

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580111

研究課題名(和文)超低栄養性細菌に見いだされた新規オルガネラ、オリゴボディーの解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel bacterial organelle, oligobody in an extremely oligotrophic bacterium

研究代表者

吉田 信行 (Yoshida, Nobuyuki)

静岡大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10273848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus erythropolis N9T-4株は炭素源無添加の無機塩培地に良好に生育し、CO₂を要求する超低栄養性細菌である。本菌は低栄養条件下で生育する際に細胞内に独特な細菌オルガネラ、オリゴボディーを1つずつ形成する。オリゴボディーの形成には添加する炭素源によっては変化がなかったが、窒素源を塩化アンモニウムに代えると、濃度依存的にオリゴボディーが小さくなる傾向にあった。オリゴボディーの構成成分は無機ポリリン酸であることが判明し、無機ポリリン酸の合成に関与する遺伝子であるppk1を欠損させた場合、オリゴボディーの形成は顕著に減少したが、低栄養生育能は親株と変わらなかった。

研究成果の概要(英文)：Rhodococcus erythropolis N9T-4 can grow on a minimum salt medium without any additional carbon source and requires CO₂ for its oligotrophic growth. This bacterium forms a unique bacterial organelle, oligobody under oligotrophic conditions. The formation of the oligobodies was not affected by additional carbon sources but the size became reduced when NH₄Cl was used as a nitrogen source in a dose-dependent manner. Biochemical and TEM-EDX analyses showed that the component of the oligobody was inorganic polyphosphate. Genome analysis of N9T-4 revealed that two genes involved in synthesis and degradation of inorganic polyphosphate, ppk1 and ppk2, respectively. The oligobody formation was dramatically decreased in a ppk1-deletion mutant, while the growth of the mutant was the same level of that of the wild-type strain.

研究分野：応用微生物学

キーワード：低栄養性細菌、オリゴトローフ、ロドコッカス属、二酸化炭素、オリゴボディー、無機ポリリン酸、透過型電子顕微鏡観察

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素 (CO₂) の排出削減,あるいは利用可能な資源の脱石油化と言ったいわゆるグリーンバイオの観点から,現大気中の CO₂由来のバイオマス資源の増産はこれからの地球にとって至上命題である。従って,生物による効率の良い CO₂ 固定系の構築はバイオサイエンスにおける重要課題の一つである。本申請者はより効率的な CO₂ の生物的有效利用を目的とし,新しい CO₂ 固定微生物の検索を試みている。本申請者が備蓄原油中より見いだした超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素源を加えない無機塩培地に良好に生育し,その生育に CO₂ を要求する。しかしながら,これまでの独立栄養性細菌に見られるような光,金属などのエネルギー源の添加を全く必要としない。これまでにプロテオーム解析やメタボローム解析などにより,これまでに類をみない低エネルギー型 CO₂ 固定経路を提唱している (*J. Bacteriol.*, 189, 6824-6831, 2007 および未発表データ)。

本申請者は最近, N9T-4 株が低栄養条件 (炭素源を含まない培地, BM 培地) で生育する際,その細胞内に顆粒を形成することを見いだした (図 1)。本申請者はこの細胞内顆粒を新しい細菌オルガネラ,オリゴボディーと名付け研究を進めている。このオリゴボディーは BM 培地での生育に顕著に見られ, LB 培地など栄養源が豊富な条件では見られないか,非常に小さいものとなっている。従って,本菌の CO₂ 固定に大きく関わっている可能性がある。

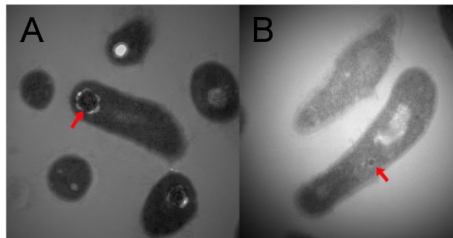


図 1 N9T-4株のオリゴボディー
A: BM培地で生育させた細胞、
B: LB培地で生育させた細胞
矢印がオリゴボディーを示している。

これまでに知られている細菌のオルガネラとしては,光合成細菌などが持つカルボキシソーム, 1,2-プロパンジオール資化性菌, エタノールアミン資化性菌が持つマイクロコンパートメントなどがある (*Annu. Rev. Microbiol.*, 64, 391-408, 2010)。これらはタンパク質性の細胞内小区画であり,「オルガネラ」と呼ぶべきかどうかは議論の対象であるが,それぞれ特異的な酵素が局在しており,広義のオルガネラと称する場合もある。その意味では,ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) を生産する菌などで見られるインクルージョンボディーも PHB 合成酵素など局在している

