

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 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：34416
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22780077
 研究課題名（和文）
 センサー誘導型環境浄化細菌創製を目指した走化性レセプター遺伝子の解析
 研究課題名（英文）
 Genetic analysis of chemotactic receptors in bacteria
 研究代表者
 岩木 宏明（ IWAKI HIROAKI ）
 関西大学・化学生命工学部・准教授
 研究者番号：00368200

研究成果の概要（和文）：

2-ニトロ安息香酸分解菌 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸走化性機構の解明を試みた。その結果、2-ニトロ安息香酸走化性は、2-ニトロ安息香酸代謝依存的であること、2-ニトロ安息香酸走化性レセプター遺伝子 (*nbaY*) は、2-ニトロ安息香酸培養時のみ誘導発現することが明らかとなった。更に、*nbaY* 遺伝子を含む 2-ニトロ安息香酸分解系遺伝子群は、2-ニトロ安息香酸そのものではなく、代謝中間体である 2-アミノ-3-カルボキシムコン酸-6-セミアルデヒドにより誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the mechanism of chemotaxis of *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7 toward 2-nitrobenzoate. We observed that the chemotaxis of strain KU-7 to 2-nitrobenzoate is metabolism-dependent and that the chemoreceptor gene *nbaY* is induced by growth on 2-nitrobenzoate. Furthermore, the genes responsible for 2-nitrobenzoate metabolism, including *nbaY*, were found to be induced by the metabolic intermediate 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde rather than 2-nitrobenzoate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：走化性、走化性レセプター、芳香族ニトロ化合物、バイオレメディエーション

1. 研究開始当初の背景

環境汚染物質の微生物分解についての研究は、代謝中間体の同定、分解酵素・遺伝子の解析、分解制御機構の解明等、分解経路に関することに主眼が置かれてきた。しか

しながら、バイオレメディエーションへの応用を考えた場合、直接の分解経路以外の因子も重要であり、以下に示す2項目は特に重要である。

- ・バクテリアは如何にして環境中で汚染物

質を見つけるのか？（走化性）

・バクテリアは如何にして汚染物質を細胞内に取り込むのか？（輸送系）

輸送系については、多くの芳香族化合物トランスポーターとその遺伝子が特定されている。その背景には、トランスポーター遺伝子が分解酵素遺伝子群近傍に存在するという事実がある。一方の走化性についての研究は、大腸菌において精力的に行われ、極めて詳細なメカニズムまで明らかになっている。走化性の機構については、まず、走化性レセプターが化学的刺激を受容し、その刺激が走化性シグナル伝達系へ伝えられる。この結果、べん毛の回転方向が切り替えられ、誘引応答（正の走化性）・忌避応答（負の走化性）が見られる。この機構において、運動性細菌が認識できる走化性物質は、その細菌がどのような走化性レセプターを持っているかによって決まる。近年、ゲノム解析の結果から土壌細菌は腸内細菌である大腸菌より、はるかに多くの化合物を認識することが予測されている。大腸菌が6つの走化性レセプター遺伝子をもつのに対し、多くの土壌細菌は十数～数十もの走化性レセプター遺伝子を有する。実際、最近の研究で、多くの環境汚染物質分解菌が、多様な化合物に対する走化性を有することが明らかになってきた。このような土壌細菌の走化性の多様性にかかわらず、芳香族化合物を認識する走化性レセプターが同定されている例は希であり、その発現制御機構や基質認識特異性等詳細な情報は得られていない。その理由として、走化性レセプター遺伝子が分解酵素遺伝子クラスター近傍に存在しないこと、走化性レセプターのアミノ酸配列をもとにレセプターが認識する化合物を予測することが困難であることがあげられる。その中で申請者は、*Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸 (2-NBA) 分解系遺伝子 (*nba*) クラスター中に走化性レセプター遺伝子 (*nbaY*) を見出し、遺伝子欠損解析により、*nbaY* が 2-NBA 走化性レセプター遺伝子であることを示している (J. Bacteriol. 2007, 189:3502-3514)。

2. 研究の目的

バイオレメディエーションに適用可能な環境浄化細菌の開発のためには、直接の分解経路以外の因子の解析も重要である。本研究では、申請者が特に重要であると考えられる走化性に的を絞り、*P. fluorescens* KU-7 株の 2-NBA 走化性機構の解析を中心に行った。

(1) 培地中での汚染物質の微生物分解には走化性の有無が影響しないことから、これまで、環境汚染物質に対する走化性は、あまり着目されてこなかった。しかしながら、効率的なバイオレメディエーション法の開発には、走化性は重要なファクターとなる。というの

