

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658068

研究課題名(和文) 環境細菌の極貧有機炭素源環境下での生育を司る機構の解明

研究課題名(英文) Studies on oligotrophic mutants of an aerobic heterotrophic bacterium

研究代表者

永田 裕二 (Nagata, Yuji)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：30237531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：典型的な好気性従属栄養環境細菌 *Sphingobium japonicum* UT26株で *adhX* 遺伝子が高発現すると大気中のCO<sub>2</sub>を取り込みながら炭素源非添加無機培地で生育可能となる現象を見出した。さらに、*adhX*高発現株のトランスポゾン変異株ライブラリーの解析により、ピルビン酸/リン酸ジカイネース、アセチルCoAシンターゼ、イソクエン酸リアーゼをコードすると推定される遺伝子が本表現型に必須であることを明らかにし、UT26株の全ゲノム配列情報も利用して、PPCによるCO<sub>2</sub>固定を伴うグリオキシル酸回路が超低栄養条件下での同化過程として機能している可能性が高いという重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：An aerobic and heterotrophic bacterium *Sphingobium japonicum* UT26 shows oligotrophic growth phenotype, i.e., growth on minimal salt medium without the supply of any carbon source, by the over expression of the *adhX* gene. Transposon mutagenesis toward the UT26 variant over-expressing the *adhX* gene and the subsequent analysis of the mutants demonstrated that the putative acetyl-CoA synthetase, pyruvate/phosphate dikinase, and isocitrate lyase genes are necessary for the oligotrophic phenotype. By combining with the genome information of UT26, it was strongly suggested that glyoxylate cycle accompanying with the CO<sub>2</sub>-fixation process catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase is involved in the oligotrophic phenotype of the UT26 variant.

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：炭酸固定 独立栄養細菌 環境細菌 極貧有機炭素源環境 微生物機能開発

## 1. 研究開始当初の背景

自然環境の大部分は極貧栄養状態であり、環境中に棲息する微生物においては当該環境への適応戦略が、環境中での生育のために極めて重要である。特に地球表層環境に広く棲息する好気性従属栄養細菌では、炭素源となる有機物の確保と有効利用は必須であり、低栄養環境下では、一般に、「低栄養条件」を察知し、緊縮状態あるいは休眠状態になることで、生命活動によるエネルギー消費を最小限に抑えて堪え忍んでいると考えられており、限られた栄養条件下での生育を支える分子機構として、ppGpp が緊縮制御因子(アラームオン)として関与する緊縮制御などの解明が進んでいる。しかし、極めて少ない栄養を有効に利用して生育可能であれば、細菌には更に有利であり、そのための適応機構の存在も予想される。実際、環境試料からの微生物培養時には、通常用いられる富栄養培地をそのままの濃度で用いるよりも、数倍から 100 倍程度希釈して用いる方が適している。すなわち、極貧栄養条件下での生育は大多数の環境細菌が本来備えている機能であると推定されるが、科学的再現性の困難さもあり、この観点に着目して、極貧栄養環境下での生育機構解明を目的とした研究はない。

一方、申請者らは長年、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤 $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH)を唯一炭素源として生育・資化する好気性従属栄養細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株を対象とし、本菌株 $\gamma$ -HCH 分解代謝系を解明する研究に従事してきた。一連の研究過程で UT26 株の突然変異株を取得し、 $\gamma$ -HCH を唯一炭素源として加えた無機培地 (W 培地) で野生株に比べて見かけ上の高い $\gamma$ -HCH 分解活性を発揮する誘導体株を取得した。これら突然変異株は富栄養培地でも容易に培養できたが、野生株と異なり、有機炭素源非添加の無機寒天培地でも、コロニー形成を十分に視認できる性質を獲得していた。UT26 株では遺伝子操作系確立と全ゲノム配列決定が完了していることから、「極貧有機炭素源条件下での生育」を支える分子機構の解明に適した研究対象と考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、(a)上記突然変異株が大気中 CO<sub>2</sub> を固定していること、(b) 特定アルコールデヒドロゲナーゼホモログ(AdhX)高発現が本表現型の要因となり得ること、を解