ことから細菌オルガネラの範疇に入るかも知れない。しかしながら, N9T-4 株のオリゴボディーはこれらのオルガネラとは形,大きさ,数とも大きく異なるものである。本研究ではこのオリゴボディーを単離し,その性質を調べることにより,新しい細菌オルガネラの役割,特に CO₂ 固定との関係を明らかにしようというものである。

2. 研究の目的

本研究は応募段階では以下の3つの点を研究目的とした。(1)様々な条件で培養した際のオリゴボディーの電子顕微鏡観察,(2)オリゴボディーの単離と解析,(3)オリゴボディー局在タンパク質の同定と解析,である。しかしながら,(1)を遂行している過程で,先にオリゴボディーの構成成分についての予想がついたので,構成成分について詳細な解析を行い,さらにその合成・分解に関する酵素遺伝子を予想し,本菌の CO₂ 固定あるいは低栄養性に関して考察を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々な条件で培養した際のオリゴボディーの透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

低栄養条件として BM 培地,富栄養条件として BM+グルコース培地, BM+n-テトラデカン培地,および LB 培地を用いて N9T-4 株を培養し,菌体を得た。本菌を CO₂ 制限条件下で培養する際,CO₂ 以外で炭素源となるものは n-テトラデカンを始めとした直鎖飽和アルカンであることが分かっており (*J. Bacteriol.*, 189, 6824-6831, 2007), CO₂ 制限条件下ではグルコースなどの糖質でさえ炭素源にならないことが分かっている。また,本菌の CO₂ 固定に関わると予想される遺伝子の発現はグルコースで抑制されないが, n-テトラデカンおよび LB 培地で抑制されることが分かっている (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 123-127, 2011)。つまり,これまでに明らかとなっている N9T-4 株の性質, CO₂ 要求性および遺伝子発現とオリゴボディー形成との関係を調べることを目的として,上記のような培養条件を設定した。

N9T-4 株の細胞を TEM 観察する方法はすでにある程度確立している。具体的には培養細胞をグルタルアルデヒド,四酸化オスミウムによって固定し,樹脂包埋した後,TEM 観察に適した切片を得た。各条件でのオリゴボディーを有する細胞の数,オリゴボディーの大きさ,細胞の形態などを注意深く観察し,オリゴボディーを形成する条件を検討した。

(2) 光学顕微鏡によるオリゴボディーの可視化

これまでオリゴボディーの観察は TEM により行われてきたが,様々な検討を行うためには簡便な方法による観察が望ましい。そこで,各種染色による蛍光顕微鏡または光学顕

微鏡での観察を試みた。細胞染色には、4,6-ジアミジノフェニルインドール (DAPI), ナイルレッド (NR), トルイジンブルー (TB) の3種類の試薬を用い、DAPI および NR 染色を行った細胞は蛍光顕微鏡で、TB 染色を行った細胞は光学顕微鏡でのオリゴボディーの観察を試みた。

(3) 無機ポリリン酸の定量とポリリン酸の生合成・分解に關与する遺伝子の欠損株の構築

上記の検討でオリゴボディーの構成成分が無機ポリリン酸であることが予想できたので、モリブデン・マラカイトグリーン法により無機ポリリン酸を定量し、培養条件などと共に考察した。さらに、N9T-4 のゲノム情報より無機ポリリン酸の生合成・分解に關与する遺伝子を同定し、それぞれの遺伝子破壊を試み、破壊株の生育、無機ポリリン酸量などを検討した。遺伝子破壊 (欠損) は目的の遺伝子のコード領域を欠損させた上流および下流結合断片を、カナマイシン耐性遺伝子およびレバンスクラゼ遺伝子を含むプラスミドに連結させ、N9T-4 株細胞に導入することにより行った。シングルクロスオーバーによるカナマイシン耐性株の取得、ダブルクロスオーバーによるレバン致死性株の排除の結果得られるシームレス欠損株を解析に用いた。

