

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650139

研究課題名(和文) 土壌プロテオミクスによる自然環境下の細菌個生態学的研究

研究課題名(英文) Bacterial autecology in soil environments by using proteomics

研究代表者

笠原 康裕 (Kasahara, Yasuhiro)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20273849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：土壌細菌 *Pseudomonas putida* F1株の土壌培養系と液体培養系の比較プロテオーム解析を行い、土壌環境特異的に発現する遺伝子の検出を行った。(1)F1株の接種土壌から直接法および間接法による環境タンパク質抽出を行い、タンパク質の同定数や種類の比較解析を行った。両手法に長所短所があり、研究目的により使い分ける必要がある。(2)土壌特異的発現遺伝子として5遺伝子で構成される1オペロンと2遺伝子を特定した。発現因子解析から、遺伝子の一つはNOによって発現した。オペロンの発現は、ある種の土壌成分の欠乏が誘導を促すことを見いだした。本研究より細菌が取り巻く微小環境を知ることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：To detect soil-specific expressed genes, comparative proteome analysis of the global behavior of *Pseudomonas putida* F1 between three soils and liquid batch culture was performed. (1) We studied direct and indirect protein extraction methods by comparing the number of the identified proteins and their functional and taxonomical distributions. We demonstrated the advantages and disadvantages of the two extraction methods that can be applied to complex natural soils. (2) Two genes and 1 operon consisted of 5 genes as a soil-specific expressed gene were identified. From expression factor analysis, one of the genes was expressed by NO. Expression of the operon was found to be the lack of certain soil components. It became possible to know the microenvironment surrounding the bacteria in this study.

研究分野：ゲノム微生物学、微生物生態学

キーワード：メタプロテオーム 土壌細菌 個生態学

1. 研究開始当初の背景

『自然環境中で細菌はどのような生理状態や代謝で生息しているのか?』、『遺伝子は存在するが、環境中で発現し、機能しているのか?』、微生物生態学の長年の重要課題である。

申請者は、芳香族分解遺伝子群をもつ土壌細菌 *Pseudomonas putida* F1 株の芳香族分解経路と分解関連遺伝子群との関係を質量分析計を用いたプロテオーム解析によって明らかにしてきた。このように試験管内で観察される活性や遺伝子発現は、「本来の生息場所である土壌でも同様に観察されるのだろうか?」申請者はこの疑問を明らかにした。*P. putida* F1 株を接種・培養した未滅菌土壌に芳香族を添加し、6、12、18 日間培養後に、土壌より抽出したタンパク質の二次元ゲル電気泳動法とプロテオーム解析から、芳香族分解遺伝子群の発現を検出した。細菌は土壌中でも試験管実験と同様な活性と遺伝子発現を行っていることを証明した。

これより、細菌細胞内の特定の代謝のみに着目するのではなく、ゲノムワイドな解析を行うことによって、(i)土壌中に生息する細菌の生理状態を知ることができ、(ii)遺伝子の発現動態を知ることによって細菌を取り巻くミクロな環境を推測することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、土壌モデル細菌の代表である *P. putida* F1 株について、F1 株の特徴を利用して、土壌(水田、畑地、森林など)中での発現タンパク質動態と微小環境との関連性から、自然状態での代謝や生理状態を明らかにする。比較対象として、(1)液体培養でのプロテオーム解析を行う。土壌培養過程で経時的サンプリングを行い、(2)環境タンパク質より供試細菌タンパク質の検出・同定(メタプロテオーム解析)を行う。土壌中で供試菌株と土着微生物群との関連性のため(3)土壌試料より抽出した環境タンパク質を用いた微生物群集構造の解析を行う。また培養中の土壌成分変化の観察のための(4)土壌の化学的物性分析を行う。これら解析データについてサンプル間比較の統合的解析を行う。

3. 研究の方法

供試菌株：代表的な土壌細菌である、*Pseudomonas putida* F1 株(ゲノム解析完了株)を使用した。

供試土壌：異なったタイプの土壌：ダイズ畑(埼玉県)、トウモロコシ畑(宮崎県)、森林(北海道)を使用した。

(1)土壌の化学的分析

各土壌試料について、pH、C/N 比、全炭素量、アンモニア態・硝酸態窒素量、リン酸量、および細菌生菌数を測定した。

(2)土壌中の F1 株の生菌数測定

土壌培養 3 日間について 1 日ごとに F1 株の生菌数を測定した。土壌 1 グラムを適時希釈し、アンピシリンを添加した LB 寒天培地に接種し、30℃ で 24 時間培養した。

(3)土壌からのタンパク質抽出法

土壌からの環境タンパク質の抽出は、直接抽出法と間接抽出法を行った。

直接抽出法：土壌 2 グラムをトリクロロ酢酸/アセトンおよびアセトンで洗浄後、SDS-フェノール混合液で攪拌後、フェノール層を回収しエタノール、イソプロパノールによるタンパク質沈殿を行い、環境タンパク質を得た。

間接抽出法：土壌 12 グラムからニコデッツを用いた密度遠心勾配法により細菌細胞を分画し、その細胞から直接抽出法のプロトコールにより環境タンパク質を得た。

(4)プロテオミクス

液体培養下での発現タンパク質の抽出

標準的な液体培地における F1 株の基礎的な発現タンパク質群の同定解析を行う。使用培地は LB 培地と最小培地であり、培養温度 30℃ で、OD_{0.3}(対数期)と培養 25 時間後(定常期)で集菌した。集菌細胞から ReadyPrep Protein Extraction Kit(Total Protein)を用いてタンパク質を抽出し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)により分離を行った。

細菌の土壌接種と培養下の発現タンパク質の抽出

土壌 50 グラム(0.5%グルコース添加)をペトリ皿に入れ、土壌 1 グラムあたり F1 株 10⁸ 細胞を接種した。F1 株接種土壌は、水分含量(50%)を保持しながら、30℃ で培養を 3 日間行った。土壌からのタンパク質抽出は、間接抽出法を用いた。抽出タンパク質は SDS-PAGE により分離した。F1 株接種土壌は、各土壌 3 連で行った。対象として F1 株無接種土壌について同様の操作と解析を行った。

質量分析計によるタンパク質の同定・検出
液体培養と土壌培養の SDS-PAGE により分離したタンパク質の泳動ゲルを、約 1mm 間隔で約 60 ゲル片切断し、ゲル内消化法を用いて試料を作製した。リニアイオントラップ型タンデム質量分析計 nanoLC/MS/MS によりペプチド解析を行った。発現タンパク質は Mascot を用いて同定を行った。同定検索に用いたデータベースは F1 株のゲノム配列である。

4. 研究成果

(1)土壌からのタンパク質抽出法の比較

P. putida F1 株を接種、培養した土壌から直接法および間接法を用いて、環境タンパク質を抽出し、同定タンパク質の数や種類比較解析を行った。F1 株タンパク質同定数は直接法が 1468、間接法が 1481 でわずかではあるが間接法が多く検出された。同定タンパク質

の Cluster of Orthologous Group(COG)による機能カテゴリーの割合は両手法でほぼ同じであった。また、細胞内局在(サイトプラズマ、細胞内・外膜など)の検出タンパク質の割合も両手法でほぼ同じであった。これら解析から手法によらず、どのタンパク質も偏りなく同定される。細菌ゲノム解析株データベースによるタンパク質の同定検索による帰属細菌種の多様性解析から、直接法は、間接法より多様な細菌種からタンパク質が検出された。これは、細菌群集の多様性解析には良いアプローチであることを示した。また、直接法は細胞分画の操作が不要であり、操作や処理が簡便という有利性がある。一方で、直接法は土壌夾雑物を多く含むため、質量分析計のラインやカラムを詰まらせる原因となり、システムチックな質量分析計解析が困難な点がある。また、細菌種以外の生物種のタンパク質が存在するため目的土壌細菌種の発現解析の検出・同定率の低下を招く点も明らかにした。

これら結果より、両手法において長所短所があり、土壌や解析目的により、使い分ける必要がある。本研究は、F1株の発現タンパク質を対象とするため、間接法による抽出法を用いた。

(2) F1株の土壌特異的発現遺伝子の同定

P. putida F1株は、5250 遺伝子中約 22%が機能未知遺伝子である。また、標準的培地での培養では、アノテーションされた遺伝子も含め、多くの発現しない遺伝子が存在する。これらの中には、細菌が生来生息する環境でのみ発現・機能する遺伝子が存在すると考えられる。土壌環境で特異的に発現する遺伝子を検出するため、F1株の土壌培養系と液体培養系の比較プロテオーム解析を行った。

各培養系において検出されたタンパク質量数(非冗長数)は液体培養系が 2643、ダイズ土壌 1364、トウモロコシ土壌 1273、森林土壌 816 であった。液体培養系で検出されず土壌でのみ検出されたタンパク質は 186 であった。そのうち 3 種の土壌でのみ共通に検出されたタンパク質は 9 であった(図 1)。

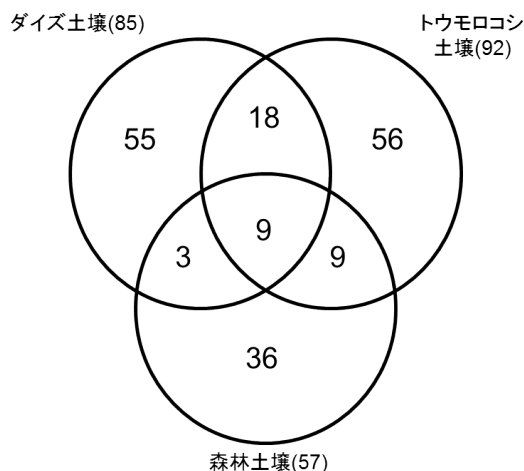


図1. 土壌培養系でのみ検出されたタンパク質量数

これら 9 つの候補遺伝子から土壌特異的発現遺伝子を特定するために、F1株未接種土壌のプロテオーム解析と候補遺伝子の情報学的解析により、7 遺伝子を土壌特異的発現遺伝子と特定した。それらは、機能未知遺伝子 1 つ、アノテーションより推定された一酸化窒素ジオキシゲナーゼ遺伝子(NOD)1 つ、5 つの遺伝子から構成される機能未知オペロンであった。

(3) F1株の土壌特異的遺伝子の発現解析

7 つの土壌特異的遺伝子の発現因子の同定を行った。NOD 遺伝子はアノテーションの情報から環境中の NO によって発現誘導されることが予想されるため、NO を添加した最小培地で F1株の培養を行った。この F1株のプロテオーム解析結果より、NOD タンパク質が検出された。これより、土壌中において他の微生物より産生された NO によって発現したことを示した。

5 遺伝子からなる 1 つのオペロンについて、土壌と液体培地の構造・組成比較から、発現因子の特定を試みた。まず土壌粒子界面の影響や生物間相互作用を検討するために、それら作用を排除した土壌抽出液や滅菌土壌について、F1株を接種した培養のプロテオーム解析を行った。この結果、オペロンの発現には界面や他の生物の影響は関係なかった。次に、腐植酸や金属イオン(鉄、マンガン、カルシウムなど)など土壌成分を液体培地上で精査した。それより、土壌の主成分の欠乏がオペロンの発現を誘導していると推測した。今後、転写解析等により確認を行っていく予定である。

孤独遺伝子である機能未知遺伝子は情報学的解析からも手がかりが得られず、今回は発現因子が未知のままとなった。

本研究の結果、土壌環境中に生存する細菌(目的とする特定の細菌)の発現タンパク質を解析することにより、その細菌を取り巻く微小環境を推測することができることが明らかとなった。また、新たな機能未知遺伝子の発現が明らかとなったことから、細菌の新たな生理機構や遺伝子発現動態への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Bao, Z., T. Okubo, K. Kubota, Y. Kasahara, H. Tsurumaru, M. Anda, S. Ikeda, K. Minamisawa: Metaproteomic Identification of Diazotrophic Methanotrophs, and their Tissue Localization in Field-grown Rice Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 5043-5052. (2014)(査読有)
DOI: 10.1128/AEM.00969-14

Takada, H., S. Fukushima-Tanaka, M.

Morita, Y. Kasahara, S. Watanabe, T. Chibazakura, H. Hara, K. Matsumoto and H. Yoshikawa: An essential enzyme for phospholipid synthesis has a crucial role in *Bacillus subtilis* cell division. *Molecular Microbiology* 91: 242-255. (2014)(査読有)
DOI: 10.1111/mmi.12457

Morimoto, H., M. Kuwano and Y. Kasahara: Gene expression profiling of *Pseudomonas putida* F1 after exposure to aromatic hydrocarbon in soil by using proteome analysis. *Archives of Microbiology* 195: 805-813. (2013)(査読有)
DOI: 10.1007/s00203-013-0932-4

[学会発表](計4件)

K. Minasamiwa, Z. Bao, S. Ikeda, T. Okubo, H. Imaizumi-Anraku, K. Kubota, Y. Kasahara, D. Liu, S. Asakawa : N₂-fixing methanotroph as non-leguminous rhizobia in paddy rice roots. 14th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. (October 30 - November 2, 2014. Chengdu, China)

K. Minamisawa, S. Ikeda, Z. Bao, T. Okubo, A. Watanabe, K. Sasaki, H. Imaizumi-Anraku, T. Tokida, K. Kubota, Y. Kasahara, D. Liu, T. Watanabe, J. Murase, S. Asakawa, M. Anda, H. Tsurumaru, R. Shinoda, T. Sato: No nitrogen fertilization changes rice root microbiome abundant in diazotrophic methanotrophs through a plant symbiosis gene. 15th International Symposium on Microbial Ecology (August 24-29, 2014. Seoul, Korea)

包智華、大久保卓、久保田健吾、笠原康裕、鶴丸博人、按田瑞恵、池田成志、南澤 究：水稻根における窒素固定メタン酸化細菌のメタプロテオーム同定と組織局在性、2014年9月9-11日、日本土壌肥料学会2014年度大会、東京農工大学(東京都・小金井市)

佐々木祥平、門屋亨介、笠原康裕、南澤究、三井久幸：プロテオーム解析に基づく鉄硫黄タンパク質合成機構が細菌環境適応に果たす役割解明、2014年3月10-12日、第8回日本ゲノム微生物学会年会、東京農業大学(東京都・世田谷区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 康裕 (KASAHARA YASUHIRO)