

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660076

研究課題名(和文)暗所に生きる細菌に体内時計は必要か？

研究課題名(英文)Are circadian rhythms essential for bacteria living in dark environments?

研究代表者

加藤 創一郎(Kato, Souichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：30597787

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)：本研究ではシアノバクテリア以外の原核生物における未知の概日リズムの実証を目的とした。(1)根粒菌Bradyrhizobium sp. BTAi1のシアノバクテリア時計遺伝子(KaiC)ホモログの破壊株を作製した。破壊株と野生株では生育には違いがなかったが、異なる明暗サイクル条件でのバクテリオクロロフィル産生量に違いがみられ、概日リズムの存在が示唆された。(2)温度を周期的に変動させ土壌微生物群を集積する実験、明暗条件を周期的に変動させウキクサ根圏微生物を集積する実験により、日周変動環境で良好に生育する微生物を集積した結果、12時間周期で特異的に優占する微生物を数種類特定できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was demonstration of circadian rhythms in prokaryotes except for Cyanobacteria. Exp. 1: We constructed a mutant strain of a rhizobacterium Bradyrhizobium sp. BTAi1, in which homologues of cyanobacterial clock gene (KaiC) were disrupted. While the growth of the mutant was essentially same as the wild type, higher bacteriochlorophyll production by the mutant was observed under some light-dark regimens, indicating existence of circadian rhythms in Bradyrhizobium sp. BTAi1. Exp. 2: Microorganisms that superiorly grow under diurnal fluctuation conditions were enriched. A) Soil bacteria were enriched under different temperature fluctuations and B) Bacteria in rhizosphere of Remna minor were enriched under different light/dark fluctuations. In the two enrichment cultures, we successfully identified some bacteria strains that specifically dominated in diurnal fluctuation conditions.

研究分野：応用微生物学、微生物生態学、環境微生物学

キーワード：微生物 概日時計 根粒菌 時計遺伝子 土壌微生物 ウキクサ 根圏微生物

1. 研究開始当初の背景

多くの生物は体内時計を持ち外界環境の周期的な変化を予測し適応している。その中でも特に約 24 時間周期の変動(日周変動)に適応するものは概日リズムと呼ばれ、ヒト・動物・植物・昆虫・カビ等、多くの生物がその機構を有している。しかし原核生物においては、シアノバクテリアなどの光合成能を持つもの以外では概日リズムの存在が実証されていない。とはいえ光に依存しない暗所に生きる微生物にとっても、ある種の環境要因の日周変動はその生育、活性に大きな影響を与えうる。例えば温度は多くの環境で日周変動し、微生物の活性に多大な影響を及ぼしうる。また動植物に寄生・共生する微生物にとっては、日周変動はより大きな影響を持ちうる。例えば植物根圏では、昼間は植物の光合成に由来する有機物や酸素が多量に供給されるが、夜間にはその供給は停止する。このような環境において、概日リズムを有する微生物が競争的なメリットを享受することは想像に難くない。さらに非光合成微生物における概日リズムの存在を支持するのが、シアノバクテリアの概日リズムの中核を担う遺伝子(KaiC 遺伝子)のホモログが多く、非光合成微生物で保存されているという事実である。以上のことから申請者は暗所に生きる微生物にも未知の概日リズム機構が存在するのではないかと考えた。

非光合成細菌における概日リズムについては、これまでにその存在を示唆する報告はいくつかあるものの、その実験的証明にまで至った例は存在しない。本研究においてその実証に成功すれば、世界で初めての報告となり、微生物学分野において大きなインパクトを与える成果となる。また本研究の成果は、非光合成微生物の進化・生態、未知微生物の新規培養技術の開発、動植物-微生物間相互作用といった様々な研究分野に対し新たな側面からの知見・方法論を与えることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 種類の実験を通して、非光合成微生物の持つ未知の概日リズムを実証することを目的とした。

【実験 A】シアノバクテリアの時計遺伝子(KaiC)ホモログを持つモデル微生物における概日リズムの実証実験

【実験 B】日周変動環境で良好に生育する微生物の集積培養、純粋分離

3. 研究の方法

【実験 A】KaiC ホモログを持つモデル微生物における概日リズムの実証実験

・実験 A1: 根粒菌の KaiC 破壊株の作製

KaiC ホモログを持つモデル微生物として根粒菌 *Mesorhizobium opportunistum*

WSM2075 株、は *Bradyrhizobium* sp. BTA 株を使用した。KaiC ホモログ遺伝子の破壊株作製は pK18mobsacB をもちいた相同組み換え法、および各種抗生物質・スクロース添加培地でのスクリーニングによりおこなった。得られた株について、PCR および変異導入部位の塩基配列決定により正しい変異が入っていることを確認した。

・実験 A2: KaiC 破壊株と野生株との比較

Bradyrhizobium sp. BTA 株の変異株・野生株を改変 YM 培地、25°C、異なる白色光照射条件で培養し、600nm の濁度の変化をもとに生育を比較した。培養後の菌体からアセトン・メタノール (7:2) によりバクテリオクロフィルを抽出し、765nm の吸光度をもとに定量した。

【実験 B】日周変動環境で良好に生育する微生物の集積培養、純粋分離

・実験 B1: 周期的に温度を変化させた条件での土壌微生物群の集積培養

北海道大学構内の森林土壌を微生物源とし、20 mM の酢酸を唯一の炭素源とした無機培地で、異なる温度サイクル条件下での集積培養をおこなった。温度は 10°C、20°C の 2 種類を設定し、10°C 恒常条件、20°C 恒常条件に加え、7、12、17 時間ごとに 10/20°C のサイクルを繰り返す条件で培養をおこなった。3 日間の培養後に継代培養をおこない、3 度の継代培養後に微生物群集構造解析をおこなった。集積物から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の部分配列を対象とした PCR をおこない、PCR 産物を TA クローニング後、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとに、BLASTclust、RDP classifier により系統分類解析をおこなった。優占した微生物群に関して、それらが含まれる属の微生物ゲノム配列データをもとに、その属の微生物種のうちの程度が KaiB、C 遺伝子ホモログを持っているのかを調べた。

・実験 B2: 周期的に光環境を変化させた条件でのウキクサ根圏微生物群の集積培養

北海道大学構内のポプラ池から野生のコウキクサ (*Lemna minor*) を採取した。滅菌水で軽く洗浄後、Hoagland 培地、25°C、異なる光照射サイクル条件で培養した。恒常的明条件に加え、7、12、17 時間ごとに明暗を繰り返す条件の計 4 種類の光照射サイクルで培養をおこなった。2 週間の培養後、数株を新しい培地に植えつぎ再度 2 週間の培養をおこない、根圏微生物群集の解析に供した。培養後のウキクサを滅菌水で軽く洗浄後、ビーズビーティング法により DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の部分配列を対象とした PCR をおこなった。PCR 産物の塩基配列は MiSeq により決定した。得られた配列からキメラ配列およびクロロプラスト由来の配列を除去した後、Qiime により詳細な系統分類解析をおこなった。

4. 研究成果

【実験 A】KaiC ホモログを持つモデル微生物における概日リズムの実証実験

・実験 A1：根粒菌の KaiC 破壊株の作製

初年度は KaiC ホモログを持つ非光合成細菌として、根粒菌 *Mesorhizobium opportunistum* WSM2075 株を選択した。相同組み換えにもとづくダブルクロスオーバー法により、その *kaiC* 遺伝子ホモログ破壊株の構築を試みた。その結果、1 度の相同組み換えが起こった株は数株得ることができたが、2 度の相同組み換えを起こした遺伝子破壊株の取得には至らなかった。

この実験が滞った要因の一つに、本菌の生育の遅さ、コロニー形成の不安定さにあったため、2年目からは別の根粒菌 *Bradyrhizobium* sp. BTA 株を対象に変更した。*Bradyrhizobium* sp. BTAi1 は非酸素発生型の光合成活性を持ち、クサネムという植物に共生する根粒菌である。*kaiC* ホモログを 2 コピー持ったため、相同組み換えにもとづく遺伝子破壊法をそれぞれのコピーに対し行うことで *kaiC* 二重破壊株を作成することに成功した (図 1)。