4. 研究成果

(1) オリゴボディー形成に關する培養条件の検討

低栄養条件として BM 培地、富栄養条件として BM+グルコース培地、BM+n-テトラデカン培地、および LB 培地を用いて培養したそれぞれの N9T-4 株細胞の TEM 観察を行なった。これまでの結果と同様に、BM 培地で培養した細胞内には大きなオリゴボディー (大きさ約 50-100 nm) が1つずつ形成されており、LB 培地においてはほとんど見られなかった。今回の観察では、細胞内に2つのオリゴボディーを形成しているパターンがしばしば見られた (図2)。この場合、細胞が分裂直前であることが観察でき、オリゴボディーは細胞分裂と共に分配あるいは新たに合成されるという興味深い知見が得られた。

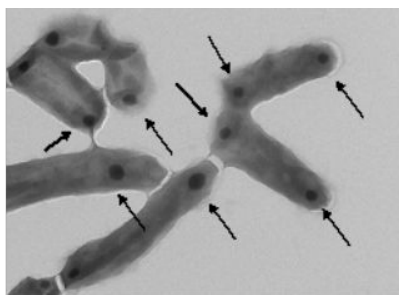


図2 N9T-4株のオリゴボディー (2) 細胞内に2つの形成が見られたもの。

炭素源については、BM 培地にグルコースあるいは n-テトラデカンを添加した場合も炭素源無添加の場合と比べ、数、大きさともに若干の低下は認められたが、それほど大きな差はなく、オリゴボディー形成に關して炭素源の影響はそれほど大きくないことが分かった。窒素源については、BM 培地中の窒素源を NaNO_3 から NH_4Cl に代えた際、オリゴボディーの大きさが有意に小さくなり、 NH_4Cl 濃度を上げるとさらに小さくなる傾向にあった。従って、オリゴボディーの形成には窒素源が関わっていることが示唆された。

(2) 光学顕微鏡によるオリゴボディーの可視化

上記のようにオリゴボディーは TEM によって観察可能であるが、様々な条件での検討を行なう場合は、試料の調製などの煩雑性から、光学顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡での観察が望ましい。様々な染色試薬を用いて検討した結果、DAPI および NR 染色では細胞全体が染色されてしまい、オリゴボディーと考えられる構造体の染色は確認できなかったが、TB 染色においては、特異的に濃い染色部分が観察できた (図3)。この染色された構造体は各細胞に1つずつ確認され、球形であることからオリゴボディーであると予想された。TB は塩基性色素で、主に軟骨染色、肥満細胞、神経、ムチン (粘液多糖類) などを染色することが知られているが、微生物においては無機ポリリン酸 (polyP) からなる顆粒を染色する際に用いられている (J. Gen. Appl. Microbiol., 48, 125-133.)。

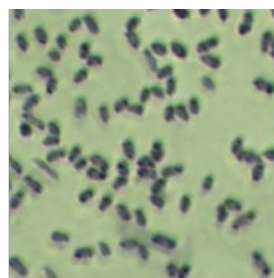


図3 TB染色したN9T-4株細胞 細胞内に染色された顆粒 (オリゴボディーと思われる) が見られる。

(3) 細胞内 polyP の定量とオリゴボディーとの關連性

オリゴボディーが TB によって染色できることが予想できたので、オリゴボディー形成条件、非形成条件での細胞内 polyP 含量を測定した。polyP は細胞抽出液からガラスミルクに吸着させて精製し、その後塩酸加水分解の前後の無機リン酸を測定することにより定量した。その結果、図4に示した通り、BM 培地で生育させた細胞に顕著な polyP の蓄積が認められた。これは BM 培地中のリン酸濃度 (KH_2PO_4 および K_2HPO_4) によるものとも考えられたので、LB 培地に BM 培地と同濃度のリン酸塩を添加した条件でも検討し

たが、polyP 蓄積量の増加は認められなかった。従って、N9T-4 株における polyP 蓄積機構は、生物学的リン酸除去 (EBPR) リアクター内のバクテリアが有するもの (Water Res., 32, 3193-3207, 1998) とは異なるメカニズムで polyP を顆粒の形で蓄積しているものと思われた。

