

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580128

研究課題名(和文)放線菌群の腐植質代謝に基づく土壤微生物共生構造の新たな理解

研究課題名(英文)Uncovering the soil microbial community structure based on humus-metabolizing activity of actinomycetes

研究代表者

上田 賢志 (UEDA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00277401

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)：放線菌による腐植酸の利用性に着目した探索を実施し、いくつかの自然界分離放線菌に、腐植質を強力に凝集させる活性が存在することを見いだした。いくつかの菌株には腐植酸を脱色する活性が認められた。*S. coelicolor*が示す腐植酸脱色活性を単離精製したところ、ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼと予想される蛋白質が同定された。本酵素は、色素を還元脱色するジアホラーゼ活性を有していることから、細胞膜に局在し腐植質の特定の構造を還元することでエネルギーを生成する全く新しい代謝機能を有している可能性が想起される。同様のジアホラーゼ活性は多くの放線菌の細胞外画分に検出された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at elucidating how the soil-dwelling gram-positive bacteria actinomycetes contributes to the construction of microbial community structure. Some actinomycetes strains exhibited a marked humus-coagulating and decolorizing activity. The isolation of humus-decolorizing activity of *Streptomyces coelicolor* A3(2) showed the possible involvement of a membrane-associating diaphorase. The presence of similar extracytoplasmic diaphorase activity in the diverged actinomycetes strains suggested the wide occurrence of energy metabolism based on the reduction of a humic substance(s). Overall, the evidence suggests that some actinomycetes metabolites widely support the growth and expression of specific functions in other organisms, and that actinomycetes contributes to the construction of a global soil microbial community structure by effectively associating with the formation and dynamics of humus, the substance derived from dead plant that constitutes rich soil environment.

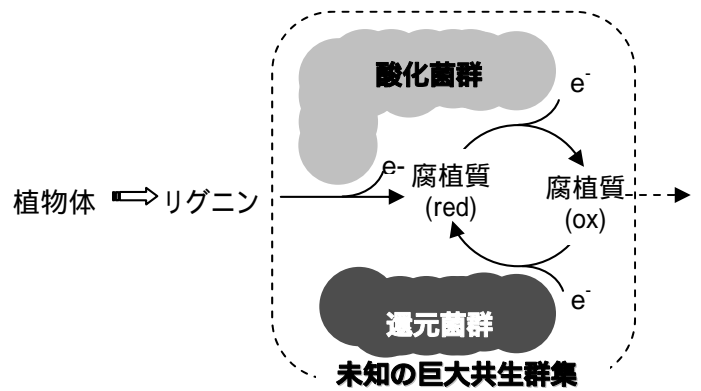
研究分野：応用微生物学

キーワード：Streptomyces humic acid respiration electron transfer differentiation secondary metabolism

## 1. 研究開始当初の背景

多様な生命を育む肥沃な土壌は、主に枯死した植物体の微生物による代謝分解を通じて形成される。木質等の強固な植物体の分解は、白色腐朽菌をはじめとする菌類による高分子リグニンの分解に始まり、低分子リグニンとセルロースを分解・資化する菌類に至るまでの多様な微生物の代謝活性を通じて長い時間をかけて進行する。特に、リグニンとよばれる樹木外皮を形成するポリフェノール類は分解を受けにくく、それに由来する堆積物が腐植質として土壌を構成している。ポリフェノール類の微生物分解は、植物バイオマス利用プロセスにおける律速段階として認識され、分解に関与する菌類とそれが生産するパーオキシダーゼやラッカーゼなどの酸化酵素の諸性質が古くから詳しく研究されてきた。また、菌類による分解活性によって生成する低分子性リグニンの分解を担う細菌についても、その代謝メカニズムの解明を中心に詳しい研究が進められている。

一方、近年では、腐植質が単なる植物体の酸化分解過程の堆積物としてではなく、土壌細菌のエネルギー代謝において広く電子受容体として機能していることが示唆され始めている。微生物燃料電池の開発において有用性が期待されている *Geobacter* ならびに *Shewanella* 属等のグラム陰性土壌細菌は、 $Fe^{3+}$ などを電子供与体に用いた嫌氣的エネルギー代謝において、腐植酸を電子受容体として利用することが明らかになっている (AEM 76:2371, 2010 他)。こうした特性を有する菌類の存在は、土壌を構成する主要有機分子である腐植質が、いわばコンデンサーの役割を果たしており、そこに様々な微生物細胞が電氣的に接続されることで、土壌圏全体が一つの巨大な電気回路として存在している (図) ことを意味していると捉えられつつある。



## 2. 研究の目的

上述のように、土壌微生物群集が腐植質を電子受容体としてグローバルな共生構造を形成していることが示唆されている。本研究では、土壌に広く分布する放線菌群の腐植質代謝に関する全く新しい観察に基づいて、この菌群が腐植質を利用して如何に生存しているかを探求する。

本研究が取り扱う放線菌は、カビに似た糸状性の細胞形態をもつグラム陽性の土壌細菌である。本菌群は、抗生物質をはじめとする様々な生理活性物質の宝庫であり、またカビに似た複雑な形態分化を行うことから、二次代謝と分化の基礎研究モデルとして用いられてきた。特に、生理活性物質の構造的多様性に基づいた生合成研究と、分化の開始を制御する信号伝達の遺伝メカニズムに関する詳しい理解を進める上での研究対象として重要性が認識されてきた。

こうした、いわば生産者としての特質の一方で、腐生性の生物である放線菌群は、環境中では広く分解者としての役割を果たしていると考えられる。実際に、本菌群は多糖類や蛋白質等の高分子の分解に関与する多様な酵素を分泌生産する能力を有している。しかしながら、放線菌群の分解者としての性質はこれまで積極的に調べられてこなかった。特に、腐植質の一つである腐植酸は放線菌の選択分離に極めて有効な培地添加物として知られながら (Actinomycetologica, 3:95, 1989)、それが放線菌によってどのように利

用されているかについては国内外を通じて全く知見が得られていない。

これに対し筆者らは、以前の研究において、それまで菌類にのみ分布すると考えられてきた上記のラッカーゼが放線菌に広く分布していることを初めて明らかにした (Microbiology, 148:1767, 2002; J. Biochem, 133:671, 2003)。さらに、最近の研究において放線菌の呼吸に関する詳しい検討を進めた結果、これまで絶対的な好気性と考えられてきた *Streptomyces* 属細菌が高 O<sub>2</sub> 依存性末端酸化酵素シトクロム bo オキシダーゼを破壊しても増殖できること、ならびに一部の菌に腐植酸を還元的に脱色する酵素活性や腐植酸を凝固させその上に菌糸を増殖させるユニークな活性が認められることを見いだした。これらの予備的な観察を通じて、放線菌群に腐植質を利用した未知のエネルギー獲得様式が潜在し、それが土壌圏における基礎代謝の一つとして作動していることを予想するに至った。

以上の経緯にもとづき、本研究では放線菌の腐植酸代謝に関する次の課題に取り組む。

- (1) 腐植酸に対する各作用のメカニズムと生理的役割：予備的に観察されている腐植質の脱色や凝固に関わる酵素を特定し、その酵素学的諸性質を明らかにする。さらに、遺伝子の破壊や発現解析を通じて、腐植質を利用した生態の本質を分子生物学的に理解する。
- (2) 生態学的検証：上記の腐植酸に対する特異的作用を示す菌を、自然界分離株を対象として広く探索し、それらの系統的多様性を評価することで現象の普遍性を明らかにする。
- (3) 共生系のモデル構築と利用：得られる知見を基に、腐植質を介したモデル共生系を構築する。さらに、生理活性物質の探索や下水処理技術への利用性を検証する。

腐植質を利用した土壌微生物の生育の実態が具体的なメカニズムの理解を通して明らかになることは、微生物共生の問題にこれ

までにないスケールのインパクトを及ぼし、生態学全般にわたりその構造原理に関する理解を深める。さらに、緊急性が益々高まるバイオマス生産と利用の諸技術の開発ならびに環境保全への施策に対し有用な基礎知見をもたらすことが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Streptomyces* 属の好気での増殖特性：

H21-23実施の基盤研究Cにおいて実施した放線菌の末端呼吸系に関する研究によって取得されている各呼吸系のノックアウト株を用いて、放線菌の好気条件 (6% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> など) に於ける増殖の特性を詳細に分析する。その際の培地には土壌中に分布すると考えられる有機物を中心とした様々な基質、特に腐植質と関連のモデル化合物を添加し、それが増殖度や細胞内 ATP 含量ならびに分化・二次代謝に及ぼす効果を検証する。

#### (2) *S. ghanaensis* の腐植酸凝固活性：

これまでの予備的な観察から、腐植酸の脱色と同時に液体培地中に溶解した腐植酸を凝固・析出させ、その上にコロニーを形成する顕著な活性を示すことが明らかになっている *Streptomyces ghanaensis* (ゲノム解読株) について、その脱色活性の本体を検索・同定する。それと同時に、そのユニークな凝固活性に焦点をあてた遺伝的解析を推進する。腐植酸脱色能や気中菌糸形成能等に関する変異株を紫外線処理などによって取得し、それらの凝固活性を調べる。また、*S. griseus* など活性を示さない株を宿主として *S. ghanaensis* の染色体を供与体に用いるショットガンクローニングを行い、凝固活性を示す形質転換体をスクリーニングする。

#### (3) *S. coelicolor* A3(2) の腐植酸脱色活性：

すでに予備的観察によって検出されている遺伝的取り扱いのモデル株 *S. coelicolor* が示す腐植酸の脱色活性について、その活性の本体になっている酵素を精製する。得られた

精製蛋白質の分析からそれをコードする遺伝子を定法により同定する。また、大腸菌などを宿主として当該酵素の組換え体を発現・精製し、同様の活性が認められることを確認する。活性が検出された後は、基質特異性の調査をはじめとする各種反応試験を実施し、酵素学的な特性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Streptomyces* 属の微好気での増殖特性：

以前に取得した*S. coelicolor* A3(2)のシトクロムオキシダーゼのノックアウト株(*ctaCD*破壊株)が親型の株と同等の増殖を示すことにもとづき、低酸素濃度条件における本菌の増殖を観察した。その結果、酸素濃度6%の雰囲気中でも通常大気下と同等の増殖が起こることが確認された。

細胞内ATP濃度を測定した結果、親株に比較して*ctaCD*破壊株のそれが顕著に高いレベルを示すことが判明した。また、銅イオンキレート剤BCDAを添加した条件で増殖させた親株についても同様のATPレベルの上昇が認められた。転写解析の結果、*ctaCD*破壊株ではATP合成酵素オペロンの転写が顕著に増大していた。この現象は、呼吸阻害に応答した恒常性維持の制御メカニズムが転写レベルで作動している可能性を強く示唆していた。

高い細胞内ATP濃度が*ctaCD*破壊株の分化・抗生物質生産能欠損の原因である可能性を検証するために、ATP合成阻害剤の添加効果を検証した。その結果、脱共役剤CCCPの添加によって分化と抗生物質生産が回復する現象が観察された。この結果から、高い細胞内ATP濃度が分化の開始に抑制的な信号として作用している可能性が高まった。また、ATP合成阻害剤の添加によって抗生物質生産性が増強ないし覚醒される可能性が示されたことは、物質探索の手法として有用であると考えられた。

##### (2) *S. ghanaensis* の腐植酸凝固活性：

*S. ghanaensis*が、腐植酸を添加した液体培

地において顕著に腐植酸を凝集・不溶化する現象について、そのメカニズムを解明することを目的として培養上清中に凝集活性を検索した。しかし、様々な条件において検討したにも関わらず、明確な凝集活性を示す画分を取得するには至らなかった。また、細胞破砕液中にも同様の活性を検索したが、顕著な活性を検出することはできなかった。一方、活性検索のもとになる培養体には顕著な腐植酸凝集活性が再現よく認められた。これらのことから、ここで観察されている腐植酸の凝集・不溶化の現象は、*S. ghanaensis*の細胞が活着している状態ではじめて引き起こされるものと推測された。しかし、その具体的なメカニズムについては情報が得られていない。

上述の活性検索とは独立に、遺伝学的な検討を行う目的で、*S. ghanaensis*の変異体をスクリーニングした。紫外線照射によって変異を誘発したところ、高い頻度で気中菌糸形成能を失った分化欠損変異株が取得された。これらの変異株について腐植酸凝集活性を検証したところ、いずれも活性を示さないことが判明した。このことから、本菌が保有する腐植酸凝集に関わる機能の発現は、基底菌糸から気中菌糸への細胞分化を開始する信号伝達と共通の制御を受けており、上記で得られた変異株はいずれもその信号伝達系が機能しなくなっているものと推測された。この結果から、*S. ghanaensis*の腐植酸凝集活性は、この菌の複雑な細胞分化を伴う生活環プログラムに組み込まれた特異的なメカニズムによって起きているものであることが示唆された。

さらに、*S. ghanaensis*と同様の腐植酸凝集活性を示す放線菌を自然界分離株の中に検索した。その結果、およそ20株の陽性株が取得された。そのうち、特に活性の顕著な株について16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行ったところ、*Streptomyces flaveolus*に属することが判明した。走査型電子顕微鏡による観察の結果、本菌は*S. ghanaensis*同様に胞

子の表層に毛状構造物が認められた。

### (3) *S. coelicolor* A3(2)の腐植酸脱色活性：

*S. coelicolor*の培養上清中に微弱に認められた腐植酸を脱色する酵素活性について単離精製を行った。その結果、ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ（ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のE3サブユニット）と予想されるSC02180産物が得られた。本酵素は、単独で色素化合物を還元脱色するジアホラーゼ活性とよばれる活性を有することが知られている。そこで、大腸菌を用いて本酵素の組み換え体を調製したところ、青色色素DCIPに対するNADH依存的な還元活性が認められた。一方、腐植酸に対する脱色活性は認められなかった。

次に、DCIPならびにNBTに対する還元活性を指標にして*S. coelicolor*の培養上清から改めて蛋白質の精製を行った。

Bennet's-maltose培地で96時間培養後の*S. coelicolor*の培養上清には、 $0.071 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ のDCIP還元活性、および、 $0.0025 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ のNBT還元活性が認められた。NBTの還元活性を指標として本培養上清からの酵素精製を行った結果、硫酸分画と4ステップのカラムクロマトグラフィーで、2Lの培地から最終的に0.16 mgのSC02180が精製された。一方、DCIPを指標として同様な精製を行ったところ、SC02180のホモログであるSC04919が、フルクトース二リン酸アルドラーゼ（SC03649）とおよそ1:1の混合物として粗精製された（合計0.46 mg）。

上記の2種の酵素の基質特異性を検討した結果、前者はリポアミドに比較的高い還元活性（ $2.31 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ）を示したのに対し、SC04919は本基質にほとんど作用しないことが明らかとなった。これらの結果は、本菌が少なくとも2種類のジアホラーゼを菌体外に産生することを実証するとともに、SC04919が一般的なリポアミドデヒドロゲナーゼとは異なる機能を有することを示唆していた。

得られた2種のジアホラーゼは、DCIPとNBT

以外のフェノールやキノン化合物に対してもNADH依存的な還元活性を示した。また、意外なことに、*S. coelicolor*の培養上清中にNADHが検出された。これらの事実から、*S. coelicolor*が細胞外に生産するジアホラーゼは、NADH依存的に腐植酸中に含まれるフェノール・キノン構造をターゲットにした還元反応を触媒し、腐植質を電子受容体を利用したエネルギー代謝システムを構築している可能性が考えられた。

### まとめと今後の展望

本研究では、これまでの独創的な予備観察に基づいて、土壌の分解者である放線菌の腐植質との相互作用を多角的に検証した。その結果として認められた現象と機能は、腐植質が単なるエネルギー代謝の基質として以外にこの菌群の生理にとって重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。特に、フェノールないしキノン化合物を還元する複数のジアホラーゼ活性が*S. coelicolor* A3(2)の細胞外画分に見いだされたことは、本菌ならびに関連の菌群が、未知の代謝活動を土壌中でくり広げている可能性を想起させる。そうした放線菌の実態を解明することは、微生物生態系の新たな理解を進めると同時に、生理活性物質の一大資源としての本菌の潜在力をより明確かつ具体的に示すものとして期待される。

### 5. 主な発表論文等

#### 【雑誌論文】(計3件)

Takano H, Hagiwara K, Ueda K.

Fundamental role of cobalamin biosynthesis in the developmental growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl Microbiol Biotechnol*. 査読有, 2015. 99:2329-2337.

Yamada S, Miyagawa TA, Yamada R, Shiratori-Takano H, Sayo N, Saito T,

Takano H, Beppu T, Ueda K.  
Amide-transforming activity of  
*Streptomyces*: possible application to the  
formation of hydroxy amides and  
aminoalcohols. Appl Microbiol  
Biotechnol. 査読有, 2013. 97:6223-6230.

Eto D, Watanabe K, Saeki H, Oinuma K,  
Otani K, Nobukuni M, Shiratori-Takano H,  
Takano H, Beppu T, Ueda K. Divergent  
effects of desferrioxamine on bacterial  
growth and characteristics. J Antibiot.  
査読有, 2013. 66:199-203.

#### 【学会発表】(計 7 件)

老沼研一、進藤大騎、高野英晃、高谷直  
樹、上田賢志. *Streptomyces* 属放線菌が産出  
する菌体外ジアホラーゼの解析. 日本農芸化  
学会 2015 年度大会. 岡山大学津島キャンパス.  
2015/3/29.

Kenji Ueda. ATP synthesis inhibitor at  
subinhibitory concentration. Natural  
Product Discovery & Development in The  
Post Genomic Era. The Westin San Diego  
Gaslamp Quarter. San Diego, CA USA.  
2015/1/14. (招待講演)

Masahiro Fujimoto, Masato Chijiwa,  
Teruhiko Beppu, Hideaki Takano, and  
Kenji Ueda. The Connection between  
Energy Metabolism and Development in  
*Streptomyces*XVII. International  
Symposium on The Biology of  
Actinomycetes, Pine Bay Holiday Resort  
Kusadasi, Aydin, Turkey. 2014/10/8-12.

Kenji Ueda. Developmental Defects of  
*Streptomyces coelicolor* Respiratory  
Mutants. 2013 International Meeting of  
The Microbiological Society of Korea.  
Chonbuk National University, Jeonju-si,  
Jeollabuk-do, Korea. 2013/5/3. (招待講演)

藤本正浩, 高野英晃, 上田賢志. ストレプ  
トミセス属放線菌のエネルギー代謝と分化

の連携. 日本農芸化学会 2013 年度大会. 東北  
大学川内北キャンパス. 2013/3/26.

藤本正浩, 高野英晃, 上田賢志. 末端呼吸  
系の破壊が引き起こす ATP の異常蓄積と分  
化の抑制. 日本放線菌学会 2012 年度大会. 府  
中の森芸術劇場(東京・府中市). 2012/9/6-7.

上田賢志. 新しいバイオマス利用法の開  
発に向けた放線菌群の共生的相互作用に関  
する研究. 公益法人発酵研究所第 6 回助成研  
究報告会. 千里ライフサイエンスセンター.  
2012/6/7.

#### 【図書】(計 0 件)

#### 【産業財産権】

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

上田 賢志 (UEDA, Kenji)

日本大学. 生物資源科学部・准教授

研究者番号 : 0 0 2 7 7 4 0 1

##### (2)研究分担者

高野 英晃 (TAKANO, Hideaki)

日本大学. 生物資源科学部・助教

研究者番号 : 5 0 3 8 5 9 9 4

##### (3)連携研究者

該当なし