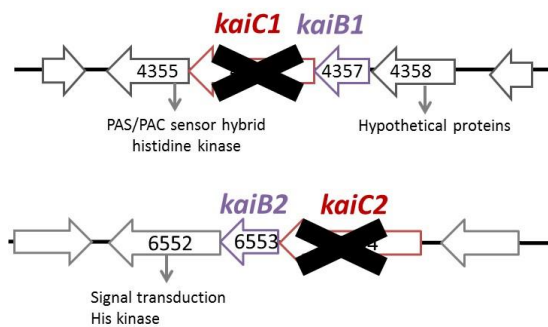


図 1. *Bradyrhizobium* sp. BTA 株の 2 コピーの KaiC ホモログとその破壊株作製。

・実験 A2：KaiC 破壊株と野生株との比較

シアノバクテリアの時計遺伝子である KaiC のホモログが根粒菌において概日時計を制御しているかを確かめるため、*Bradyrhizobium* sp. BTA 株の KaiC 破壊株・野生株の日周変動環境に対する応答を調べた。まず 24 時間周期の明暗サイクル条件、および恒常明条件下での生育を比較した (図 2A)。その結果、両条件において変異株と野生株との生育の有意な差は見られなかった。*Bradyrhizobium* sp. BTA 株は暗条件においてのみバクテリオクロロフィルを合成し、またその合成には定期的な明刺激が必須である (すなわち明暗サイクルが必須である) ことが知られている。そこで 24 時間周期の明暗サイクル条件、および恒常明条件下でのバクテリオクロロフィル産生量を定量した (図 2B)。既報通り、野生株は恒常明条件よりも明暗サイクル条件で優位に多くバクテリオクロロフィルを産生した。野生株でも同様に明暗サイクルにおいて多くのバクテリオクロロフィを産生した。この結果は、*Bradyrhizobium* sp. BTA 株が概日リズム機構

を持ち、またそれが KaiC ホモログによって制御されている可能性を示唆するものである。今後さらに、バクテリオクロロフィル合成系の遺伝子、*kaiC* 遺伝子そのもの、といった遺伝子発現の日周変動性などを確認していくことで、本菌における概日リズムの存在が確かめられていくと期待される。

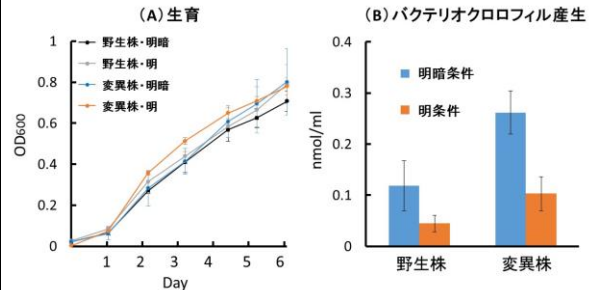


図 2. 異なる光条件下における *Bradyrhizobium* sp. BTA 株の KaiC 変異株および野生株の生育 (A) とバクテリオクロロフィル産生量 (B)。

【実験 B】日周変動環境で良好に生育する微生物の集積培養、純粋分離

・実験 B1：周期的に温度を変化させた条件下の土壌微生物群の集積培養

酢酸を唯一炭素源とした培地で、異なる温度サイクル条件下で土壌微生物群を集積培養した。温度は 10°C、20°C の 2 種類を設定し、10°C 恒常条件、20°C 恒常条件に加え、7、12、17 時間ごとに 10/20°C のサイクルを繰り返す条件下で培養をおこなった。10/20°C のサイクル条件下では環境変化に対して応答が優れた微生物が優占すると考えられる。その中でも特に 12 時間ごとのサイクル (すなわち日周変動) で優占する微生物は、概日リズムを有している可能性が高いと考えられる。集積培養後に 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー解析をおこない、各条件で優占している微生物を同定した結果、*Pseudomonas*、*Bordetella*、*Flavobacterium* 属の微生物が 12 時間のサイクル条件下で優占化していることが明らかとなった (図 3)。各条件で優占がみられた微生物種について、データベースに保存されているゲノム配列をもとにその Kai 遺伝子ホモログの有無を調べた。その結果、日周サイクル条件下で優占化していた 3 属の微生物では多くの種が Kai 遺伝子ホモログを有していたのに対し、非日周条件下で優占していた微生物はほとんど Kai 遺伝子ホモログを有していなかった。この結果は、日周条件下で優占していた微生物が Kai 遺伝子ホモログベースの概日リズム機構を有している可能性を示唆するものである。今後、該当微生物の純粋分離、並びに分離株を使った詳細な解析をおこなうことで、この仮説を実証することが必要である。

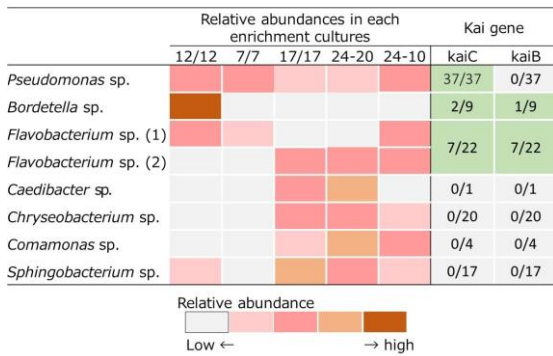


図3. 土壌からの集積培養で優占した微生物種の異なる温度サイクル条件下での出現頻度(色分けで表現)と近縁種のゲノムにおける KaiB, C 遺伝子ホモログの保持状況。

