

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660054

研究課題名(和文)細菌の超低栄養好気的条件下での生育に機能する基礎代謝経路の全貌解明

研究課題名(英文)Studies on metabolic pathway involved in oligotrophic growth of heterotrophic bacteria

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) 3,000,000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株で見出された「adhX遺伝子が高発現すると大気中のCO<sub>2</sub>を取り込みながら有機炭素源非添加無機固体培地で生育可能となる現象」を解析し、adhXがアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードし、当該活性と本表現型とに相関関係があることを示すと共に、adhX依存的な本表現型が環境常在細菌が有する普遍性の高い低栄養環境適応戦略機構のひとつである可能性を提示した。

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 accompanying with the CO<sub>2</sub>-fixation, by the over expression of the adhX gene. Protein product of adhX showed alcohol dehydrogenase activity, and its activity had equilateral correlation with the oligotrophic phenotype. Furthermore, it was strongly suggested that the adhX-dependent oligotrophic phenotype is one of the bacterial fundamental mechanisms for adaptation to oligotrophic conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：炭酸固定 oligotroph スフィンゴモナッド グリオキシル酸回路 次世代型シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

自然環境の大部分は低栄養状態であり、環境中に棲息する微生物にとって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にとって、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、「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いる。しかし、極めて少ない栄養を効率的に利用して細胞増殖可能であれば、細菌には更に有利であり、そのための適応機構の存在が予想される。実際、環境試料から炭素源非添加無機培地でコロニーを形成する細菌株は比較的容易に単離できるし、大多数の環境細菌は、通常用いる富栄養培地濃度より、数倍から 100 倍程度希釈した低栄養培地の方が培養に適している。一方、我々は、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・資化できる好気性従属栄養細菌で、*Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株を対象とし、本菌株の  $\gamma$ -HCH 分解代謝系を解明する研究に長年従事してきた。一連の研究過程で、(1) 有機炭素源非添加の無機培地で  $\text{CO}_2$  固定を伴いコロニー形成する突然変異株を複数取得した。さらに、(2) アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) ホモログ遺伝子 (*adhX*) の高発現が本表現型の直接要因であることを明示し、(3) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PPC) による  $\text{CO}_2$  固定を伴うグリオキシル酸回路が本表現型の同化過程として機能していることを強く示唆する結果を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、UT26 株で見出された有機炭素源非添加無機固体培地で  $\text{CO}_2$  固定を伴いコロニー形成する現象 (oligotrophic 表現型と呼ぶ) の機構を解明すると共に、その普遍性を明示し、有用細菌の超低栄養条件下での培養への可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 先行研究で得られた oligotrophic 表現型に關与する候補遺伝子と推定關与遺伝子の破壊株・相補株を作製し、これら遺伝子の

当該表現型への關与を、有機炭素源非添加無機固体培地上での生育と  $^{14}\text{CO}_2$  固定量で評価した。

(2) *adhX* 産物およびその変異酵素を大腸菌で高発現・精製し、その ADH 活性を評価した。また、*adhX* 遺伝子完全欠失株を作製し、本株で *adhX* 遺伝子および変異型遺伝子を高発現して、ADH 活性と oligotrophic 表現型との關係性を明らかにした。

(3) 本表現型に關与する遺伝子を網羅的に同定するために、古典遺伝学的なトランスポゾン (Tn) 挿入突然変異株取得法と次世代型シーケンサーを組み合わせた新規手法を開発した。

(4) UT26 株由来の *adhX* 遺伝子を他株で高発現させ、本表現型の普遍性を検討した。

(5) UT26 株および類縁細菌株のゲノム配列情報を利用して、*adhX* およびそのホモログについて *in silico* で精査した。

(6) UT26 株では spontaneous な oligotrophic 突然変異株が比較的容易に取得されるが、不均衡変異導入法 (DNA 複製のエラーを校正する機能を欠如した変異型 DNA ポリメラーゼを利用して高い突然変異を導入する手法) により変異率を高めた状態ではどうなるか検討した。

## 4. 研究成果

(1) oligotrophic 表現型に關連する候補遺伝子として同定された *acs*、*ppdk*、*aceA*、および当該表現型への關与が予想された *ppc* と *aceB* のうち、*aceA* は当該表現型に必須であること、*ppdk*、*acs*、*ppc* は必須ではないが關与していることを定量的に明示した。しかし、*aceB* の oligotrophic 表現型への明確な關与を示す結果は得られなかった。以上、全貌の解明には至らなかったものの、グリオキシル酸回路の oligotrophic 表現型への關与を支持する結果が得られた。

(2) AdhX がエタノール等の各種アルコール類に対して ADH 活性を示すこと、また、AdhX の ADH 活性の強さと oligotrophic 表現型に相關關係があることを明示した。

(3) 次世代型シーケンサー (Illumina 社

MiSeq)を用いた網羅的かつ定量的な Tn 挿入突然変異体の効率的解析法ををほぼ完成させた。本手法を本研究での解析に用いれば、本表現型に必須な遺伝子のみならず、関与遺伝子も網羅的かつ定量的に同定可能である。今後、UT26 株由来の *adhX* 高発現株の Tn 突然変異株ライブラリー(約 10,000 株)を作製し、本細胞集団を有機炭素源非添加無機固体培地で生育させた際の Tn 挿入部位と、有機炭素源を添加した無機固体培地で生育させた際のそれとの比較することで、oligotrophic 表現型に特異的に関与する遺伝子を網羅的かつ定量的に同定する予定である。

(4) UT26 株由来の *adhX* 高発現用プラスミドを、*Alphaproteobacteria* に属する UT26 株類縁の sphingomonad 細菌株、および *Betaproteobacteria* あるいは *Gammaproteobacteria* に属する細菌株に導入した結果、sphingomonad 細菌株だけでなく *Betaproteobacteria* に属する株でも oligotrophic 表現型を示す株が存在した。この結果は *adhX* 関与の oligotrophic 表現型は UT26 株だけの現象ではなく、ある程度の普遍性があることを示している。

(5) UT26 株の *adhX* が 2 種の Tn3 型トランスポゾンで挟まれた染色体上の領域に存在すること、および他の UT26 株類縁の sphingomonad 細菌株には UT26 株の *adhX* と高い identity を示すホモログ保有株と非保有株が存在し、保有株ではすべて当該領域がプラスミド等の可動性遺伝因子支配と推測される領域に局在することを明らかにした。この結果から、他細菌株にも *adhX* 関与の oligotrophic 表現型を示す潜在能力が備わっていると考えられた。

(6) UT26 株では、不均衡変異導入法により変異率を高めた状態で、高頻度で oligotrophic 突然変異株が取得されたが、*adhX* 完全欠失株では、変異率を高めた状態でも当該突然変異株は全く検出されなかった。この結果は、(4)と(5)の結果とも併せて、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型が環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応戦略のひとつであることを強く示唆している。

(7) 総括：

本研究を通じて、UT26 株で見出された *adhX* 関与の oligotrophic 表現型が、環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応戦略

のひとつである可能性を提示できた。すなわち、環境細菌の低栄養環境適応機構に関する新規性の高い重要な知見を得、有用細菌の超低栄養条件下での培養の可能性を示すことができたと考えている。残念ながら研究期間内に本機構の全貌解明には至らなかったが、そのための系の構築には成功し、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、今後、国際学術誌等で発表する予定である。

また、本研究で扱った環境細菌を対象とした関連研究の成果も多く得られた。このように、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うまでもなく、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 16 件 全て査読あり)

1. **Tabata M, Ohhata S, Kawasumi T, Nikawadori Y, Kishida K, Sato T, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y.** Complete genome sequence of a  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degrader, *Sphingobium* sp. strain TKS, which was isolated from a  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading microbial community. *Genome A* 4:e00247-16 (2016) doi:10.1128/genomeA.00247-16.
2. **Tabata M, Ohhata S, Nikawadori Y, Sato T, Kishida K, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y.** Complete genome sequence of a  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium* sp. strain MI1205. *Genome A* 4:e00246-16 (2016) doi:10.1128/genomeA.00246-16
3. **Minami T, Ohtsubo Y, Anda M, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Sugawara M, Minamisawa K.** Complete genome sequence of *Methylobacterium* sp. strain AMS5, an isolate from a soybean stem. *Genome A* 4:e00144-16 (2016) doi:10.1128/genomeA.00144-16
4. **Anda M, Ohtsubo Y, Okubo T, Sugawara M, Nagata Y, Tsuda M, Minamisawa K, Mitsui H.** Bacterial clade with the ribosomal RNA operon on a small plasmid rather than the chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:14343-14347 (2015) doi:10.1073/pnas.1514326112
5. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Numata M, Tsuchikane K, Hosoyama A, Yamazoe A, Tsuda M, Fujita N, Kawai F.** Complete genome sequence of *Sphingomyces macrogoltabidus* type strain NBRC 15033,

- originally isolated as a polyethylene glycol-degrader. *Genome A* **3**:e01401-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.01401-15
6. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Numata M, Tsuchikane K, Hosoyama A, Yamazoe A, Tsuda M, Fujita N, Kawai F.** Complete genome sequence of a polypropylene glycol-degrading strain *Microbacterium* sp. No.7. *Genome A* **3**:e01400-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.01400-15
  7. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Numata M, Tsuchikane K, Hosoyama A, Yamazoe A, Tsuda M, Fujita N, Kawai F.** Complete genome sequence of a polypropylene glycol and polyethylene glycol-degrading strain *Sphingopyxis macrogoltabida* EY-1. *Genome A* **3**:e01399-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.01399-15
  8. **Ohtsubo Y, Moriya A, Kato H, Ogawa N, Nagata Y, Tsuda M.** Complete genome sequence of a phenanthrene degrader *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC:110738). *Genome A* **3**:e01283-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.01283-15
  9. **Kato H, Mori H, Maruyama F, Toyoda A, Oshima K, Endo R, Fuchu G, Miyakoshi M, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Hattori M, Fujiyama A, Kurokawa K, Tsuda M.** Time series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Research* **22**:413-424 (2015) doi:10.1093/dnares/dsv023
  10. **Ohtsubo Y, Nagata Y, Numata M, Tsuchikane K, Hosoyama A, Yamazoe A, Tsuda M, Fujita N, Kawai F.** Complete genome sequence of a polyvinyl alcohol-degrading strain *Sphingopyxis* sp. 113P3 (NBRC 111507). *Genome A* **3**:e01169-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.01169-15
  11. **Kato H, Ogawa N, Ohtsubo Y, Oshima K, Toyoda A, Mori H, Nagata Y, Kurokawa K, Hattori M, Fujiyama A, Tsuda M.** Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPa45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. *Genome A* **3**:e00782-15 (2015) doi:10.1128/genomeA.00782-15
  12. **Nagayama H, Sugawara T, Endo R, Ono A, Kato H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:4453-4470 (2015) doi:10.1007/s00253-014-6322-2
  13. **Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:9865-9881 (2015) doi:10.1007/s00253-015-6954-x
  14. **Moriuchi R, Tanaka H, Nikawadori Y, Ishitsuka M, Ito M, Ohtsubo Y, Tsuda M, Damborsky J, Prokop Z, Nagata Y.** Stepwise enhancement of catalytic performance of haloalkane dehalogenase LinB towards  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *AMB Express* **4**:72 (2014) doi:10.1186/s13568-014-0072-5
  15. **Chaloupkova R, Prudnikova T, Rezacova P, Prokop Z, Koudelakova T, Daniel L, Brezovsky J, Ikeda-Ohtsubo W, Sato Y, Kutty M, Nagata Y, Smatanova IK, Damborsky J.** Structural and functional analysis of novel haloalkane dehalogenase with two halide-binding sites. *Acta Crystallographica Section D* **D70**:1884-1897 (2014) doi:10.1107/S1399004714009018
  16. **Nagata Y, Senbongi J, Ishibashi Y, Sudo R, Miyakoshi M, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **160**:883-891 (2014) doi:10.1099/mic.0.077057-0
- [学会発表](計51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. 稲葉慎之介, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝 環境常在細菌におけるアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* 関与の普遍的低栄養環境適応戦略 日本農芸化学会 2016年度大会 2016年3月27-30日 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
  2. 稲葉慎之介, 平野丈, 宇井博紀, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝 環境常在細菌が有する推定アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子関与の新規極貧栄養環境適応機構 第10回日本ゲノム微生物学会年会 2016年03月4-5日 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都、目黒区)
  3. **Nagata Y, Moriuchi R, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Haloalkane dehalogenases in bacteria. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015)(招待講演) 2015年12月15-20日 Honolulu, Hawaii, USA
  4. 永田裕二, 大坪嘉行, 津田雅孝 環境を汚染する難分解性農薬分解遺伝子群の水平伝播 第30回日本微生物生態学会年次大会シンポジウム「環境での遺伝子リスクの醸成:薬剤耐性と病原性の遺伝子伝播」(招待講演) 2015年10月17-20日 土浦亀城プラザ(茨城県、土浦市)
  5. 稲葉慎之介, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝 有機塩素系農薬分解細菌株の有機炭素源非添加無機固体培地での生育に関与する推定アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* の機能解析 環境バイオテクノロジー学会 2015年度大会 2015年6月29-30日 東京大学弥生キャンパス(東京都、文京区)
  6. 稲葉慎之介, 平野丈, 宇井博紀, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝 スフィンゴモナッド細菌株の有機炭素源非添加無機固体培地での生育に関与する推定アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* の解析 日本農芸化学会 2015年大会 2015年3月26-29日 岡山大学(岡山県、岡山市)
  7. 永田裕二, 田端理朗, 大畑智史, 荷川取佑

記,大坪嘉行,津田雅孝 完全ゲノム配列比較に基づいた人為起源有機塩素系殺虫剤  $\gamma$ -HCH 分解細菌の出現と進化の考察 環境微生物系学会合同大会 2014 2014 年 10 月 21~24 日 アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県、浜松市)

8. **Nagata Y, Tabata M, Ohhata S, Nikawadori Y, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Comparison of complete genome sequences of four  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonad strains. 15th Internantional Symposium on Microbial Ecology 2014 年 8 月 24~29 日 Seoul, South Korea

[図書] (計 1 件)

1. **Nagata Y, Tabata M, Ohtsubo Y, Tsuda M.** Biodegradation of Organochlorine Pesticides, Chapter 5.1.2 p. 1-30. *In* Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (ed), *Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition.* ASM Press, Washington, DC. (2015) doi:10.1128/9781555818821.ch5.1.2

[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