

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510091

研究課題名(和文)ビスフェノールのバイオセンシングシステムとバイオレメディエーション技術の創成

研究課題名(英文)Development of biosensing and bioremediation system for bisphenol using bacterial chemotaxis

研究代表者

荷方 稔之(Toshiyuki, Nikata)

宇都宮大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30272222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：好気性運動性細菌である *Stenotrophomonas maltophilia* は、内分泌攪乱化学物質であるビスフェノールAを含む多種の芳香族化合物、特にフェノール類の濃度勾配を感知して集積応答する走化性と呼ばれる性質を示す。本研究では、走化性を援用したビスフェノールAの新規検出システム開発を目指し、その一貫としてフェノール、ハロゲン化フェノール走性に関する走化性センサー遺伝子を同定したところ、フェノール及びp-クロロフェノール走性にはMcp5とMcp6が、プロモフェノール、ヨードフェノール走性にはMcp1がそれぞれ主要な走性センサーであることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)： *Stenotrophomonas maltophilia* is a motile bacterium which accumulates to many kinds of phenols especially bisphenol A. This chemotactic response is mediated by transmembrane chemoreceptor proteins. *S. maltophilia* harbors putative twelve chemoreceptor genes and it is important to characterize these chemoreceptors for developing novel chemical detecting system or efficient bioremediation technique. In this study, we revealed that chemoreceptor Mcp5 and Mcp6 mainly mediated chemotaxis towards phenol and p-chlorophenol. We also found that this bacterium showed chemotactic response toward halogenized phenol such as p-bromophenol and p-iodophenol which were recognized by chemoreceptor Mcp1. These findings are useful for obtaining all-encompassing chemotaxis profile of *S. maltophilia*.

研究分野：生物環境工学

キーワード：走化性 *Stenotrophomonas maltophilia* クロロフェノール

1. 研究開始当初の背景

(1) 運動性を有する細菌は外界の化学物質の濃度勾配を感知し、集積、忌避といった行動的応答を起こす。この応答は走化性と呼ばれ、細胞膜に局在する走化性センサータンパク質(以下 Mcp)を介して化学物質が感知されることで走化性が発現する。この応答は高感度(>nM)であるため、走化性を用いた新規化学物質の検出システムの開発が期待できる。

(2) グラム陰性桿菌 *Stenotrophomonas maltophilia* は、ビスフェノール A をはじめとする様々な芳香族化合物に走化性を示す細菌である。またビスフェノール A は内分泌攪乱化学物質でもあることから本細菌を用いたビスフェノール A に対する走化性を詳細に解析することで、走化性を援用したビスフェノールの検出システムや、さらに環境汚染物質としての芳香族化合物のより効率的な生物学的浄化技術の開発が期待できる。

2. 研究の目的

(1)【フェノール走性に関する走化性センサー遺伝子の同定】 *S. maltophilia* JCM1975 はフェノールやビスフェノール A などのフェノール性化合物に走性を示す。これらを検知するセンサータンパク質をコードする遺伝子を同定することで新規検出システムや効率的なバイオレメディエーションへの応用が期待できる。そこで本研究では、まず *S. maltophilia* の合成培地を新規調製し、これを用いることでより良好な運動性を保持した *S. maltophilia* による高感度な走化性測定を実現することを目指した。その上で走性センサー遺伝子の破壊株を作製し、フェノールおよび *p*-クロロフェノールに対する野生株と遺伝子破壊株の走性応答を比較、検討することにより、走化性センサー遺伝子の同定を試みた。

(2)【ハロゲン化フェノール走性に関する走化性センサー遺伝子の同定】 *S. maltophilia* は *p*-クロロフェノールに対する走性応答を示すことが明らかとなった。そこで他のハロゲン化フェノール(*p*-プロモフェノール、*p*-ヨードフェノール)についての走性応答を調査し、それらの応答に関する走化性センサー遺伝子の同定を行うことで、*S. maltophilia* のより詳細な走性応答プロファイルに関する知見を得ることを目的とした。

(3)【多重破壊株の作製とビスフェノール A 走性に関する走化性センサー遺伝子の探索】 ビスフェノール A の走性応答に関する走化性センサー遺伝子を同定するため、走化性センサー遺伝子の単独破壊株及び多重破壊株を作製し、走化性を測定することでビスフェノール A の走性に関する走化性センサ

ー遺伝子の絞り込みを行った。

3. 研究の方法

(1)【新規合成培地の作製】 新規合成培地は、従来用いていた MOPS-グルコース-ポリペプトン培地からポリペプトンを除いた培地をもとに、アミノ酸要求性を考慮して 20 種類のアミノ酸の中から 30 , 18 時間振とう培養した後の濁度(OD₆₆₀)が 0.1 以上に増殖する組み合わせを探索した。

(2)【走化性の測定】 走化性は以下の方法で測定した。試験物質を含む 0.5%アガロース溶液を充填・固化したキャピラリーを、40mM MOPS(pH7.0), 5mM MgCl₂ 溶液で洗浄した菌体懸濁液に挿入し、細菌の運動の様子を倒立位相差顕微鏡で観察・録画した。この映像から静止画をコンピュータに取り込み、画像処理ソフトウェア NIH Image を用いて二値化した後、キャピラリー開口部付近の菌体を計数した。菌体数の経時変化から集積初速度(cells/sec)を算出し、菌体濁度(OD₆₆₀)で補正した比集積初速度(cells/sec・OD₆₆₀)で走性応答の強さを評価した。

(3)【走化性センサー遺伝子破壊株の作製】 遺伝子破壊株は相同組換えを利用して作製した。破壊する走化性センサー遺伝子を PCR で増幅し、pBluescriptII KS+にクローニングした。この組換えプラスミドを破壊する遺伝子内部に認識部位が存在する制限酵素で処理後再びライゲーションして欠損変異プラスミドを得た。これを *S. maltophilia* に導入し、プラスミド内のマーカー遺伝子で選択することで染色体 DNA に組み換えプラスミドが挿入された部分二倍体株を作製した。続いて選択圧の無い条件で培養し、分子内相同組換えが起こることでマーカー遺伝子を含まない遺伝子破壊株を得た。

また遺伝子破壊株に上記の手法を他の走化性センサー遺伝子について繰り返し行うことにより、多重破壊株を作製した。

4. 研究成果

(1)【*S. maltophilia* の合成培地の作製】メチオニン、セリン、バリンの 3 種のアミノ酸をポリペプトンの代わりに混合添加することにより、MOPS-グルコース-ポリペプトン培地と同程度に増殖し、かつ高い運動性を保持する合成培地を調製することができた。この合成培地を用いて *S. maltophilia* JCM1975 を培養し、*p*-クロロフェノールに対する走性を測定した。その結果合成培地を用いて培養した *S. maltophilia* の走性応答(比集積初速度 7.8cells/sec・OD₆₆₀)は、ポリペプトンを含む従来の培地を用いた場合(比集積初速度 4.8cells/sec・OD₆₆₀)と比べて 63%向上し、感度および再現性の高い測定を行うことが可能となった(Fig. 1)

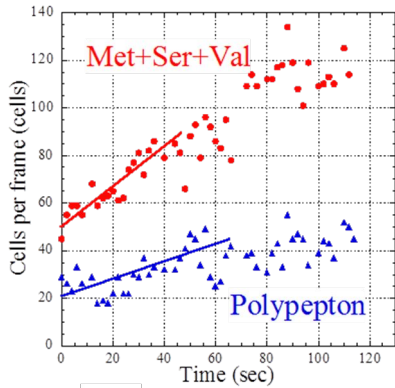


Fig. 1 Chemotactic response of *S. maltophilia* JCM1975 toward *p*-chlorophenol

(2)【フェノール走性に関する走化性センサー遺伝子の同定】新規合成培地を用いて培養した野生株は 2.0mM フェノールに対し弱い集積応答(3.3cells/sec \cdot OD₆₆₀)を示した。*S. maltophilia* のフェノールに対する走性応答の濃度依存性を測定したところ、キャピラリー内濃度 1 mM~60 mM のフェノールに対して正の走性を示し、20 mM まではその応答は濃度に対数的に依存していた。走性センサー遺伝子 *mcp5* を破壊した遺伝子破壊株 *mcp5* では応答が観察されなかった

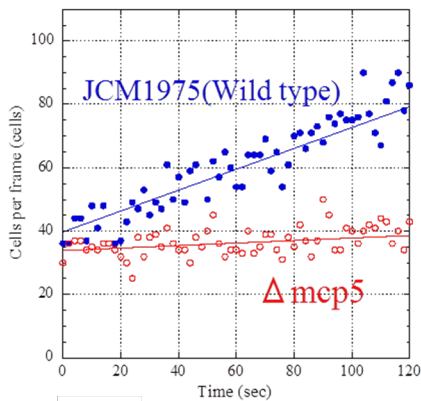


Fig. 2 Chemotactic response of *S. maltophilia* JCM1975 toward 2.0 mM phenol (0.41cells/sec \cdot OD₆₆₀)(Fig.2).

このことから *S. maltophilia* JCM1975 における 12 の推定走化性センサー様遺伝子のうち、*mcp5* はフェノールを感知する唯一の走性センサー遺伝子であることが示唆された。また、*p*-クロロフェノールに対する破壊株 *mcp6* の応答(6.2cells/sec \cdot OD₆₆₀)および二重破壊株 *mcp5,11* の応答(1.0cells/sec \cdot OD₆₆₀)は、野生株のそれ(7.8cells/sec \cdot OD₆₆₀)に比べてそれぞれ 15%、87%減少していた。しかし破壊株 *mcp11* の応答は野生株と同程度(8.0cells/sec \cdot OD₆₆₀)であったことから *p*-クロロフェノールの感知には走性センサー *Mcp5* と *Mcp6* が主に参与していることが考えられた。また *Mcp5* と *Mcp6* のリガンド結合領域

の相同性は類似アミノ酸では 56%と比較的高い。この類似アミノ酸の相同性の高さが両走化性センサーの *p*-クロロフェノール走性に寄与していると考えられる (Table 1)

Table 1 リガンド結合ドメインにおける相同性

	一致アミノ酸 (%)	類似アミノ酸 (%)	相同性
<i>Mcp1, Mcp5</i>	11.7	34.2	低い
<i>Mcp1, Mcp6</i>	13.3	38.3	低い
<i>Mcp5, Mcp6</i>	13.5	56.1	高い

(3)【ハロゲン化フェノール走性に関する走化性センサー遺伝子の同定】 *S. maltophilia* は *p*-クロロフェノールに対して比較的強い走性応答を示し、*mcp5* が主要な走性センサー遺伝子であった。さらに *mcp5* を広宿主域ベクターに挿入した組換えプラスミドを *mcp5* に導入した株では *p*-クロロフェノールに対する走性が復帰したことから、*mcp5* は *p*-クロロフェノールの走性センサー遺伝子であることを確認した。そこで走性センサー遺伝子の多重破壊株について走化性を測定したが *mcp1,8,11* の 3 種の走性センサー遺伝子を破壊しても走性応答は増減しなかったため、これらは *p*-クロロフェノールに対する走性には関与しないことが示唆された。

そこで他のハロゲン化フェノール (*p*-ブromoフェノール, *p*-ヨードフェノール) について走化性を測定したところ、*S. maltophilia* は 1.0mM の *p*-ブromoフェノール及び *p*-ヨードフェノールに対してそれぞれ 13, 16 (cells/sec \cdot OD₆₆₀)と、同濃度の *p*-クロロフェノールよりも強い応答を示したため、それらの走性に関する走化性センサー遺伝子の探索を行った。

p-ブromoフェノール及び *p*-ヨードフェノールに対する単独破壊株の走性応答はそれぞれ 15%(*mcp5, mcp6*)及び 30%(*mcp5, mcp6*)減少したことから少なくとも走性応答に参与することは確認できたが、*p*-クロロフェノ

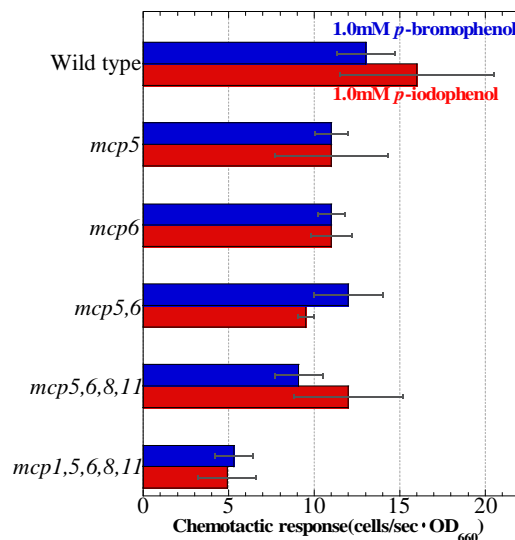


Fig. 3 Chemotactic responses to *p*-bromophenol, *p*-iodophenol of *S. maltophilia* deletion mutants

ールに対する応答における減少率(59%)の半分以下であった(Fig. 3)。このことから両走化性センサーはハロゲンの種類により、応答感度が大きく異なることがわかった。さらに走化性センサー遺伝子の多重破壊株を用いて両化合物に対する走性を測定したところ、 $\Delta mcp1,5,6,8,11$ の応答が $\Delta mcp5,6,8,11$ の応答に比べて *p*-プロモフェノールで 42%、*p*-ヨードフェノールで 59%と大きく減少したことから、*mcp1* がこれらの化合物に対する走性応答の主要なセンサーであると考えられた。さらに Table 1 に示すとおり *Mcp1* のリガンド結合領域と、*Mcp5* 及び *Mcp6* のリガンド結合領域の相同性は、それぞれ 34, 38%(類似アミノ酸)と比較的低いことから、フェノール及び *p*-クロロフェノールをセンシングする *Mcp5*, *Mcp6* と、*p*-プロモフェノール及び *p*-ヨードフェノールをセンシングする *Mcp1* のリガンド結合部位が構造的にも異なっていることが示唆された。ハロゲン化フェノールのクロロ基とプロモ基、ヨード基が異なる走化性センサーにより主にセンシングされるという知見は、将来的にハロゲン選択的な化合物検出システムへの応用における重要な足がかりとなることが期待される。

(4)【多重破壊株の作製とビスフェノール A 走性に関する走化性センサー遺伝子の探索】本研究は、*S. maltophilia* の走化性センサー遺伝子を破壊した変異株を作製し、内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A をセンシングする走化性センサー遺伝子を単離することで、その応答特性を詳細に解析してビスフェノール A の新規検出システム開発への知見を得ることであった。本研究の実施期間において、走化性センサー遺伝子 *mcp1*、*mcp2*、*mcp4*、*mcp5*、*mcp6*、*mcp7*、*mcp8*、*mcp10*、*mcp11* の 9 つの単独遺伝子破壊株の作製に成功した。これらの破壊株を用いてビスフェノール A を含むフェノール類に対する走性を測定していく過程で様々なフェノール類のセンシングに関する走化性センサー遺伝子を同定することに成功した。さらに 1 つの化合物が複数の走化性センサーにより感知される場合には単独の遺伝子破壊株では走性応答が発現してしまうため、多重破壊株を用いた解析を行う必要があった。そのため本研究では、*mcp01*、*mcp02*、*mcp5*、*mcp6*、*mcp08*、*mcp11* を破壊した 6 重破壊株の作製まで成功している。これらの単独、多重破壊株を用いてビスフェノール A に対する走性応答を測定したが、全ての破壊株がビスフェノール A に対して走性応答を示し、現時点でビスフェノール A をセンシングする走性センサー遺伝子の同定には至っていない。しかしながらこの結果より、ビスフェノール A 走性センサー遺伝子が未だ破壊していない 6 つの走性センサー遺伝子に絞り込めたと考えられることができるため、残りの走性センサー遺

伝子の破壊株の作製を行い、ビスフェノール A 走性センサー遺伝子の同定を今後も行っていく予定である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 渡邊祐子, 荷方稔之, 内田智美, 柿井一男, *Stenotrophomonas maltophilia* は一種類の走化性センサーによりフェノールを感知する, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

2. 渡邊祐子, 荷方稔之, 内田智美, 柿井一男, *Stenotrophomonas maltophilia* のフェノール類走性センサーの同定とその解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015 年 10 月 27 日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

3. 内田智美, 渡邊祐子, 荷方稔之, 柿井一男, *Stenotrophomonas maltophilia* の *p*-クロロフェノールに対する走性センサーの同定, 2015 年 10 月 19 日, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ(茨城県土浦市)

4. 渡邊祐子, 荷方稔之, 渡辺大介, 中屋敷凌, 小野寺唯, 柿井一男, *Stenotrophomonas maltophilia* のフェノール類に対する走性及びその測定における高感度化の検討, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学(岡山県岡山市)

5. 荷方稔之, 小野寺唯, 荒谷一典, 柿井一男, *Stenotrophomonas maltophilia* の走化性センサーの同定, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 19 日, 広島国際会議場(広島県広島市)

6. 〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
バクテリアの走化性を利用した環境ホルモンの検出システムの開発
<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab-Nov/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荷方 稔之 (NIKATA Toshiyuki)
宇都宮大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 30272222