・実験 B2: 周期的に光環境を変化させた条件下でのウキクサ根圏微生物群の集積培養

野生ウキクサを無機培地で異なる光条件下で培養し、根圏微生物群の集積培養をおこなった。恒常的明条件に加え、7、12、17 時間ごとに明暗を繰り返す条件の4種類の照射サイクルで培養をおこなった。ウキクサを含む植物は明条件に光合成をおこない、根から酸素や有機物を放出するのに対し、暗条件ではそれらの放出が停止することがよく知られている。そのため光の変化に応じて根圏環境も大きく変化する。光サイクル条件では環境変化に対して応答が優れた根圏微生物が優占すると考えられ、特に12時間ごとのサイクル(すなわち日周変動)で優占する微生物は、概日リズムを有している可能性が高いと予想される。

集積培養後の根圏微生物群の群集構造解析結果を図4に示す。集積培養前(Original)の微生物群集はマイナーな微生物群(Others)が多数を占めていたのに対し、集積後にはいくつかの系統群の優占化がみられ、うまく集積がかかっていることが示された。図中のオレンジ、黄色で示された系統群(*Rhizobiaceae*科、*Sphingomonadaceae*科に属する系統群)はすべての集積条件で優占化しており、一般的な根圏微生物群であると考えられた。ピンクで示した系統群(*Acetobacteraceae*科)は恒常的明条件でのみ優占化しており、環境変動に対する適応能力が低い微生物であることが予想された。

一方で、変動環境でのみ優占化する微生物群もいくつか同定された。7、12、17時間サイクルのすべての変動条件で優占化した微生物群を図5に示す。これらの微生物は、環境変動への対応能力が高い微生物であると予想される。さらに、12時間サイクル条件(すなわち日周変動条件)でのみ優占した微生物群を図6に示す。これらの微生物群は、単純に環境変動に適応する能力が高いだけではなく、日周変動に特化した適応能力(すなわち概日リズム)を持っている可能性が示唆される。今後、該当微生物の純粋分離、並びに

分離株を使った詳細な解析をおこなうことで、この仮説を実証することが必要である。

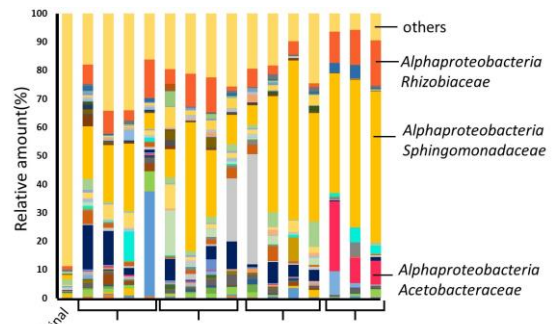
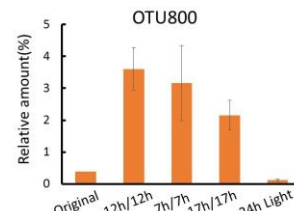
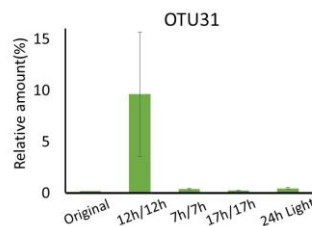


図4. 集積培養後のウキクサ根圏微生物群の群集構造解析結果。各系統群の微生物種は異なる色であらわしている。Othersは全条件で1%以下しか存在しないマイナーな系統群をまとめたもの。



OTU	Phylum	BLAST top hit species (identity)
412	α -Proteobacteria	<i>Pirellula staleyii</i> (89%)
475	β -Proteobacteria	<i>Acidovorax delafieldii</i> (99%)
800	α -Proteobacteria	<i>Sphingopyxis contaminans</i> (99%)
1026	β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga carboriunda</i> (99%)

図5. 光照射を変動させた条件でのみ優占した微生物種。上は1つの代表株(OTU800)の各条件での検出頻度をグラフ化したもの。これと類似の出現パターンを示した計4株を下の表にまとめた。



OTU	Phylum	BLAST top hit species (identity)
31	α -Proteobacteria	<i>Sediminicoccus rosea</i> (99%)
59	Actinobacteria	<i>Rhodococcus trifolii</i> (99%)
115	α -Proteobacteria	<i>Roseomonas lacus</i> (99%)
894	α -Proteobacteria	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> (99%)
966	Actinobacteria	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (99%)

図6. 12時間ごとに光照射を変動させた条件(すなわち日周変動条件)でのみ優占した微生物種。上は1つの代表株(OTU31)の各条件での検出頻度をグラフ化したもの。これと類似の出現パターンを示した計5株を下の表にまとめた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 創一郎 (KATO, Souichiro)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部

門・研究員

研究者番号：30597787

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし