

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292206

研究課題名(和文)芳香族系汚染物質添加環境での微生物集団応答様式の包括的研究

研究課題名(英文) Behavior of microbial community in the environment polluted by aromatic compound

研究代表者

津田 雅孝 (Tsuda, Masataka)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90172022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境に放出された有害化学物質の分解・浄化に当該環境棲息細菌集団が大きな役割を果たすが、本環境でどのような細菌株やその集団が分解の主たる役割を如何に果たすかの解明をめざした。フェナントレン分解細菌集団の解析で、集団中の細菌株の当該物質分解は共存する他の非分解細菌株が有する2つの機構で増強された。また、環境棲細菌集団を同一滅菌環境に移植した際に、独立試料間で類似性が極めて高い菌叢遷移様式を示したことから、自然環境での細菌集団による有害物質分解様式を明示できる方法論が確立した。

研究成果の概要(英文)： Environmental microbial communities play very important roles in the bioremediation of chemical pollutants. Analysis of a phenanthrene-degrading bacterial consortium in this study showed that such degradation ability of a strain is enhanced by other co-residing and non-degrading strains through two types of mechanisms. Furthermore, transplantation of bacterial community to independent and sterilized environmental samples resulted in very similar time-course changes in the community compositions, indicating the validity of such transplantation to obtain reproducible information on bacterial degradation of chemical pollutants in natural environments.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境汚染物質分解 細菌 細菌集団 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

環境に放出された各種汚染化学物質の浄化には、当該環境棲息細菌やその集団の備える浄化機能が極めて重要な役割を果たすことから、この機能を用いた環境浄化が期待されている。しかし、(a)環境棲息細菌の99%以上は既存手法で培養困難である、(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、実験室系と複合生物系の自然環境とでは明瞭に異なる、(c)汚染環境での「少数派細菌」が汚染物質分解の中核を果たす場合が希でない、という報告を鑑みると、汚染環境で、実際にどのような細菌集団やその分解酵素遺伝子群が分解の主たる役割を如何に担うかの本質的な点は甚だ不明である。我々は、閉鎖系にした特定土壌に3-ククロ安息香酸(3CB)やフェナントレンを含む4種有害芳香族化合物で人工的に汚染化した後、当該土壌(以下、複合汚染土壌と記載)から回収したメタゲノムを用いて、細菌集団の菌叢と遺伝子プールの半年間にわたる経時的変動を解析してきた。そして、当該複合汚染土壌での、(a)汚染後に直ちに分解される3CBの代謝には *Burkholderia* 属細菌が関与、(b)汚染後の3週目以降に分解が始まるフェナントレンの分解には、常に集団内で1%以下であった *Mycobacterium* 属細菌が分解前半過程を、そして、本属と進化系統的にかけ離れた *Burkholderia* 属細菌が後半過程を司るという「協調代謝」の関与、が強く示唆された。このような我々の閉鎖系汚染土壌では有害化合物添加以外で一定環境条件を一定に保っていたものの、菌叢や遺伝子プールの経時的変動に関する再現性の検討は追求できないままであった。一方、汚染前の上記土壌の滅菌試料に、本土壌由来細菌集団を接種後に3CBのみを添加した予備的研究の結果では、複合汚染土壌での3CB代謝への *Burkholderia* 属細菌の関与を支持できたが、この複合汚染土壌でのフェナントレン分解への *Mycobacterium* 属以外の細菌の関与の更なる検討は未着手であった。

2. 研究の目的

我々自身の上記のような研究開始当初の背景を踏まえ、本研究では、以下の点の解明を目的とした。

(1) 我々の従来研究では、閉鎖系にした土壌を4種の有害化合物で同時汚染化した試料を対象にしてきたが、このような試料での棲息細菌集団の応答様式は極めて複雑さを伴うと想定された。そこで、本研究ではフェナントレンのみを炭素源とした人工合成無機最小液体培地に上記土壌由来で従来から一貫使用してきた細菌集団を接種し、その後の複数時点での細菌集団の菌叢組成の解析、そして、フェナントレン完全分解菌株と非分解菌株の各々の単離・解析をめざした。さらに、分解菌株分解能に対して共存する非分解菌株の役割解明をめざした。

(2) 滅菌化した一貫使用土壌に本土壌由来細菌集団を「移植」し、その後3CBを添加した実験を本研究開始以前に行っていた。このように細菌集団を滅菌化土壌に移植した閉鎖系の実験において、各環境因子を変動させた場合に細菌集団が再現性良く同じような応答を示せば、環境因子と細菌集団やその構成細菌との相互作用が今までの研究に比べて格段に明示可能になると期待された。ただ、3CB添加を伴った先行移植実験では、移植後の菌叢安定化細胞集団の使用を考慮しておらず、また、菌叢変動様式の再現性も不明であった。そこで、本研究では、滅菌土壌へ移植後のどの程度の期間で菌叢が安定化するのか、安定化した菌叢は接種集団の菌叢とどれくらいの相違を示すのか、そして、複数滅菌土壌に集団を移植すると互いの安定化菌叢は相違を示すのか、という点の解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) 土壌細菌集団からのフェナントレン分解コンソーシアムや完全分解菌株は、本化合物を唯一炭素源とする液体最小培地で集積後に、寒天末を添加した当該培地を用いて分離した。*Burkholderia* 属細菌株の単離には、本属株の準選択培地であるPCAT培地を用いた。

(2) フェナントレン分解菌株単独試料、本株に非分解菌株を共存させた試料、そして、コンソーシアム試料でのフェナントレン分解能は、当該化合物を唯一炭素源とする液体最小培地で培養し、フェナントレン残存量を適時GC-MSで測定することで計測した。

(3) 分解菌株のフェナントレン存在下での生育阻害、そして、非分解菌株共存下での分解菌株生育阻害の緩和は、分解菌株試料のみ、そして、両株を任意の濃度で混合した試料に関して、フェナントレン添加と非添加の最小寒天培地でのコロニー形成能を検討することで実施した。

(4) 本研究で単離した細菌株のゲノム断片配列は、Illumina社とRoche社のシーケンサーを並行使用、または前社シーケンサーのみを使用して決定し、さらなる完全ゲノム配列決定には、我々が作成したGenoFinisher等のプログラムを用いた。ゲノムのアノテーションはNCBIのパイプラインPGAPで行った。

(5) 細菌集団の菌叢解析は、集団メタゲノムDNAを鋳型とし、その16S rRNA遺伝子を我々自身が設計したプライマー対を用いてPCR増幅した後、Illumina社シーケンサーで増幅遺伝子断片の塩基配列を解読、さらに本配列をRDPデータベースと照合することで実施した。

(6) 非汚染土壌をガンマ線滅菌後に、複数の閉鎖系ポットに入れた。各ポットに土壌由来細菌集団を接種し、一定の物理的環境にて長期間「培養」した。そして経時的にポットから一部土壌試料を回収し、そのメタゲノムを用いて菌叢解析に用いた。

4. 研究成果

(1) フェナントレン分解コンソーシアムの分離と解析

閉鎖系複合汚染土壌を用いた我々の従来研究で、本土壌から細菌集団を回収していた。4種汚染物質のうちフェナントレンのみを炭素源とした無機最小液体培地に当該細菌集団を接種して集積培養したのちに同寒天添加培地で白色透明と黄色不透明の2つに大別可能な単集落を独立に多数得た。これら単集落の多くは、通常集積培養の場合と異なり、複数属細菌から構成されるフェナントレン分解コンソーシアムであった。以降の研究では、白色透明と黄色不透明の各コンソーシア(各々MixBP1とMixEPa4と命名)に関して更なる解析を実施した。

MixEPa4の解析

当該コンソーシアムから、単独でフェナントレン完全分解可能な *Mycobacterium* 属 EPa45 株を単離した。ナフタレンやビフェニルという他の多環芳香族化合物分解能も有していた本株の 6.2 Mb ゲノム配列を完全決定することで、フェナントレン完全分解経路を推定した。また、*Mycobacterium* 属以外の MixEPa4 主要構成 4 属に分類されて、フェナントレン非分解能の各属細菌株を MixEPa4 から単離し、このうちの *Burkholderia* 属 Bcrs1W 株の 9.3 Mb ゲノム配列も完全決定した。MixEPa4 の更なるフェナントレン液体培地での集積培養過程では、本化合物分解過程に依存することなく菌叢構成は安定で、また、完全分解 *Mycobacterium* 細菌の割合は 10% 以下であり続けた。このような菌叢変動様式から、完全分解菌分解能の効率的発揮には共存する非分解菌が関与すると示唆された。

そこで、Epa45 株と Bcrs1W 株の共培養実験を行ったところ、(a) EPa45 株単独では分解基質であるフェナントレンにより生育阻害を受けること、(b) Bcrs1W 株は EPa45 株の当該生育阻害を緩和させる効果[Suppression of Growth Inhibition (SGI)効果]を有すること、そして、(c) Bcrs1W 株は EPa45 株のフェナントレン分解能を促進する効果[Acceleration of Degradation by Non-degrader (ADN)効果]を有すること、が判明した。さらに、Bcrs1W 株の SGI 効果発揮には、その死細胞や培養液上清分画、細胞質分画は無効であり、生細胞の EPa45 株との直接的接触が必要であった。MixEPa4 由来で Bcrs1W 株以外の他 3 種非分解株も EPa45 株に対して程度の差こそあれ SGI と ADN の両効果を示したが、検討に用いた各非分解株の示す SGI と ADN の効果の強さには相関性がなかった。このことから、SGI と ADN の各効果には別個の分子機構が関与していると強く示唆された。一方、非分解 4 株のうちで Bcrs1W 株が最も強い SGI 効果を示したが、本研究対象土壌以外から単離されていた数種の *Burkholderia* 属細菌株も Bcrs1W 株と同程度の SGI 効果を示すととも

に大腸菌もある程度の SGI 効果を備えていた。なお、EPa45 株は、本株が分解可能なナフタレンやビフェニル存在下で生育阻害を受けたが、Bcrs1W 株は両化合物に対しても SGI 効果を示した。また、本研究対象土壌以外から単離されていた別のフェナントレン完全分解 *Mycobacterium* 属 PYR-1 株でも EPa45 株と同様にフェナントレンによる生育阻害と Bcrs1W 株による SGI 効果が認められたため、フェナントレン分解能を備えた *Mycobacterium* 属細菌のフェナントレンによる生育阻害と *Burkholderia* 株による SGI 効果の普遍性が強く示唆された。

MixBP1の解析

別のフェナントレン分解コンソーシアム MixBP1 の更なる液体集積培養により、フェナントレン完全分解 *Burkholderia* 属株 HB-1 を分離した。そして、本株は MixBP1 での主要フェナントレン分解菌株で、集積時の本化合物分解に伴って優占化した。また、7.2 Mb の本株ゲノム配列を完全決定することで、本株では EPa45 株とは異なるフェナントレン分解酵素遺伝子群がゲノミックアイランド様構造を持つ DNA 上に存在した。一方、HB-1 株はフェナントレンによる生育阻害現象を示さなかった。

以上の 2 種コンソーシアムの解析により、生育速度が遅くフェナントレン分解能が相対的に「弱い」*Mycobacterium* に代表される細菌株においては、様々な非分解細菌株共存下での当該物質分解能が SGI と ADN の両効果またはいずれかの効果を介して増強されることが判明した。複合微生物系である自然環境では生育速度が遅く分解能が弱い細菌株が有害化学物質分解の主役を担っている報告例が希でなく、本研究成果で、このような「弱い」分解細菌株が自然環境で「主役」として効率的分解を可能にしている共存非細菌株の積極的役割を提示できた。

(2) 滅菌土壌に「移植」した細菌集団における菌叢変動

滅菌化した非汚染の一貫使用土壌を複数に分けた閉鎖系環境をつくり、各滅菌土壌に一貫使用土壌細菌集団を移植後、一定環境条件で 2 年ほど「培養」したが、移植後の適当な時期に集団を回収して菌叢解析を実施した。移植直後の 1 週間以内に実験室系での生育速度が早いことが知られている *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門が 50% 以上と急激に優占化し、両者の割合はその後徐々に減少した。一方、移植細菌集団では 35% 程度で難培養株がほとんどである *Acidobacteria* 門や *TM7* 等は移植直後に 1% 以下へと減少したのち、約半年から一年をかけて移植直前の割合に概ね戻った。そして、移植後の半年以降の 1 年半の間は菌叢が安定していた。このような時間経過に伴う菌叢の復元様式と復元後の安定化は属レベルでも認められた。さらに、こ

のような菌叢の変動・復元・安定化の様式は、複数の並列な滅菌土壌試料間で類似性が極めて高かった。

以上の「移植」実験での成果により、土壤細菌集団は他生物が存在しない同一土壤環境で元の構成に回帰するという「resilience (レジリエンス)」性を備えており、さらに、determinative (確定的)に「回帰」が起きることを明らかにした。複数滅菌土壌試料間での菌叢推移の高い類似性の発見は、今後の研究において、様々な土壤環境と細菌集団の相互作用、そして、細菌集団の機能発揮に対する土壤環境要因の特定化を、高い再現性を備えつつ実施できる基盤知見となった。

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25件)すべて査読あり

Ohtsubo Y, Nonoyama S, Ogawa N, Kato H, Nagata Y, Tsuda M: Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp. EPa45. *J. Biotechnol.* 228: 67-68. (2016) doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.042

Anda M, Ohtsubo, Okubo T, Sugawara M, Nagata Y, Tsuda M, Minamisawa K, Mitsui H: Bacterial clade with the ribosomal RNA operon on a small plasmid rather than the chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: 14343-14347. (2015) doi: 10.1073/pnas.1514326112

Kato H, 8人, Ohtsubo Y, Nagata Y, Hattori M, Fujiyama A, Kurokawa K, Tsuda M: Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res.* 22: 413-424. (2015) doi: 10.1093/dnares/dsv023

加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝: メタゲノム情報を基盤とした土壤細菌コミュニティの解析. *日本微生物生態学会誌* 30: 57-64. (2015)

http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA11551577/ISS0000513711_ja.html

Ohtsubo Y, Moriya A, Kato H, Ogawa N, Nagata Y, Tsuda M: Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738). *Genome Announc.* 3: e01283-15. (2015) doi: 10.1128/genomeA.01287-15

Kojima H, 6人, Kurokawa K, Hayashi T, Fukui M: Ecophysiology of *Thioplaca ingrica* as revealed by the complete genome sequence supplemented with proteomic evidence. *ISME J.* 9: 1166-1176. (2015) doi: 10.1038/ismej.2014.209

Kato H, Ogawa N, Ohtsubo Y, 3人, Nagata Y,

Kurokawa K, 2人, Tsuda M: Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPa45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. *Genome Announc.* 3: e00782-15. (2015) doi: 10.1128/genomeA.00782-15

Nagayama H, Sugawara T, Endo R, Ono A, Kato H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M: Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 4453-4470. (2015) doi: 10.1007/s00253-014-6322-2

Hori K, 47人, Kurokawa K, Ohta H: *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. (2014) *Nat. Commun.* 5: 3978. doi: 10.1038/ncomms4978

Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K: Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. *DNA Res.* 21: 217-227. (2014) doi: 10.1093/dnares/dst052

Nagata Y, Senbongi J, Ishibashi Y, Sudo R, Miyakoshi M, Ohtsubo Y, Tsuda M: Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 160: 883-891. (2014) doi: 10.1099/mic.0.077057-0

Inoue K, Miyazaki R, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M: Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* nitrogen-related phosphotransferase system on conjugative transfer of IncP-9 plasmid from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 345: 102-109. (2013) doi: 10.1111/1574-6968.12188

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.* 13: 51-56. (2013) http://www.jseb.jp/jeb_main_all.html

[学会発表](計40件)

加藤広海, 森宙史, 永山浩史, 大坪嘉行, 永田裕二, 黒川顕, 津田雅孝: 土壤微生物のノトバイオロジー. 日本農芸化学会2016年度大会. 2016年3月27-30日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: フェナントレン分解コンソシアムに存在する非分解菌の分解菌に

対する効果. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 27-30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

守屋梓, 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: フェナントレン分解コンソーシアム MixEPa4 における構成細菌間の相互作用. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 27-30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

大坪嘉行, 加藤広海, 永田裕二, 津田雅孝: 土壌細菌叢変動とレジームシフト. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

永田裕二, 大坪嘉行, 津田雅孝: 環境を汚染する難分解性農薬分解遺伝子群の水平伝播. 第 30 回日本微生物生態学会年次大会. 2015 年 10 月 17-20 日, 土浦亀城プラザ(茨城県土浦市)

按田瑞恵, 大坪嘉行, 大久保卓, 菅原雅之, 永田裕二, 津田雅孝, 南澤究, 三井久幸: リボソームRNA遺伝子の染色体外への移行. 日本遺伝学会第87回大会. 2015年9月24-26日, 東北大学(宮城県仙台市)

大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: GenomeMatcherのアノテーション支援機能. 日本農芸化学会2015年大会. 2015年3月26-29日, 岡山大学(岡山県岡山市)

Tsuda, M: Response of microbial community to chemical pollutants. International Symposium of Research Center for Thermo-tolerant Microbial Resources, Yamaguchi University, March 9, 2015. Yamaguchi University (Yamaguchi)

Mori H, Maruyama T, Yano M, Yamada T, Kurokawa K: VITCOMIC2 analysis system: visualization tool for taxonomic composition of microbial communities. International Symposium on Genome Science 2015. January 20-21, 2015. Hitotsubashi-Hall (Tokyo)

Tsuda M, Kato H, Mori H, Maruyama F, Toyoda A, Ogura Y, Hayashi T, Fujiyama A, Kurokawa K: Transplantation of soil microbiota: establishment process of microbial community in sterilized soil. International Symposium on Genome Science 2015. January 20-21, 2015. Hitotsubashi-Hall (Tokyo)

Kishida K, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M: Host range of conjugation system encoded by naphthalene-catabolic plasmid NAH7 from *Pseudomonas putida*. International Symposium of the International Society for Plasmid Biology Scientific Meeting 2014, Oct. 27- Nov. 1, 2014. Palm Cove, Australia

森宙史, 藤澤貴智, 千葉啓, 山本希, 鈴木真也, 菅原秀明, 内山郁夫, 中村保一, 黒川顕: 微生物統合データベース「MicrobeDB.jp」環境微生物系学会合同大会2014. 2014年10月21-24日. アクトシティ

浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

加藤広海, 森宙史, 丸山史人, 永山浩史, 大坪嘉行, 永田裕二, 黒川顕, 津田雅孝: 土壌における微生物コミュニティの形成過程. 2014年10月21-24日. アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

Nagayama H, Sugawara T, Endo R, Kato H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Mori H, Kurokawa K, Tsuda M: Isolation of phenol-catabolic genes by cultivation-independent functional screening from metagenome of soil artificially polluted by aromatic hydrocarbons. 2nd Thünen Symposium on Soil Metagenomics. December 11-13, 2013. Braunschweig, Germany

Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K: Design and experimental validation of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. 2nd Thünen Symposium on Soil Metagenomics. December 11-13, 2013. Braunschweig, Germany

[図書] (計 6 件)

Tsuda M, Ohtsubo Y, Yano H: Mobile catabolic genetic elements in pseudomonads. *In: Nojiri, H., Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (eds), Biodegradative Bacteria*. 358 pages in total. Springer Verlag, Tokyo, pp 83-103. (2014) ISBN 978-4-431-54519-4.

Ohtsubo, Y, Nishiyama E, Ishibashi Y, Nagata Y, Tsuda M: Strategies to reveal genomic function in natural soil systems. *In: Nojiri, H., Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (eds), Biodegradative Bacteria*. 358 pages in total. Springer Verlag, Tokyo, pp 279-291. (2014) ISBN 978-4-431-54519-4

[その他]

自作の使用プログラムのホームページ
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/labhome/tool.html>

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 : 9 0 1 7 2 0 2 2

(2)研究分担者

黒川 顕 (KUROKAWA, Ken)
東京工業大学・地球生命研究所・教授
研究者番号 : 2 0 3 4 3 2 4 6

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：3 0 2 3 7 5 3 1

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：4 0 3 4 2 7 6 1