汚染物質の分解は、分解菌が汚染物質と出会うことで初めて進行するからである。培地中では、分解菌と汚染物質の遭遇にはどのような制限もないが、実際の環境中では様々な制限が存在する。実際に、従来のバイオレメディエーションでは、環境浄化細菌を環境汚染物質に接触させるよう多くの工夫がなされてきた。このとき、分解菌が正の汚染物質走化性をもつ場合、汚染領域に積極的に集積して分解が効率的に進む。逆に負の走化性をもつ場合、汚染領域から逃げてしまうため分解は進まない。そこで分解菌に正の走化性を付与できれば、または、負の走化性を除去できれば、汚染領域に積極的に集積し、効率的に汚染物質を分解する環境浄化細菌の開発が可能となる。このような環境浄化細菌育種において重要となるのは、対象となる汚染物質を認識する走化性レセプターである。分解菌に、正の走化性レセプター遺伝子を導入すれば、汚染物質に対する正の走化性を付与することができる。一方、負の走化性に関与するレセプター遺伝子を破壊すれば環境汚染物質からの逃避を避けることができる。申請者が同定した *P. fluorescens* KU-7 株の *nbaY* (J. Bacteriol. 2007, 189:3502-3514) は、芳香族化合物を認識する走化性レセプター研究のための恰好の材料であり、本研究を通じ、環境汚染物質に対する走化性を有する環境浄化細菌を育種するための基礎的知見を得ることを目的とする。

(2) 走化性レセプタータンパク質中の HCD と呼ばれる領域は原核生物間で高度に保存されており、走化性レセプター遺伝子は、HCD 配列をクエリーとした BLAST サーチによりゲノム配列から容易に検索することができる。さらに、HCD 配列を基にプローブを作成すれば、ゲノム配列が決定されていない菌株からでも容易に取得可能であろう。しかしながら、走化性レセプタータンパク質が認識する化合物をアミノ酸配列をもとに特定することは困難である。そこで、配列をもとにしたレセプターの機能推定を可能にするための情報を得るため、芳香族化合物を認識する新規走化性レセプター遺伝子の取得を試みた。

3. 研究の方法

(1) 走化性アッセイ

スワームプレートアッセイ法 (J. Bacteriol. 1994, 176:6479-6488) およびドロップアッセイ法 (J. Mol. Biol. 1994, 238:173-186) により走化性を検出した。

(2) 遺伝子欠損変異株の構築

KU-7 株の *nba* 遺伝子欠損株の構築は、*sacB* を利用したノンマーカークロソート法により行った。遺伝子欠損カセットは、オーバーラップ PCR 法 (J. Bacteriol.

1997, 179:6228-6237) により構築し、相同組換え用ベクターpk19mobsacB に組み込んだ。構築したプラスミドは、*E. coli* S17-1 をドナーとした接合伝達により KU-7 株に導入した。

(3) 転写解析

nba 遺伝子の転写解析は RT-PCR 法により行った。トータル RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い抽出・精製した。逆転写には PrimeScript Reverse Transcriptase (タカラバイオ) を、PCR には KOD -plus- DNA Polymerase (東洋紡) を用いた。

(4) 微生物の分離

芳香族化合物およびナフテン系化合物資化性菌の単離は、各基質を唯一の炭素源として含む人工海水培地 IMK-SP (日本製薬) を用いて、集積培養法により行った。海水サンプルをメンブランフィルター (0.45 μm) を用いて濾過し、微生物を 500 倍程度に濃縮したものを接種サンプルとした。分解菌の単離は、常法 (FEMS Microbiol. Lett. 2012, 327:142-147) に従った。

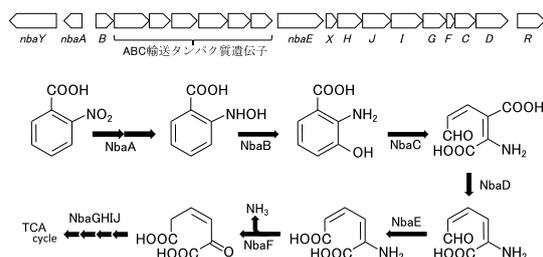


図 1. KU-7 株の 2-NBA 代謝経路と分解系遺伝子群

4. 研究成果

(1) 2-NBA 分解系遺伝子欠損株の 2-NBA に対する走化性

① $\Delta nbaR$ 株の 2-NBA に対する走化性

P. fluorescens KU-7 株の 2-NBA 走化性レセプター遺伝子は、2-NBA 分解系クラスター中に存在する *nbaY* であることが示されている。また、2-NBA 分解系酵素遺伝子は、2-NBA 培養により誘導され、その制御遺伝子として *nbaR* が同定されている。そこで、走化性の *nbaR* 依存性を調べるため、*nbaR* 遺伝子欠損株 ($\Delta nbaR$ 株) を構築し、2-NBA に対する走化性を調べた。その結果、 $\Delta nbaR$ 株は 2-NBA に対する走化性を示さなかったことから、*nbaY* は *nbaR* により制御されていることが示唆された。

② $\Delta nbaA$ 株の 2-NBA に対する走化性

安息香酸や *p*-ヒドロキシ安息香酸などの芳香族カルボン酸に対する走化性では、芳香

族カルボン酸そのものではなく代謝中間体が誘引物質となっていることから、KU-7 株の 2-NBA 走化性も代謝中間体が誘引物質になっている可能性を考え、初発酵素遺伝子 *nbaA* 遺伝子欠損株 ($\Delta nbaA$ 株) を構築し、2-NBA に対する走化性を調べた。その結果、 $\Delta nbaA$ 株は 2-NBA に対する走化性を示さなかった。さらに、 $\Delta nbaA$ 株の NbaC 活性を測定したところ、活性が検出されず、2-NBA 分解系の誘導物質は 2-NBA そのものではなく、代謝中間体であることが示された。これらの結果より、KU-7 株の 2-NBA 走化性を分子レベルで理解するためには、発現制御系を解明する必要があると考えた。

(2) 2-NBA 分解系の真の誘導物質の同定

2-NBA 分解系の誘導物質は 2-NBA そのものではなく、代謝中間体であることが示されたことから、*nbaB*, *C*, *D*, *E* 欠損株を構築し、それぞれの変異株における NbaA 活性により遺伝子の誘導性を検討し、真の誘導物質の特定を試みた。その結果、 $\Delta nbaB$ および $\Delta nbaC$ 株では、NbaA 活性が検出されず、 $\Delta nbaD$ および $\Delta nbaE$ 株では、NbaA 活性が検出されることから、NbaD の基質である 2-アミノ-3-カルボキシムコン酸-6-セミアルデヒド (ACMS) が真の誘導物質であることが明らかとなった。

(3) *nbaY* の転写解析

RT-PCR 法により、*nbaY* 遺伝子の誘導性を解析した結果、*nbaY* は、*nbaA*, *nbaB* 同様 2-NBA で誘導した場合のみ転写されていることが明らかとなった (図 2)。さらに、*nbaY* は $\Delta nbaR$ 株では、2-NBA 誘導条件下においても転写されておらず、*nba* 酵素遺伝子群と同様に NbaR により制御されていることが明らかとなった。さらに、RT-PCR により転写単位を調べた結果、*nbaY* は *nbaA* とオペロンを形成していることが明らかとなった (図 3)。次に、 $\Delta nbaA$, *B*, *C*, *D* 株における *nbaY* 遺伝子の転写を調べた結果、*nbaY* 遺伝子は、 $\Delta nbaA$, *B*, *C* 株では転写されておらず、 $\Delta nbaD$ 株では転写されていた。これらの結果より、*nbaY* 遺伝子も 2-NBA そのものではなく、ACMS により誘導されることが示された。

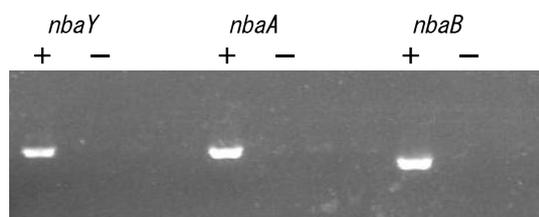


図 2. RT-PCR による *nba* 遺伝子の誘導性解析
+, 2-NBA 誘導; -, 非誘導

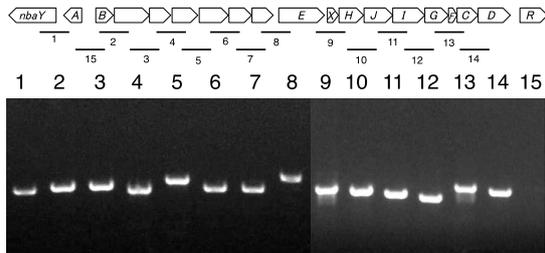


図3. RT-PCRによる *nba* 遺伝子群の転写単位解析

(4)新規走化性レセプター遺伝子の検索と解析

①申請者は *Burkholderia* sp. KU-46 株の 2,4-ジヒドロキシ安息香酸分解系遺伝子クラスターおよび *Pseudomonas* sp. HI-70 株のシクロドデカノール分解系遺伝子クラスター中に走化性レセプター遺伝子が存在することを見出している。そこで、これらレセプターが認識する化合物を同定するため、KU-46 株については、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、HI-70 株については、シクロドデカノールに対する走化性を調べた。その結果、両菌株ともコハク酸やカザミノ酸に対しては走化性を示したが、目的化合物には走化性を示さず、分解系遺伝子中に存在するレセプター遺伝子産物が認識する化合物を同定するには至らなかった。

②データベース解析により、ジニトロトルエン (*Burkholderia cepacia* R34 株)、ニトロトルエン (*Acidovorax* sp. JS42 株)、ニトロベンゼン (*Comamonas* sp. JS765 株) 分解系遺伝子クラスター中にも走化性レセプター遺伝子が見出された。このことから、芳香族ニトロ化合物分解系遺伝子クラスター中には、高頻度で走化性レセプター遺伝子が存在するのではないかと考え、芳香族ニトロ化合物走化性レセプター遺伝子の取得・解析を目的とし、*Burkholderia* 属および *Cupriavidus* 属細菌の 2-NBA 分解系遺伝子、*Burkholderia* 属細菌の 4-ニトロフェノール分解系遺伝子の取得・解析を試みた。その結果、全ての菌株において目的化合物の分解系遺伝子クラスターの取得に成功したが、それら遺伝子群近傍には、走化性レセプター遺伝子は見出せなかった。

③海洋性細菌の走化性については、不明な点が多い。走化性の解析・走化性レセプター遺伝子の取得に供する海洋性細菌を取得する目的で、芳香族化合物およびナフテン系化合物分解性海洋細菌の分離を試みた。対象化合物としては、フェノール、フタル酸、シクロヘキシル酢酸、シクロヘキサンカルボン酸等を用いた。その結果、多くの運動性を有する分解菌が得られた。運動性の分解菌について、スワームプレートアッセイ法で分離基質に対する走化性を調べた結果、培地成分に対し

て走化性を示す菌株が多く存在し、分離基質に対する明確な走化性を検出できなかった。今後、ドロップアッセイ法などの手法で走化性を調べる予定である。

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 2 件)

① H. Iwaki, N. Yasukawa, M. Fujioka, K. Takada, Y. Hasegawa (2013) Isolation and characterization of a marine cyclohexylacetate-degrading bacterium *Lutimaribacter litoralis* sp. nov., and reclassification of *Oceanicola pacificus* as *Lutimaribacter pacificus* comb. nov. *Curr. Microbiol.* 66(6), 588-593

(査読有)

② H. Iwaki, A. Nishimura, Y. Hasegawa (2012) Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing phthalate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1321-132 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

① 藤岡 諒、岩木宏明、長谷川 喜衛 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 26 日 (東北大学)

② 藤岡 諒、福島 健斗、岩木宏明、長谷川 喜衛 *Cupriavidus* sp. KU-41 株の 2-ニトロ安息香酸分解系遺伝子の機能解析 第 64 回日本生物工学会大会 2012 年 10 月 24 日 (神戸ポートピアホテル)

③ 藤岡 諒、岩木宏明、長谷川 喜衛 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性 日本農芸化学会関西支部会 2012 年度大会 2012 年 9 月 29 日 (京都学園大学)

④ 高田 健吾、岩木宏明、長谷川 喜衛 *Burkholderia* sp. KU-46 株の 2,4-ジニトロフェノール分解系遺伝子群の取得 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 25 日 (京都女子大学)

⑤ 西村 彩香、岩木宏明、長谷川 喜衛 海洋性フタル酸資化性菌の分離と解析 日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 2011 年 8 月 31 日 (千里ライフサイエンスセンター)

⑥ 斉藤 潤、岩木宏明、長谷川 喜衛 海洋性シクロヘキシル酢酸分解菌の分離と特性 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日 (京都女子大学)

⑦ 高田 健吾、岩木宏明、長谷川 喜衛 海洋性フェノール分解菌の単離と解析 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日 (京

都女子大学)

⑧城谷達也、岩木宏明、長谷川喜衛 海洋性細菌による芳香族化合物の分解 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日 (京都女子大学)

⑨齊藤潤、岩木宏明、長谷川喜衛 シクロヘキシル酢酸分解菌の単離と解析 日本農芸化学会 2010 年度関西支部大会 2010 年 10 月 3 日 (近畿大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩木 宏明 (IWAKI HIROAKI)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号 : 00368200