

自己評価報告書

平成23年 4月12日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2011

課題番号：20380046

研究課題名 (和文) 微好気環境に特異的な微生物代謝とその制御に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on bacterial microaerobic metabolism and its regulation

研究代表者

新井 博之 (ARAI HIROYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70291052

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：好気、嫌気、微好気、呼吸、光合成、脱窒、緑膿菌

1. 研究計画の概要

微好気環境は多くの微生物にとって生育に適した環境であるが、微好気特異的な代謝系や微好気条件での細胞内酸化還元レベルの恒常性 (レドックスホメオスタシス) の制御に関する知見は少ない。本研究では、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*、酸素非発生型光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseobacter denitrificans*、好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* を材料に、酸素濃度に応じた好気呼吸鎖末端酸化酵素の発現制御機構の解析、微好気条件特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行う。これらの知見をもとに、微好気環境下でのレドックスホメオスタシスに働く微生物のエネルギー代謝と TCA 回路や解糖系などの中枢炭素代謝の相互作用と共調節のメカニズムに関して総合的に理解する。

2. 研究の進捗状況

(1) 緑膿菌のエネルギー代謝制御の解析

5種の酸素呼吸酵素(*aa3*, *cbb3-1*, *cbb3-2*, *cyo*, CIO)について種々の培養条件での発現パターンを調べるとともに、各酵素の機能を解析した結果、*cbb3-1*が主要な役割を果たし、*aa3*は飢餓条件、*cbb3-2*が低酸素条件、*cyo*が活性酸素ストレスや鉄欠乏条件、CIOがシアン等の化学ストレス耐性に働いていることを解明した。*cbb3-1*と*cbb3-2*は酸素高親和性酵素であり、他の3種は低親和性であった。また、エネルギー生産効率については*aa3*を用いる呼吸鎖が最も高いH⁺/O比を示し、CIOを用いる呼吸鎖が最も低いH⁺/O比を示した。さらに、マイクロアレイを用いて微好気特異的に発現する遺伝子、転写因子 ANR と RoxSR が微好気応答に果たす役割、および、

微好気条件下での活性酸素ストレス応答に対して転写因子 DNR, FhpR, ANR が果たす役割を解明した。

(2) 酸素非発生型光合成細菌のエネルギー代謝制御の解析

*R. sphaeroides*の微好気条件でのニトロシル化ストレス応答をマイクロアレイにより解析し、NO 応答調節因子 NnrR と、鉄濃度を感知する調節因子 Fur のレギュロンが重要な役割を果たす可能性を示した。また、微好気条件での呼吸に主要な役割を果たす *cbb3 oxidase* の欠損株の表現型を解析したところ、プロファージの自発的な離脱が認められた。好気性光合成細菌 *R. denitrificans* については嫌気呼吸に働く脱窒遺伝子の発現調節機構を解析した。

(3) *Hydrogenobacter thermophilus* の全ゲノムとトランスクリプトーム解析

全ゲノム配列の解読とアノテーションを完了し、本菌は特徴的な酸素呼吸および酸素耐性関連遺伝子を有していることを明らかにした。ゲノム情報を基にタイリングアレイを作製し、好気、微好気、嫌気 (脱窒) の各条件で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行った。本菌の持つ4種の好気呼吸鎖末端酸化酵素は、それぞれ酸素濃度に応じて特異的な発現パターンを示し、これらの使い分けが、本菌の広範囲の酸素濃度での生存に重要であることが示唆された。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

酸素非発生型光合成細菌については、当初の計画では嫌気性の *R. sphaeroides* の解析

のみを予定していたが、環境優占種であることが近年明らかになった好気性光合成細菌 *R. denitrificans* も研究対象に加え、本菌の遺伝子操作系を世界で初めて確立した。これにより変異株の作製により詳細な遺伝子解析が可能となった。

H. thermophilus については、ドラフトゲノム情報を基に蛋白質の二次元電気泳動により酸素濃度変化に対する応答を解析する予定であったが、本菌の全ゲノム配列解読を完了したため、タイリングアレイを用いてより詳細な転写応答を解析することができた。

緑膿菌については、ほぼ当初の予定通り進行している。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究成果により、研究対象とするすべての菌株（緑膿菌、光合成細菌、水素細菌）について、全ゲノム情報と、それに基づくマイクロアレイ解析が可能となり、酸素濃度変化に対する転写応答や、微妙好気特異的な遺伝子発現に関する情報が蓄積してきた。また、遺伝子操作法も確立し、変異株の作製が可能となったため、今後は、重要な役割を果たすと予想される個々のエネルギー代謝関連酵素や転写調節因子について、遺伝子破壊株の表現型解析や、精製蛋白の解析を通して、より深く掘り下げた研究を推進する予定である。

5. 代表的な研究成果

（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9件）

①新井博之、ゲノム解析から見えてきた好熱性絶対独立栄養細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の特徴、バイオサイエンスとインダストリー(査読無)、68 (5), 322-326 (2010)

②Hiroyuki Arai, Haruna Kanbe, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Complete genome sequence of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *J. Bacteriol.* (査読有), 192 (10), 2651-2652 (2010)

③Takuro Kawakami, Miho Kuroki, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, and Hiroyuki Arai, Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*, *Environ. Microbiol.* (査読有), 12 (6), 1399-1412 (2010)

④Takeshi Ikeda, Masahiro Yamamoto, Hiroyuki Arai, Daijiro Ohmori, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Enzymatic and

electron paramagnetic resonance studies of anabolic pyruvate synthesis by pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus*, *FEBS J.* (査読有), 277 (2), 501-510 (2010)

⑤Takeshi Ikeda, Miyuki Nakamura, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Ferredoxin-NADP⁺ reductase from the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *FEMS Microbiol. Lett.* (査読有), 297 (1), 124-130 (2009)

〔学会発表〕（計45件）

①新井博之、神邊悠奈、石井正治、五十嵐泰夫、好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の好気呼吸および嫌気硝酸呼吸(脱窒)関連遺伝子の発現調節、日本生化学会大会、2010.12.10、神戸

②長村達也、川上卓郎、石井正治、五十嵐泰夫、新井博之、緑膿菌の好気呼吸における末端酸化酵素のプロトン排出効率に関する研究、日本生化学会大会、2010.12.10、神戸

③Makoto Kimura, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Functional analysis of two DNR-type denitrification regulators of the aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans* OCh114, ASM Meeting, 2010.5.25, San Diego, USA

④新井博之、石井正治、五十嵐泰夫、ゲノム解析から見えてきた好熱性絶対独立栄養性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* の特徴、日本生物工学会大会、2009.9.24、名古屋

⑤Miho Kuroki, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Transcriptome response to nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas meeting*, 2009.8.14, Hannover, Germany