノミクスの現状と未来. 情報・システム研究機構シンポジウム2012 「生命科学のビッグデータ革命」 東京, 2012年11月9日
- ④ K. Kurokawa: Development of an integrated analysis system for metagenomics and a global microbial database MicrobeDB.jp. 第28回日本微生物生態学会. 豊橋, 2012年9月20日
- ⑤ M. Tsuda, 5人, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, A. Fujiyama, and K. Kurokawa: Metagenomic Analysis of Microbial Community in Soil Contaminated with Aromatic Pollutants. Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012. Sendai, June 4-8, 2012
- ⑥ 黒川顕: 環境メタゲノミクス. 日本農芸化学会 2011 年大会. 京都, 2012 年 3 月 26-28 日
- ⑦ 津田雅孝: 環境汚染物質添加土壌での微生物集団の経時的メタゲノム解析. 第6回日本ゲノム微生物学会年会. 東京, 2012 年 3 月 10-12 日

- ⑧黒川 顕: 新型シーケンサーによるメタゲノム解析. 第63回生物工学会大会. 京都, 2011年9月27日
- ⑨津田雅孝: 環境変動に対する土壌微生物集団応答様式のメタゲノム的解析. 日本遺伝学会第83回大会. 京都, 2011年9月20日-22日
- ⑩ M. Tsuda: Response of soil microbiota to exposure to aromatic pollutants. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo, September 6-10, 2011
- ⑪ H. Kato, 2人, Y. Ohtsubo, 5人, Y. Nagata, A. Fujiyama, K. Kurokawa and M. Tsuda: Fluctuation of gene pools of soil microbiota induced by contamination with aromatic hydrocarbons. 13th International Society for Microbial Ecology Conference. Seattle, USA, August 22 - 27, 2010
- ⑫ H. Suenaga, 5人, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and K. Miyazaki: Meta-plasmid: *In silico* reconstruction of a plasmid-like circular DNA molecule and its possible role in the retrieved environment. 13th International Society for Microbial Ecology Conference. Seattle, USA, August 22 - 27, 2010
- ⑬津田雅孝, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二: 土壌汚染に対する微生物遺伝子プールの変動解析. 環境バイオテクノロジー学会2010年度大会. 仙台, 2010年6月21-22日

[図書] (計5件)

- ① Y. Ohtsubo, E. Nishiyama, Y. Ishibashi, Y. Nagata, and M. Tsuda: Strategies to reveal genomic function in natural soil systems. *In*: Nojiri, H., M. Tsuda, M. Fukuda, and Y. Kamagata (eds), Biodegradative Bacteria. Springer Verlag, Tokyo (in press)
- ②森宙史, 丸山史人, 黒川 顕: メタゲノムインフォマティクス, 難培養微生物研究の最新技術 II, pp82-91, 2010, シーエムシー出版, 東京.
- ③森宙史, 丸山史人, 黒川 顕: メタゲノムデータベース, メタゲノム解析技術の最前線, pp42-53, 2010, シーエムシー出版, 東京.
- ④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「難培養性微生物研究の最新技術 II」(大熊盛也, 工藤俊章編集) シーエムシー出版 pp 211-219 (2010)

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

黒川 顕 (KUROKAWA KEN)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号: 20343246

永田 裕二 (NAGATA YUJI)
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
 研究者番号: 30237531

大坪 嘉行 (OHTSUBO YOSHIYUKI)
 東北大学・大学院生命科学研究科・助教
 研究者番号: 40342761