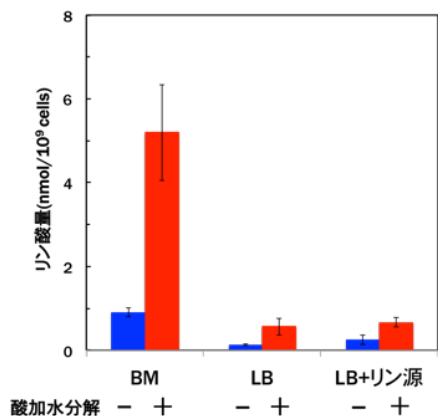


図4 N9T-4株細胞内のpolyPの定量
精製したpolyP画分について、塩酸加水分解前後の無機リン酸量をモリブデン・マラカイト法で定量した。LB+リン酸とは、LB培地にBMと同濃度のリン酸塩 (1 g/LのKH₂PO₄およびK₂HPO₄) を添加したものである。

細胞内に蓄積している polyP がオリゴボディーに局在しているかを確認するために、エネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDX) によるオリゴボディーの元素分析を行った。BM 培地と LB 培地で生育させた細胞を用い、オリゴボディーの内部、外部などの分析を行った。その結果、オリゴボディーにおいて細胞質より有意に高いリンのピークが検出された (図5)。このことは、上記の結果と合わせて、オリゴボディーに polyP が蓄積していることを裏付ける結果である。また、リン以外にカリウムのピークが認められ、カリウムが polyP のカウンターイオンになっていることが示唆された。

(4) polyP 生合成・分解に関する酵素遺伝子の同定とそれらの破壊株の解析

オリゴボディーに polyP が蓄積していることを示唆する結果が多く得られたので、次に N9T-4 株のゲノム情報を元に、polyP の生合成・分解に関係する遺伝子の有無を調べた。その結果、2 つのポリリン酸キナーゼをコードする遺伝子 (*ppk1*, *ppk2*) が N9T-4 株のゲノム上に存在することが分かった。これらの酵素は ATP あるいは GTP 依存的にポリリン酸鎖にリン酸を付加する反応を可逆的に行うことが知られている (Proc Natl Acad Sci U S A 99, 16678-16683, 2002; Annu Rev Biochem 78, 605-647, 2009)。そこで、これら各々の単独破壊株を作製し、低栄養時の生育やオリゴボディーの形成の有無を確認した。その結果、 $\Delta ppk1$ 株においては、オリゴボディーの形成が顕著に減少し、さらに細胞

内 polyP もほとんど検出できなかったのに対し、 $\Delta ppk2$ 株は親株とほとんど同じ結果となった。このことは、N9T-4 株が持つ 2 つの polyP キナーゼのうち、Ppk1 は polyP の生合成に、Ppk2 は分解に関与することを示唆するものである。しかしながら、BM 培地上での生育は親株、 $\Delta ppk1$ 株、 $\Delta ppk2$ 株共に有意な差はなく、本菌の低栄養生育と polyP の蓄積、オリゴボディーの形成とは関連性はないものと結論づけた。

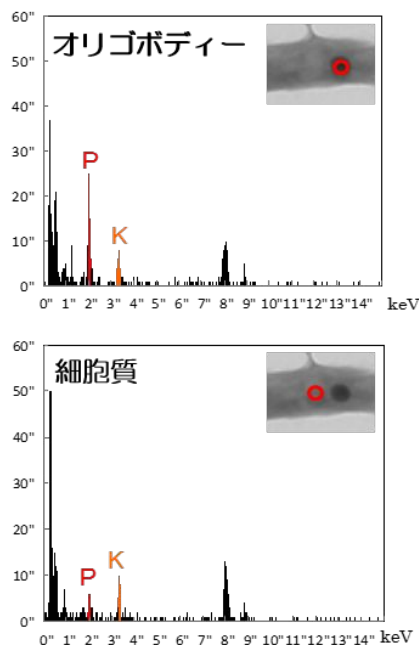


図5 オリゴボディーのTEM-EDX解析
BM培地で培養した細胞を無染色のまま銅グリッドにのせ、カーボン蒸着後にTEM観察を行い、オリゴボディー内外の領域についてEDX解析を行った。

