

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28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

研究成果の概要（和文）：通性嫌気性細菌である緑膿菌、酸素非発生型光合成細菌、好熱性水素細菌を対象として、全ゲノム情報に基づくマイクロアレイ解析を中心に、微好気環境に特異的な微生物代謝について研究を行い、好気呼吸に関与する末端酸化酵素を含めたエネルギー代謝制御の全容と、その制御を行う転写調節因子を明らかにした。特に緑膿菌においては、微好気呼吸を担う高親和性酵素がサブユニット交換により機能改変する新たなメカニズムを解明した。

研究成果の概要（英文）：Microbial metabolisms specific to microaerobic conditions were investigated mainly utilizing DNA microarray. *Pseudomonas aeruginosa*, anoxygenic photosynthetic bacteria, and thermophilic hydrogen oxidizing bacterium were used as research materials. The regulatory mechanism of multiple energy metabolisms especially for terminal oxidases and the transcriptional regulators that mediate the regulation were clarified. We also found a novel functional diversification mechanism of high affinity terminal oxidase in *P. aeruginosa*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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. 研究開始当初の背景

微好気環境は自然生態系や動植物の体内等、様々な自然環境に存在し、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、微好気条件での酸化還元レベルの恒常性維持やエネルギー生産に関する知見は少なく、未利用微生物資源や新規代謝系の宝庫として期待された。また、微好気特異的な代謝は、微生物の環境常在性や病原

性に寄与していると考えられていた。

2. 研究の目的

性質の異なる複数の通性嫌気性細菌を材料とし、微好気条件特異的に発現・機能する遺伝子の網羅的解析と、呼吸鎖末端酸化酵素の発現調節機構の解析を行い、微生物の病原性や環境常在性との関連に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

微好気環境に適した性質を持つ通性嫌気性細菌である緑膿菌、酸素非発生型光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseobacter denitrificans*、好熱性水素細菌

Hydrogenobacter thermophilus を研究材料とし、全ゲノム配列を基にした DNA マイクロアレイを用いて、酸素濃度等の環境変化による遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。特に微好気条件特異的に発現する遺伝子や、エネルギー生産に関与する呼吸酵素に着目し、その発現制御を行う転写調節因子の解明と、呼吸酵素の酵素学的解析と生理的役割について解析を行った。

4. 研究成果

(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*が活性窒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窒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。

微好気環境での生育を担う*cbb3*タイプの酵素については、*cbb3-1*と*cbb3-2*のセットの他に、主要サブユニットの遺伝子が2セット存在し、サブユニット交換により酵素のストレス耐性を強化するという新たなメカニズムを発見した。

(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、微好気条件下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、プロフェ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と、光酸化ストレス応答に関与する代替シグマ因子について解析した。

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

本菌の全ゲノム配列の解読とアノテーションを完了し、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を示した。

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16件)

①Yuya Sato, Masafumi Kameya, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, A novel enzymatic system against oxidative stress in the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*, *PLoS ONE* (査読有), 7 (4), e34825 (2012)
[doi:10.1371/journal.pone.0034825](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034825)

②Kyosuke Yamamoto, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Trade-off between oxygen and iron acquisition in bacterial cells at the air-liquid interface, *FEMS Microbiol. Ecol.* (査読有), 77 (1), 83-94 (2011)
[doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01087.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01087.x)

③Hiroyuki Arai, Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbio.* (査読有), 2:103 (2011)
[doi: 10.3389/fmicb.2011.00103](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00103)

④Hiroyuki 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)
[doi:10.1128/JB.00158-10](https://doi.org/10.1128/JB.00158-10)

⑤Takuro 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)

doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02109.x

⑥ Takeshi 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)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07506.x

⑦ Takeshi 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)

doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01667.x

[学会発表] (計67件)

① 長村 達也、川上 卓郎、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之、緑膿菌における *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase のサブユニットシャッフリング、日本農芸化学会大会、2012.3.24、京都女子大学 (京都)

② 新井博之、緑膿菌における好気および嫌気呼吸代謝の多様性と調節機構、緑膿菌感染症研究会、2012.2.18、慶應義塾大学 (東京)

③ 長村 達也、川上 卓郎、石井 正治、五十嵐 泰夫、新井 博之、緑膿菌における複数の *cbb₃* cytochrome *c* oxidase の機能解析、日本生化学会大会、2011.9.24、京都国際会館 (京都)

④ 新井 博之、緑膿菌における好気および嫌気呼吸酵素の特徴と遺伝子発現制御、日本生物物理学会年会、2011.9.16、兵庫県立大学 (兵庫)

⑤ Tatsuya Osamura, Takuro Kawakami, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, and Hiroyuki Arai, Characterization of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas 2011*, 2011.9.6, Sydney, Australia

⑥ 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脱窒遺伝子の環境変化に応じた発現調節、環境バイオテクノロジー学会大会、2011.6.21、東京大学 (東京)

⑦ Hiroyuki Arai, Tatsuya Osamura, Takuro Kawakami, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Characterization of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*, *ASM general meeting*, 2011.5.24, New Orleans, USA

⑧ 青山 晴菜、木村 真人、石井 正治、五十

嵐 泰夫、新井 博之、好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 の光酸化ストレス防御に関わる σ 因子の機能解析、日本ゲノム微生物学会年会、2011.3.15、東北学院大学 (仙台)

⑨ 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、神戸ポートアイランド (神戸)

⑩ 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、神戸ポートアイランド (神戸)

⑪ Makoto Kimura, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, and 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

⑫ 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、名古屋大学 (名古屋)

⑬ Miho Kuroki, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, Transcriptome response to nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas meeting*, 2009.8.14, Hannover, Germany

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：