

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580070

研究課題名(和文) 土壌細菌のカタボライト調節機構全容の解明

研究課題名(英文) Revealing catabolite-control mechanisms of soil bacteria

研究代表者

大坪 嘉行 (YOSHIYUKI OHTSUBO)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：40342761

研究成果の概要(和文)：二種のお互いに近縁の土壌細菌を対象としてカタボライト調節メカニズムの解明を目的に研究を行った。その結果、抑制炭素源の存在が認識されるには抑制炭素源が細胞内である程度代謝される必要があることを示す結果を得た。また PTS システムがカタボライト調節に関与することを示す結果を得るとともに、二成分調節系の BphPQ に関して、BphQ が標的プロモーターを活性化するには BphP が必要であること、また、BphP の C 末端ドメインには構成的な BphQ 活性化能があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of the catabolite control were investigated using two soil bacteria. Sensing by the bacteria of the repressive-carbon sources were achieved after the repressive-carbon sources were metabolized. The evidences that PTS systems might play a role in the catabolite control were obtained. It was also found that BphQ-mediated promoter activation required BphP, and the C-terminal domain of BphP had an activity to activate BphQ even in the presence of the repressive carbon sources.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：微生物学、微生物遺伝学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：カタボライト調節、土壌細菌、有機酸

1. 研究開始当初の背景

微生物の遺伝子の発現に影響を与える細胞システムの一つとしてカタボライト調節メカニズムがある。多くの細菌細胞は、その炭素源資化におけるヒエラルキーを保有しており、例えばグルコースなどの特定の炭素源を優先的に資化するカタボライト調節メカニズムを備えている。カタボライト調節メカニズムは大腸菌や枯草菌などのモデル微生物における研究が先行しておりその

メカニズムが遺伝学的、分子生物学的に解明されている。その一方で土壌細菌について、抑制炭素源の存在が感知されて遺伝子発現パターンへと反映させるメカニズムは明らかになっていない。土壌細菌のカタボライト調節メカニズムを明らかにすることで、人為起源の難分解性の化合物を効率良く分解する上での有益な知見が得られるものと期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、PCB 分解能を持つ土壌環境細菌 KKS102 株および様々な炭素源に対する資化能を有する *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株が抑制炭素源の存在を感知して、カタボライト調節されるプロモーターの活性が低く抑えられるまでの個々の過程を解明することで、そのシステムの全体構成を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

カタボライト調節メカニズムを以下の3つの過程に分解し、その各過程についてその詳細の解明を行う。すなわち(1) 基質の存在を感知する過程、(2) 感知した情報が何らかの形に変換されて伝達される過程、(3) 2を受けて二成分調節系のレスポンスレギュレーター **BphQ** の転写活性化能が調節される過程、である。(1)については、KKS102 株および ATCC 17616 株について抑制炭素源となる基質について明らかとする。また ATCC 17616 で既に株抑制炭素源であることが明らかになっているグルコースについて、ペリプラズム空間内でのピロロキノリンキノン依存的グルコースデヒドロゲナーゼの活性がグルコースの感知に関与していると推測し、当酵素遺伝子の破壊株を作製し解析を行う。またグルコースの代謝に関わると推測される各種の遺伝子を ATCC 17616 のゲノム情報より見だし、破壊株を作製して解析する。(2)についてはすでに得られていた抑制炭素源が存在してもカタボライト調節が起こらないトランスポゾン変異株の解析を行う。また情報を介在することが推測される PTS システムを構成するタンパク質の遺伝子について遺伝学的解析を行う。(3)については **BphQ** の遺伝子と隣り合って存在する **bphP** 遺伝子にコードされるセンサーカイネース **BphP** が **BphQ** の活性調節に関与していることが推測されていたが、KKS102 株において **BphP** が存在しなくてもカタボライト調節が見られるなどしたために、**BphP** がカタボライト調節に関与しているかについて明らかではなかった。そこで **BphP** がカタボライト調節に関与するかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) KKS102 株でカタボライト調節されることが既知の PCB 分解オペロンの pE プロモーターの活性を、*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 において GFP をレポーターとして容易に定量可能な系を構築した。グルコース代謝系およびガラクトース代謝系の各種遺伝子の破壊株を作製し、このレポーター系を利用してカタボライト調節への影響を検討した。その結果、ATCC 17616 株の抑制炭素源は、グルコースおよびガラクトースであること、

またグルコースの代謝によって生じると推定される、グルコン酸、グルコース 6 リン酸、2-デヒドログルコン酸、6-ホスフォグルコン酸、が抑制能を持つことを見いだした。またホスフォグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子の破壊株で、グルコン酸およびホスフォグルコン酸による抑制が相当緩和されること、ガラクトン酸デヒドラターゼ遺伝子の破壊株でガラクトースによる抑制が緩和されることを見いだした。これらの結果から、グルコースやガラクトースそのものではなくこれらがある程度細胞内で代謝されることで抑制のシグナルが生じていることが示唆された。また、ATCC 17616 株はグルコースを構成糖とするトレハロースおよびセロビオースを単一炭素源として生育が可能であった。しかしこれらの糖を単一炭素源としたときの生育は、グルコースを炭素源としたときの生育と比較して遅く、またこれらの二糖は抑制炭素源ではなかった。すなわちカタボライト調節は、グルコースやガラクトースの存在そのものによって引き起こされるのではなく、生育基質が一定以上効率良く代謝されることにより生じる代謝産物が必要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) ATCC 17616 株の PTS システム関連の遺伝子について破壊株を網羅的に作製し、これらがカタボライト調節に関与するかどうかについて解析を行った。本株にはそのゲノム情報から2つの PTS システムが存在することが推測されたがこの両方を同時に破壊した株において、pE プロモーターはほぼ野生型株と同等のカタボライト調節を受けることが示された。この二重破壊株に、PTS システムの個々の構成要素をコードする遺伝子を導入すると、pE 活性は大きな影響を受け、導入した遺伝子によって異なるが強く抑制されるか、あるいは強く活性化された。また、2つの PTS システムの構成因子の破壊株のうち3株は、広範な炭素源の資化能を失った。そのような炭素源は **BphQ** の発現レベルを抑制した株が資化能を失う炭素源と一致することが見いだされ、PTS システムと **BphQ** の間には機能的に強く関連することが見いだされた。また PTS システムを2つとも破壊した株においても、グルコース存在下では pE 活性は低下した。このことから、グルコースの存在を感知するメカニズムは PTS システムとは別に存在し機能していること、PTS システムは pE 活性に強い影響を与える一方で、2つの PTS システム全体としては中立であることが推測された。

(3) これまで KKS102 株由来の **bphPQ** 破壊株を用いた解析により、**bphP** 遺伝子が欠失していても通常と同程度のカタボライト調節がみられることが観察されていることから、**BphP**

が BphQ の活性調節に関与しているかどうかについて明らかでなかった。理由として KKS102 株に BphP に代わる何らかの因子が存在していることが推測されたため、KKS 株とは系統的に離れた *Pseudomonas putida* KT2440 株を宿主とした解析系を構築した。その結果、KT2440 株に bphQ のみを導入しても pE 活性はほとんど検出されないが、bphP を同時に導入することでプロモーター活性が有意に上昇することが確認された。すなわち BphQ を BphP が活性化できることが示された。また BphP の C 末端領域に存在する推定カイネースドメイン (BphPc) を導入した場合には強い pE 活性が観察され、このドメインが BphQ の活性化に重要であることが示された。BphPc を KKS1012 株に導入したところ、炭素源の存在の有無によらず高い PE プロモーター活性を示した。このことから、BphPc が BphQ を活性化するのに重要なドメインであること、また BphP のそれ以外のドメインは BphPc による BphQ 活性化を抑制する方向に働くことが推測された。グルコースなどの抑制炭素源がある程度代謝されて生じる代謝産物が、この抑制を増強する可能性がある。あわせて BphPc および BphQ の精製系を構築した。

(4) 全ゲノム情報を利用してカタボライト調節について解明するため、Roche 社の 454 FLX シーケンサーを用いておよそ 190 Mb のリードデータを得て、アセンブリングを行い KKS102 株のドラフトゲノム配列を得た。また得られた配列から、カタボライト調節に関与することが推察されるいくつかの遺伝子を見だし、これらの遺伝子の高発現が pE プロモーターのカタボライト調節に関与するかどうかについて検討を行った。その結果、タンパク質のアセチル化/脱アセチル化に関与すると推定される遺伝子を高発現した場合に、pE プロモーター活性が変動することを伺わせるデータが得られ、カタボライト調節に BphQ のアセチル化に関与する可能性が推察された。

(5) 解析を円滑に進めるため、コンピューター上で様々な解析が実行可能なソフトウェア GenomeMatcher を作成し、web 上で公開し、またアップデートを行った。

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 12 件)