明した。さらに、(c) *adhX* 高発現 UT26 誘導体株から、極貧栄養環境下での生育能を再び喪失したトランスポゾン突然変異株を取得し、トランスポゾン挿入部位を同定することで、大気中 CO<sub>2</sub> の固定に関与している可能性のある候補遺伝子を同定した。これら研究を更に詳細に進めて、広範な好気性従属栄養環境細菌群が有する新規な CO<sub>2</sub> 固定能、および極貧環境下での生育機構の詳細を解明することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

$\alpha$ -proteobacteria に属して好気性の従属栄養細菌である *Sphingobium japonicum* UT26 株のトランスポゾン突然変異体ライブラリーを構築し、W 無機培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9.8 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g; MgSO<sub>4</sub>, 48.7 mg; FeSO<sub>4</sub>, 0.52 mg; MgO, 10.75 mg; CaCO<sub>3</sub>, 2.0 mg; ZnSO<sub>4</sub>, 0.81 mg; CuSO<sub>4</sub>, 0.16 mg; CoSO<sub>4</sub>, 0.15 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.06 mg; per liter)に炭素源としてコハク酸を添加した寒天培地での生育は良好だが、 $\gamma$ -HCH 添加 W 無機寒天培地上で生育が不能或いは著しく低下した誘導体株の選択により、 $\gamma$ -HCH 分解代謝関連遺伝子群の同定・解析を実施してきた。その際に、 $\gamma$ -HCH 添加寒天培地上で野生株よりも生育が良好で、見かけ上 $\gamma$ -HCH 分解活性が上昇した突然変異株も複数取得した。当該突然変異株は、野生株が全く生育しない炭素源非添加 W 無機寒天培地でもコロニーが視認できるほどの生育をみせたことから、 $\gamma$ -HCH 資化能向上株ではなく、極貧有機炭素源条件下で良好に生育する変異株であると強く示唆された。さらに、これに続く予備的実験結果より、当該変異株は、(a) 野生株に比べて放射性ラベルした <sup>14</sup>C<sub>2</sub> を効率的に生体成分として固定していること、(b) 複数の突然変異株において、*adhX* 上流域にトランスポゾンが挿入されており、*adhX* 高発現が極貧有機炭素源条件下で良好に生育する表現型の要因となり得ること、(c) *adhX* 高発現株を更にトランスポゾン挿入で変異を誘発した誘導体株の中には、極貧有機炭素源条件下で生育不能になった株が存在すること、を明らかにした。そこで、本研究では、特に「UT26 株で *adhX* 遺伝子が高発現すると炭素源非添加無機培地で生育可能となる現象」に着目し、(1) 有機炭素源非添加無機培地で生育する突然変異株の解析、(2) *adhX* 遺伝子の機能解析、(3) *adhX* 遺伝子高発現株のトランスポゾン突然変異株の解析、を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 有機炭素源非添加無機培地で生育する突然変異株の解析

有機炭素源非添加無機培地で良好に生育する UT26 株のトランスポゾン突然変異株のうち、複数の突然変異株において、*adhX* の上流域にトランスポゾンが挿入されており、トランスポゾン上に存在する構成的なプロモーター活性で *adhX* が高発現することが、当該表現型の原因となっていることが予想された。そこで、UT26 株中で構成的に高発現するプロモーター支配下の *adhX* 遺伝子を広宿主域ベクターを利用して UT26 株に導入したところ、当該表現型を示した。さらに、定量 RT-PCR を実施し、当該表現型を示す変異株では、*adhX* 遺伝子が野生株に比べて高発現していることを明らかにした。一方、*adhX* 遺伝子高発現株でも、元のトランスポゾン突然変異株と同様に、大気中の標識 CO<sub>2</sub> の取り込みが観察された。以上の結果から、UT26 株において、*adhX* 遺伝子が高発現することで、大気中の CO<sub>2</sub> の固定を伴って有機炭素源非添加無機培地でコロニー形成すると結論した。

##### (2) *adhX* 遺伝子の機能解析

AdhX は推定アミノ酸配列の相同性解析から、NAD 依存的アルコールデヒドロゲナーゼ活性、あるいはホルムアルデヒドジスミターゼ活性を有することが予想され、それら活性に必要なアミノ酸残基も保存されている。そこで、これら保存アミノ酸残基に部位指定変異を導入した変異型 *adhX* 遺伝子を複数作製し、(a) 大腸菌で発現させた変異型 *adhX* 産物の酵素活性、(b) 変異型 *adhX* 遺伝子を高発現させた UT26 誘導体株での当該表現型発揮の有無を検討した。その結果、*adhX* 遺伝子産物のアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 活性に必須と推定されるアミノ酸残基に変異を導入した変異型 *adhX* 高発現株では、ADH 活性が低下し、AdhX が ADH 活性を有することが示された一方で、ADH 活性が低下した株でも当該表現型に変化はなく、ADH 活性自身は当該表現型と無関係である可能性が示唆された。しかし、本解析に用いた株は、染色体に野生型の *adhX* 遺伝子を有しており、これが当該活性に影響を及ぼした可能性も否定できない。今後、野生型の *adhX* 遺伝子を完全

欠失した株で同様の実験を行い、AdhX 機能と当該表現型との関係を解析する必要がある。

##### (3) *adhX* 遺伝子高発現株のトランスポゾン突然変異株の解析

*adhX* 高発現株のトランスポゾン変異株ライブラリーを作製し、約 3,000 株のスクリーニングの結果、当該表現型に変異を持つ株を 7 株取得した。うち 3 株のトランスポゾン挿入部位を同定し、当該表現型に関与する候補遺伝子として、推定 acetyl-CoA synthetase 遺伝子、推定 pyruvate/phosphate dikinase 遺伝子、推定 isocitrate lyase 遺伝子を得た。さらに、これら候補遺伝子の再破壊と相補実験を実施し、有機炭素源非添加無機寒天培地上での生育と大気中 CO<sub>2</sub> の取り込みを検討した結果、これら 3 つの遺伝子が本表現型に実際に関与している結果を得た。これら遺伝子産物は、TCA 回路の派生あるいは関連経路を触媒する酵素であり、UT26 株の全ゲノム配列情報も利用して、phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC) による CO<sub>2</sub> 固定を伴うグリオキシル酸回路が超低栄養条件下での同化過程として機能している可能性が高いという重要な知見を得た。

##### (4) 総括

本研究を通じて、好気性従属栄養細菌が有機炭素源非添加無機寒天培地上で生育可能になるという現象に関して、PPC による CO<sub>2</sub> 固定を伴うグリオキシル酸回路が超低栄養条件下での同化過程として機能している可能性が高いという重要な知見を得ることができた。残念ながら、研究期間内に AdhX の機能を含めて機構の詳細の解明には至らなかったが、複数の鍵遺伝子の同定と仮説の提唱ができたことから、当初の目的はほぼ達成できたと考えている。本研究で得られた成果は、現時点では学術雑誌に未発表のものも含まれるが、これらについては今後発表していく予定である。

また、本研究で扱った環境細菌を対象とした関連研究に関する成果も得られた。今回の科学研究費の受領が研究代表者らの行っている環境細菌に関する一連の研究をさらに進展させる上で多大な援助になったことはいまでもなく、ここに心から感謝の意を表したい。また、本研究に携わった大学院学生および研究協力者の諸氏にもこの機会にあ

わせて謝意を表したい。

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 17 件 全て査読あり)

1. **Ohtsubo Y, Kishida K, Sato T, Tabata M, Kawasumi T, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y.** 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain TKP, Isolated from a gamma-Hexachlorocyclohexane-Degrading Mixed Culture. *Genome announcements* **2**:e01241-13. doi: 10.1128/genomeA.01241-13
2. **Shintani M, Ohtsubo Y, Fukuda K, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, Fujita N, Nagata Y, Tsuda M, Hatta T, Kimbara K.** 2014. Complete Genome Sequence of the Thermophilic Polychlorinated Biphenyl Degradator *Geobacillus* sp. Strain JF8 (NBRC 109937). *Genome announcements* **2**:e01213-13. doi: 10.1128/genomeA.01213-13
3. **Ohtsubo Y, Sato T, Kishida K, Tabata M, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y.** 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1, Isolated from a Microbial Community Enriched by the Technical Formulation of Hexachlorocyclohexane. *Genome announcements* **2**:e01130-13. doi: 10.1128/genomeA.01130-13
4. **Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K.** 2014. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplifies Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes. *DNA Res* **21**:217-227. doi: 10.1093/dnares/dst052
5. **Ohtsubo Y, Fujita N, Nagata Y, Tsuda M, Iwasaki T, Hatta T.** 2013. Complete Genome Sequence of *Ralstonia pickettii* DTP0602, a 2,4,6-Trichlorophenol Degradator. *Genome announcements* **1**:e00903-13. doi: 10.1128/genomeA.00903-13
6. **Inoue K, Miyazaki R, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** 2013. Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* nitrogen-related phosphotransferase system on conjugative transfer of IncP-9 plasmid from *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* **345**:102-109. doi: 10.1111/1574-6968.12188
7. **Tabata, M., Y. Ohtsubo, S. Ohhata, M. Tsuda, and, Y. Nagata.** Complete genome sequence of the  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. stain MM-1. *Genome Announcements*. **1** (3): e00247-13 (2013) doi: 10.1128/genomeA.00247-13
8. **Okai, M., J. Ohtsuka, L.F. Imai, T. Mase, R. Moriuchi, M. Tsuda, K. Nagata, Y. Nagata, and M. Tanokura.** Crystal structure and site-directed mutagenesis analysis of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingobium* sp. MII205. *J. Bacteriol.* **195**: 2642-2651 (2013) doi: 10.1128/JB.02020-12
9. 永山浩史、菅原智詞、遠藤諒、加藤広海、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝 機能相補による芳香族化合物複合汚染土壌からの新規分解酵素遺伝子の検索 *Journal of Environmental Biotechnology* **13**(1): 51-56 (2013)
10. **Hassan, K. A. Gora, J. Brezovsky, R. Chaloupkova, H. Moskalikova, A. Fortova, Y. Nagata, J. Damborsky, Z. Prokop.** The effect of a unique halide-stabilizing residue on the catalytic properties of haloalkane dehalogenase DatA from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *FEBS J.* **280**: 3149-3159 (2013) doi: 10.1111/febs.12238
11. **Yano, H., H. Genka, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, E.M. Top, M. Tsuda:** Coincidence-resolution of toluene-catabolic transposon Tn4651. *Plasmid.* **69**: 24-35 (2013) doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.004
12. **Ohtsubo Y, Maruyama F, Mitsui H, Nagata Y, Tsuda M:** Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a polychlorinated biphenyl-degrading strain. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971 (2012) doi: 10.1128/JB.01848-12
13. **Miyakoshi M, Shintani M, Inoue K, Terabayashi T, Sai F, Ohkuma M, Nojiri H, Nagata Y, Tsuda M:** ParI, an orphan ParA family protein from *Pseudomonas putida* KT2440-specific genomic island, interferes with the partition system of IncP-7 plasmids. *Environ Microbiol.* **14**: 2946-2959 (2012) doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02861.x
14. **Ohtsubo, Y., F. Maruyama, H. Mitsui, Y. Nagata, M. Tsuda:** Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a polychlorinated biphenyl-degrading strain. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971 (2012) doi: 10.1128/JB.01848-12
15. **Miyakoshi, M., M. Shintani, K. Inoue, T. Terabayashi, F. Sai, M. Ohkuma, H. Nojiri, Y. Nagata, M. Tsuda:** ParI, an orphan ParA family protein from *Pseudomonas putida* KT2440-specific genomic island, interferes with the partition system of IncP-7 plasmids. *Environ Microbiol.* **14**: 2946-2959 (2012) doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02861.x
16. **Mase, T., H. Yabuki, M. Okai, J. Ohtsuka, F. L. Imai, Y. Nagata, and M. Tanokura.** Crystallization and preliminary X-ray analysis of the haloalkane dehalogenase DatA from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Acta Crystallographica Section F* **F68**: 652-654

(2012) doi: 10.1107/S1744309112013942

17. **Ohtsubo Y., Y. Ishibashi, H. Naganawa, S. Hirokawa, S. Atobe, Y. Nagata, M. Tsuda:** Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. strain KKS102, which are located on an integrative and conjugative element. *J Bacteriol* 194:4237-4248. (2012) doi: 10.1128/JB.00352-12

[学会発表] (計 56 件)

(招待講演、シンポジウム、国際学会等、主な発表 8 件のみを記載)

1. 永田裕二, 平野丈, 宇井博紀, 大坪嘉行, 津田雅孝 「有機塩素系殺虫剤分解能を有するスフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機寒天培地での生育を司る機構に関する研究」日本農芸化学会2014年大会 2014年3月27-30日, 東京 (口頭発表)
2. 永田裕二, 森内良太, 田中裕興, 大坪嘉行, 津田雅孝 「累積置換変異導入によるハロアルカンデハロゲナーゼLinBのbeta-HCH分解活性の機能進化に関する研究」環境バイオテクノロジー学会2013年度大会 2013年5月30日-6月1日, 北九州 (口頭発表)
3. 永田裕二 「人為起源物質分解細菌の出現と進化」日本農芸化学会第20回記念フロンティアシンポジウム 2013年3月27-28日 仙台 (招待講演)
4. 永田裕二, 田端理朗, 大畑智史, 大坪嘉行, 津田雅孝 「人為起源環境汚染物質分解能を有するスフィンゴモナス細菌群のゲノムと可動性遺伝因子に関する研究」日本農芸化学会 2013年大会 2013年3月24-27日 東北大学 (仙台) (口頭発表)
5. 永田裕二, 大畑智史, 田端理朗, 大坪嘉行, 津田雅孝 「人為起源物質分解能を有する sphingomonad 細菌群のゲノムと可動性遺伝因子」第7回日本ゲノム微生物学会 2013年3月8-10日 長浜バイオ大学 (長浜) (口頭発表)
6. 永田裕二, 田端理朗, 大畑智史, 大坪嘉行, 津田雅孝 「有機塩素系殺虫剤 gamma-HCH 分解細菌のゲノムと可動性遺伝因子に関する研究」第64回日本生物工学会大会 2012年10月23-26日, 神戸 (口頭発表)
7. **Y. Nagata, M. Tabata, S. Ohhata, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda.** Genomes and mobile genetic elements of gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012) Daegu, Korea, September 16-21, 2012 (口頭発表)
8. 永田裕二, 遠藤諒, 大坪嘉行, 津田雅孝 「細菌の有機塩素系殺虫剤分解資化能力を支える ABC トランスポーター」第7回トランスポーター研究会年会 京都, 2012年6月9-10日 (招待講演)

[図書] (計 2 件)

1. **Nagata Y, Tabata M, Ohhata S, Tsuda M:** Appearance and evolution of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacteria. *In:* Nojiri H, Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (eds) *Biodegradative Bacteria*. Springer Verlag, Tokyo, pp 19-41 (2014) doi: 10.1007/978-4-431-54520-0\_2
2. **Ohtsubo Y, Nishiyama E, Ishibashi Y, Nagata Y, Tsuda M:** Strategies to reveal genomic function in natural soil systems. *In:* Nojiri H, Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (eds) *Biodegradative Bacteria*. Springer Verlag, Tokyo, pp 279-291 (2014) doi: 10.1007/978-4-431-54520-0\_14

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 裕二 (NAGATA YUJI)  
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 30237531

### (2) 研究分担者

津田 雅孝 (TSUDA MASATAKA)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号: 90172022

大坪 嘉行 (OHTSUBO YOSHIYUKI)  
東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号: 40342761