(5) まとめと今後の課題

実は、polyP の顆粒は volutin 顆粒として古くから知られ、細菌の細胞内構造体として初めて観察されたものである (Bacteriol Rev 30, 772-794, 1966)。グラム陽性、陰性を問わず様々な細菌が polyP 顆粒を形成することが知られているが、polyP 顆粒あるいは polyP そのものの機能についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。真核生物における polyP 顆粒はアシドカルシソームとして知られ、カルシウムと polyP が蓄積している (Cell Calcium, 50, 113-119, 2011)。つまり、polyP の顆粒は原核生物から真核生物まで存在するオルガネラだと主張する研究者もいる。しかしながら、これらの例で見られる polyP 顆粒は細胞内に不特定多数で形成され、大きさ、局在性も様々である。この点で N9T-4 株のオリゴボディーとは大きく異なる。N9T-4 株においては、オリゴボディーはほとんどの場合、細胞に 1 つ形成され、しかも細胞の極に局在している。これらのことは、N9T-4 株においては polyP 顆粒であるオリゴボディーが細胞生理的に重要な役割を果た

していることを示唆するものであるが、本研究における遺伝子欠損株の解析からは低栄養生育との関連性は薄いものと考えられた。しかしながら、窒素源を塩化アンモニウムにした際にオリゴボディーが若干小さくなり、LB 培地で生育した細胞ではほとんど見られなかったことより、窒素代謝との関連性が予想される。今回、*ppk1/ppk2* の二重欠損株を取得することはできなかった。二重欠損は致命的になるのか、低栄養生育との関連はあるのか、今後の課題としたい。

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4件)

吉田信行: 培養に炭素・窒素・硫黄源の添加を必要としない超低栄養性細菌 - 希薄? な栄養源をどのように利用しているのか?, *化学と生物* (査読有り), 53, 423-425 (2015)

Yano, T., Yoshida, N., Yu, F., Wakamatsu, M., and Takagi, H: The glyoxylate shunt is essential for CO₂-requiring oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (査読有り), 99, 5627- 5637 (2015) DOI: 10.1007/s00253-015-6500-x.

吉田信行, 矢野嵩典, 湯不二夫, 高木博史: 大気中から主要栄養源を取り入れる超低栄養性細菌 - その炭素および窒素代謝, *バイオサイエンスとインダストリー* (査読無し), 73, 215-219 (2015)

Yoshida, N., Inaba, S., and Takagi, H.: Utilization of atmospheric ammonia by an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, *J. Biosci. Bioeng.* (査読有り), 117, 28-32 (2014) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.005.

[学会発表](計7件)

藤好拓也, 毛戸香織, 岩野恵, 永井里奈, 吉田信行, 高木博史: 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株に見出された新奇オルガネラ, オリゴボディーの解析, 第64回日本生物工学会大会, 2012.10.24, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)。

藤好拓也, 永井里奈, 岩野恵, 田口英次, 西田倫希, 吉田信行, 高木博史: 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株に見出された新奇オルガネラ「オリゴボディー」の解析, 第65回日本生物工学会大会, 2013.9.18-9.20, 広島国際会議場(広島県広島市中区)。

藤好拓也, 岩野恵, 永井里奈, 西田倫希, 吉田信行, 高木博史: 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株に見出された新奇オルガネラ「オリゴボディー」の解析, 日本農芸化学会関西支部例会第482講演会, 2013.12.7, 神戸大学大学院農学研究科

(兵庫県神戸市灘区)。

Yano, T., Yoshida, N., and Takagi, H.: Biochemical studies on a unique carbon metabolism in an extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, JSPS Japanese-German Graduate Externship Program, Biotechnology and Chemistry for Green Growth, 2014.3.10-3.11, Senri Life Science Center (Toyonaka City, Osaka).

藤好拓也, 永井里奈, 岩野恵, 西田倫希, 田口英次, 吉田信行, 高木博史: *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が低栄養生育時に形成するオリゴボディーの機能解析, 日本農芸化学会2014年大会, 2014.3.27-3.30, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市多摩区)。

矢野嵩典, 吉田信行, 高木博史: 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株における TCA バイパス経路の解析, 日本農芸化学会2014年大会, 2014.3.27-3.30, 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市多摩区)。

矢野嵩典, 吉田信行, 高木博史: 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が有する TCA バイパス経路の生化学的解析, 第66回日本生物工学会, 2014.9.9-9.11, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区)。

[その他]

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~tnyoshi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 信行 (YOSHIDA, Nobuyuki)

静岡大学大学院工学研究科

研究者番号: 10273848