1. Tabata, M., R. Endo, M. Ito, Y. Ohtsubo, A. Kumar, M. Tsuda, and Y. Nagata. 2011 年. The lin genes for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas* sp. MM-1 proved to be dispersed across multiple plasmids. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:466-472. <査読あり>
2. Matsushima, R., H. Danno, M. Uchida, K. Ishihara, T. Suzuki, M. Kaneniwa, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2010 年. Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:567-576. <査読あり>
3. Nagata, Y., Y. Ohtsubo, R. Endo, N. Ichikawa, A. Ankai, A. Oguchi, S. Fukui, N. Fujita, and M. Tsuda. 2010 年. Complete genome sequence of the representative gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *J Bacteriol* 192:5852-5853. <査読あり>
4. Nishiyama, E., Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2010 年. Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by in vivo expression technology. *Environ Microbiol* 12:2539-2558. <査読あり>
5. 大坪嘉行, 大坪和香子, 永田裕二, and 津田雅孝. 2010 年. ゲノム解析ソフトウェア GenomeMatcher. *化学と生物* 48:313-319. <査読あり>
6. 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, and 津田雅孝. 2010 年. 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. *環境バイオテクノロジー学会誌* 10:63-70. <査読あり>
7. 大坪嘉行, 永田裕二, and 津田雅孝. 2009 年. 環境細菌ゲノムの構造と可塑性 - 難分解性化合物分解の総合職と専門職の場合 -. *化学と生物* 47:35-42. <査読あり>
8. 大坪嘉行, 西山依里, 永田裕二, and 津田雅孝. 2009 年. 分子遺伝学的手法による細菌の土壌環境適応戦略の解明. *生物工学会誌* 87:434-436. <査読あり>
9. Fuchu, G., Y. Ohtsubo, M. Ito, R. Miyazaki, A. Ono, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2008 年. Insertion sequence-based cassette PCR: cultivation-independent isolation of

- gamma-hexachlorocyclohexane-degrading genes from soil DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:627-32. <査読あり>
10. Ohtsubo, Y., W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2008 年. GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 9:376. <査読あり>
 11. Shimoda, Y., H. Mitsui, H. Kamimatsuse, K. Minamisawa, E. Nishiyama, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Tsuda, S. Shinpo, A. Watanabe, M. Kohara, M. Yamada, Y. Nakamura, S. Tabata, and S. Sato. 2008 年. Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics. *DNA Res* 15:297-308. <査読あり>
 12. Yuhara, S., H. Komatsu, H. Goto, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2008 年. Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. *Microbiology* 154:1763-74. <査読あり>
- [学会発表] (計 9 2 件)
1. 大坪嘉行ら、ドラフトゲノム配列の Finishing 支援ツール: 454Finisher、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 2. 森内良太ら、*Sphingobium* sp. MI1205 株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ LinB_MI の beta-HCH 分解活性に重要なアミノ酸残基の同定、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 3. 木村明音ら、*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の鉄応答転写因子 Fur と過酸化水素応答転写因子 OxyR の遺伝学的関連性の解明、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 4. 千本木淳子ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 株の土壌環境下で生育に重要な遺伝子の同定、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 5. 三浦那智ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 株の土壌特異的発現遺伝子の解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 6. 井上慧ら、ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達に関するプラスミド因子と受容菌因子の解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、平成 23 年 3 月 26~28 日、京都・京都女子大学
 7. 大坪嘉行ら、微生物ゲノム完全長決定支援ソフトウェア 454Finisher(仮)、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 8. 小沼かおりら、*Acidovorax* sp. KKS102 におけるカタボライト抑制メカニズムの研究、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 9. 三浦那智ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 株の土壌環境中における特異的発現遺伝子の解析、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 10. 木村明音ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の Fur と OxyR の遺伝学的関連とメカニズムの解明、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 11. 千本木淳子ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の土壌環境下で生育に重要な遺伝子の探索・解析、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 12. 森内良太ら、*Sphingobium* sp. MI1205 株由来の脱ハロゲン酵素 LinB_MI の beta-HCH 分解活性に重要なアミノ酸残基の同定、第 5 回日本ゲノム微生物学会、平成 23 年 3 月 14~16 日、仙台・東北学院大学
 13. Nagata, Y. et al.、Organization and dynamism of gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26 genome、14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society、2010/9/14-18、Rimini, Italy
 14. Kimura, A. et al.、Genetic interaction of global transcriptional regulators, Fur and OxyR, in *Burkholderia multivorans*、14th International

- Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 2010/9/14-18, Rimini, Italy
15. Ohtsubo, Y. et al.、PCB/biphenyl degradation operon repressed by different compounds in *Acidovorax* sp. KKS102 and *Burkholderia multivorans* ATCC 17616、14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 2010/9/14-18, Rimini, Italy
 16. Inoue, K. et al.、Conjugative transfer of naphthalene-catabolic plasmid NAH7 regulated by nitrogen-related phosphotransferase system of recipient cells、14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 2010/9/14-18, Rimini, Italy
 17. 津田雅孝ら、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 年度大会シンポジウム、平成 22 年 6 月 22 日、仙台・東北大学
 18. 加藤広海ら、第二世代シーケンサを用いた土壌汚染に伴う微生物の適応反応の解析、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 19. 西山依里ら、*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の土壌特異的発現遺伝子の同定と解析、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 20. 井上慧ら、受容菌のリン酸基転移系によるナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達の制御機構の解析、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 21. 木村明音ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における鉄応答転写因子と過酸化水素応答転写因子の関連、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 22. 夏井俊介ら、有機塩素系殺虫剤 γ -HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株における挿入配列 IS6100 を介したゲノムの動態、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 23. 川角徹ら、Hexachlorocyclohexane (HCH) 異性体汚染土壌由来の有機塩素系殺虫剤 γ -HCH 分解細菌叢の解析、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 24. 千本木淳子ら、STM 法による土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の土壌環境下で生育に重要な遺伝子の探索、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 25. 大坪嘉行ら、解析ソフトウェア GenomeMatcher のドラフトゲノムシーケンスのコンプリート支援機能、環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会、平成 22 年 6 月 21-22 日、仙台・東北大学
 26. 永田ら、細菌機能を利用した難分解性環境汚染物質分解へのアプローチ、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 30 日、東京大学(駒場)
 27. 大坪ら、GenomeMatcher: メタゲノム由来の大量リードの処理解析機能、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学(駒場)
 28. 松嶋ら、GFP レポーター株による *Pseudoalteromonas atlantica* AR06 株の菌体外アルギン酸リアーゼ (*alyA*) の発現解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学(駒場)
 29. 鈴木ら、*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株におけるカタボライト抑制と PTS、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学(駒場)
 30. 木村ら、土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株の鉄応答転写因子 *Fur* と酸化ストレス応答転写因子 *OxyR* の遺伝学的関連性、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学(駒場)
 31. 西山ら、アントラニル酸ジオキシゲナーゼ遺伝子の土壌中での機能に関する解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学(駒場)
 32. 加藤ら、Solexa を用いた土壌メタゲノム解析における情報解析、第四回日本ゲノム微生物学会、2010 年 3 月 7 日-2010 年 3 月 9 日、九州大学
 33. 大坪ら、GenomeMatcher の新機能 ContigAligner: 第二世代シーケン

- サーによって得られたコンティグを参照ゲノムに沿って表示する機能、第四回日本ゲノム微生物学会、2010年3月7日-2010年3月9日、九州大学
34. 大坪ら、ゲノム解析に有用な GUI ツール: GenomeMatcher、第 22 回バイオエンジニアリング講演会、2010 年 1 月 9 日、岡山理科大学
35. 鈴木ら、Burkholderia multivorans ATCC 17616 株におけるカタボライト抑制メカニズムの解明、日本生化学会第 81 回大会、2009 年 12 月 9 日-12 月 12 日、神戸
36. 石塚真祐子ら、Agrobacterium tumefaciens C58 株由来の新規ハロアルカンデハログナーゼ DatA の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27-29 日、福岡
37. 山本泰弘ら、Burkholderia multivorans ATCC 17616 の愛媛土壌特異的発現遺伝子の鹿島台土壌における発現誘導性の検討、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27-29 日、福岡
38. 湯原悟志ら、Burkholderia multivorans ATCC 17616 株の Fur を介した一酸化窒素(NO)に対する適応機構、第 3 回日本ゲノム微生物学会総会、2009 年 3 月 5-7 日、東京
39. 大坪嘉行ら、GenomeMatcher: 比較ゲノムソフトウェアとその付属機能、第 3 回日本ゲノム微生物学会総会、2009 年 3 月 5-7 日、東京
40. M. Tabata et al., Characterization of plasmids from gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium Sphingomonas sp. MM-1、International Plasmid Biology Conference 2008, August 30-September 5, 2008, Gdansk, Poland
41. M. Miyakoshi et al., Reconstruction of transcription networks by the conjugative transfer of IncP plasmids、International Plasmid Biology Conference 2008, August 30-September 5, 2008, Gdansk, Poland
42. R. Miyazaki et al., Characterization of the traD operon in Incp-9 plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer、International Plasmid Biology Conference 2008, August 30-September 5, 2008, Gdansk, Poland
43. Y. Nagata et al., Molecular genetic approaches for elucidating adaptive strategies of bacteria in

- soil、ISSM satellite symposium "Environmental genomics"、2008 年 11 月 15 日、Tokyo, Japan
44. 大坪嘉行ら、分子遺伝学的手法による細菌の土壌環境適応戦略の解明、日本生物工学会大会シンポジウム、2008 年 8 月 27-29 日、仙台

[その他]
ホームページ等
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: