

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00517

研究課題名(和文) POD遺伝子をマーカーとする従属栄養硝化菌の検出法の開発と環境動態解析への適用

研究課題名(英文) Development of molecular detection method for heterotrophic nitrifying bacteria using pod as the target gene and its application to the environmental dynamics analysis

研究代表者

藤原 健智 (Fujiwara, Taketomo)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：80209121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ピルビン酸オキシム酸素添加酵素(POD)は従属栄養性微生物による硝化作用の中核を担う酵素である。設計したPOD遺伝子特異的プライマーを用い、様々な地点から採取した土壌DNAを鋳型としてPCR増幅を行った結果、得られた産物はすべて子囊菌門の真核微生物であるBeauveria bassiana由来のPOD遺伝子であった。さらに組み換え体の作成や単離株を用いた培養実験を行うことにより、特に森林等の酸性土壌で活性が高いとされている従属栄養性硝化に、子囊菌、特にB. bassianaが大きく関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

降水量が多く森林に富む日本は、酸性土壌に広く覆われている。酸性土壌における硝化作用は従属栄養性の微生物の寄与が大きいことが知られている。ところが独立栄養性硝化の分子機構や微生物生態がよく理解されているのに対して、従属栄養性硝化に関してはほとんど不明なまま残されている。本研究によって、従属栄養性硝化微生物に関する生態学的な評価や生化学的分析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Pyruvic oxime dioxygenase (POD) is a key enzyme participating in a heterotrophic nitrification. Using designed specific primers, we attempted PCR amplification of the POD gene using environmental DNA collected from various kinds of soil. All the products obtained were POD genes from Beauveria bassiana, a eukaryotic microorganism of the phylum Ascomycota. Further we conducted biochemical analysis of the recombinant of B. bassiana POD, and the cultivation experiments using the isolate of B. bassiana. Those results indicate that B. bassiana may be significantly involved in heterotrophic nitrification which is highly active especially in the acidic forest soils.

研究分野：環境動態解析

キーワード：硝化 窒素サイクル 土壌 微生物

1. 研究開始当初の背景

硝化は、アンモニアを亜硝酸や硝酸へ異化的に変換する微生物作用であり、窒素サイクルにおける必須の生物学的過程である。独立栄養性の硝化菌については、生態学的、生化学的な研究が活発に行われてきた。一方、従属栄養的な硝化については、土壌環境中での窒素サイクルや、好氣的脱窒との共役による環境浄化への応用などの観点から重要であるにもかかわらず、その生化学的なメカニズムでさえ未だ統一的な理解に至っていないのが現状である。

従属栄養性の硝化菌においては、ピルビン酸オキシムを中間代謝産物とする反応経路が提唱されている(1,2)。この反応において中心的な役割を果たすのが、ピルビン酸オキシム酸素添加酵素 (pyruvic oxime dioxygenase ; POD) である(図1)。PODは、酸素を用いてピルビン酸オキシムをピルビン酸と亜硝酸塩に分解するという、他に類を見ない反応を触媒する。Onoら(3)によって土壌性の従属栄養硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* の POD が精製され、二価鉄 (Fe^{II}) を含む酵素であることが示された。しかしその後研究は行われず、PODの分子の性質は不明のまま残されていた。

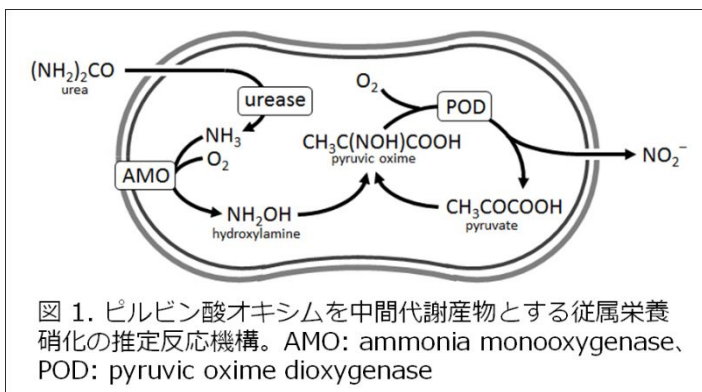


図1. ピルビン酸オキシムを中間代謝産物とする従属栄養硝化の推定反応機構。AMO: ammonia mono-oxygenase、POD: pyruvic oxime dioxygenase

研究代表者は、従属栄養性硝化に対する興味から POD に関する研究を開始し、*A. faecalis* 酵素の構造と機能に関する再検討を行った。その結果、驚くべきことに、POD は既知のジオキシゲナーゼのいずれのグループにも属さず、クラスIIアルドラーゼと相同であることが、遺伝子クローニングの結果明らかとなった。クラスIIアルドラーゼは、炭素-炭素結合の切断、あるいは付加反応を触媒するリアーゼであり、微生物における解糖や発酵、糖新生などに関与する亜鉛 (Zn^{II}) 酵素である。POD は、 Zn^{II} の代わりに Fe^{II} を用いることでリアーゼとは全く異なる酸素添加酵素として機能している事が明らかとなった(4)。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、POD 遺伝子をマーカーとして用いる従属栄養硝化菌の検出法の開発、これを利用した従属栄養硝化菌の環境動態を解析することを目的とする本研究を立案した。POD の配列相同性検索の結果、プロテオバクテリア門 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 綱) 放線菌を含むアクチノバクテリア門、および真核微生物である子囊菌門の菌類を含む幅広い種に推定 POD 遺伝子が存在していた(図2)(4)。これらの推定 POD 遺伝子は互いに高いアミノ酸配列相同性を示した。さらにこれらの推定 POD 遺伝子のうちのいくつかを大腸菌で発現させた組み換え体はすべて POD 活性を示した(東ら 2017 学会発表)。これらの結果は、POD 遺伝子をマーカーとすることで、環境試料中の従属栄養硝化細菌の検出が可能であることを示している。

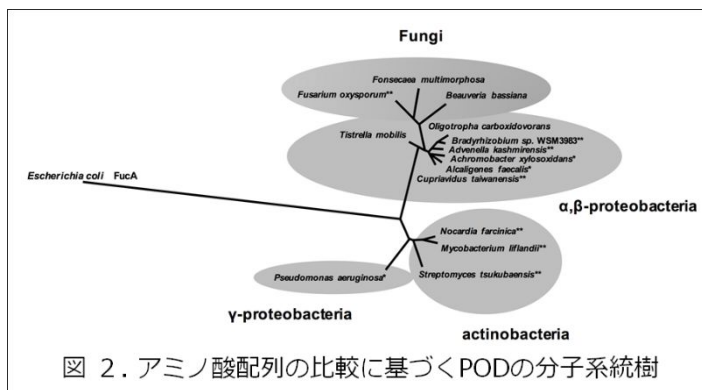


図2. アミノ酸配列の比較に基づく POD の分子系統樹

本研究では、『環境 DNA 中の POD 遺伝子を検出する手法の確立』、およびそれを用いた『従属栄養硝化細菌の環境動態解析』を試みた。さらに、『POD の X 線結晶構造解析とそれに基づいた構造・機能相関の解

明』についても並行して進めた。

3. 研究の方法

『環境 DNA 中の POD 遺伝子を検出する手法の確立』および『様々な環境における従属栄養硝化細菌の動態の分析』: 図 2 に示すようにプロテオバクテリア門、アクチノバクテリア門、および子囊菌門の菌類に POD 遺伝子が見出されるが、POD 遺伝子の塩基配列には各門間でかなり大きな相違が存在するため、すべての POD 遺伝子の特異的に増幅し得る PCR プライマーの配列設計は困難であった。そこで、子囊菌門の真核微生物が持つ POD 遺伝子にターゲットを絞り、プライマーの設計を試みた。様々な土壌サンプルから環境 DNA を抽出し、設計した子囊菌 POD 遺伝子特異的プライマーを用いて遺伝子を増幅した。

『POD の X 線結晶構造解析とそれに基づいた構造・機能相関の解明』: POD が触媒する反応機構を分子レベルで解明することを目的として、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援を受け、POD の結晶化と構造解析を進めた。

4. 研究成果

『環境 DNA 中の POD 遺伝子を検出する手法の確立』および『様々な環境における従属栄養硝化細菌の動態の分析』: 様々な土壌サンプルから環境 DNA を抽出し、設計した子囊菌 POD 遺伝子特異的プライマーを用いて遺伝子を増幅した。得られた多くのクローンの塩基配列を分析した結果、そのすべてが冬虫夏草の一種である *Beauveria bassiana* 由来の POD 遺伝子であった。*B. bassiana* は土壌中の存在量が非常に多い子囊菌として知られている。さらに *B. bassiana* POD 組み換え体の作成や単離株を用いた培養実験を行うことにより、森林等の酸性土壌で活性が高いとされている従属栄養性硝化に、*B. bassiana* をはじめとする子囊菌門の真核微生物が大きく関与している可能性が示唆された (5) (金田ら 2019 学会発表)。

研究代表者は従属栄養性硝化微生物の環境動態を分析する手法の開発に成功した。また子囊菌門の真核微生物が土壌環境中における窒素サイクルに関与していることを明らかにした。降水量が多く森林に富む日本は酸性土壌に広く覆われている。本研究によって、特に酸性土壌での硝化作用に対する寄与が大きいと考えられている従属栄養性硝化微生物に関する生態学的な評価や生化学的分析が可能となった。

『POD の X 線結晶構造解析とそれに基づいた構造・機能相関の解明』:

A. faecalis と *Bradyrhizobium* sp. WSM3983 由来の POD の結晶構造がそれぞれ 2.6 Å 分解能で得られている (図 3)。活性中心の構造に基づいて変異酵素の作成と機能解析を行い、酵素反応に必須のアミノ酸残基の同定に成功している (東ら 2017、金田ら 2019 学会発表)。

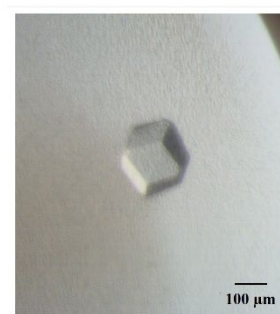


図3. *Bradyrhizobium* sp. WSM3983 POD結晶

<引用文献>

1. Quastel *et al.* (1952) *Biochem. J.* 51:278-86.
2. Ono *et al.* (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 139:103-8.
3. Ono *et al.* (1999) *Plant Cell Physiol.* 40:47-52.
4. Tsujino *et al.* (2017) *Sci. Rep.* 7:39991.
5. de Boer and Kowalchuk (2001) *Soil Biol. Biochem.* 33:853-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nguyen DT, Casareto BE, Ramphul C, Toyoda K, Suzuki T, Fujiwara T and Suzuki Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Glycerol Enhances Growth and Antimicrobial Properties of Two Selected Vibrio Bacteria Associated with the Coral <i>Montipora digitata</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Research Journal of Microbiology	6. 最初と最後の頁 127-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3923/jm.2018.127.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kosugi N, Araki T, Fujita J, Tanaka S, Fujiwara T.	4. 巻 12(12)
2. 論文標題 Growth phenotype analysis of heme synthetic enzymes in a halophilic archaeon, <i>Haloferax volcanii</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0189913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0189913.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Dohra H, Arai K, Urakawa H, Fujiwara T.	4. 巻 8(35)
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Nitrosococcus oceani</i> Strain NS58, a Marine Ammonia-Oxidizing Gammaproteobacterium Isolated from Tokyo Bay Sediment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol. Res. Announc.	6. 最初と最後の頁 e00923-19.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00923-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤原健智、荒木琢磨、小杉直樹、小柳勇、田中達、藤田純平
2. 発表標題 高度好塩性アーキア <i>Haloferax volcanii</i> におけるヘム生合成経路の分析
3. 学会等名 第19回極限環境生物学会2018年度大会（2018年12月8日～9日、くにびきメッセ・島根県松江市）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柳勇、藤原健智
2. 発表標題 好塩性アーキアの嫌気呼吸系を制御する転写因子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第19回極限環境生物学会2018年度大会（2018年12月8日～9日、くにびきメッセ・島根県松江市）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara T
2. 発表標題 Characterization of the bacterial consortium associated with massive corals
3. 学会等名 “Winners and losers on coral reefs on the wake of climate change”. University of Mauritius, Rep. Mauritius, March 15, 2019 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻野修平、上松千紗都、道羅英夫、藤原健智
2. 発表標題 従属栄養硝化の鍵酵素であるPOD (pyruvic oxime dioxygenase) の分子のおよび生化学的性質
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小柳勇、藤原健智
2. 発表標題 好塩性アーキアにおける嫌氣的呼吸の発現制御メカニズムの網羅的解析
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木琢磨、小杉直樹、藤田純平、田中達、藤原健智
2. 発表標題 Growth phenotype analysis of heme synthetic enzymes in a halophilic archaeon, <i>Haloferax volcanii</i>
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東祐一、辻野修平、清水遼、金田悠太郎、藤原健智
2. 発表標題 様々な従属栄養性硝化菌に存在するピルビン酸オキシム酸素添加酵素の分子的性質の比較
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井智哉、豊田栄、藤原健智、吉田尚弘
2. 発表標題 硝化菌による一酸化二窒素生成過程に海洋酸性化が及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本地球化学会大65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金田悠太郎、藤原健智
2. 発表標題 子囊菌による従属栄養硝化
3. 学会等名 2019年度日本土壤微生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田栄、松井智哉、藤原健智、吉田尚弘
2. 発表標題 海洋性硝化細菌によるN ₂ O生成の酸性化への応答
3. 学会等名 2019年度日本地球化学会第66回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学理学部生物科学科藤原研究室HP http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~sbtfujii/TF-lab-J.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考