

## 環境修復・環境生態に関する先導的ゲノム研究

●津田 雅孝<sup>1)</sup> ◆福田 雅夫<sup>2)</sup> ◆小川 直人<sup>3)</sup> ◆南澤 究<sup>1)</sup>

1) 東北大学大学院生命科学研究所 2) 長岡技術科学大学工学部 3) 静岡大学農学部

## ＜研究の目的と進め方＞

各種有機化合物の分解能が強い環境細菌は、生態系での円滑な物質循環に必須の構成員であり、難分解性化合物で汚染された環境の修復にも重要な役割を果たすが、多様な自然環境でその生物機能を、実験室環境とは異なる様式で発現している。本研究では、環境汚染物質も含む多様な化合物分解能や地球規模での炭素・窒素循環に関与する環境細菌を対象にして、実験室系と生態系でのゲノム情報発現の相違を規定する要因の提示とゲノムと環境の相互作用を解明する。具体的には、グラム陰性で多様な有機化合物分解能を持つ *Burkholderia multivorans*、グラム陽性で PCB や様々な環境汚染芳香族化合物分解能を持つ *Rhodococcus jostii*、そしてダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) の互いに進化的関係が低い3菌株を用い、以下の研究を進める。(1) 実験室系でのゲノム情報発現とその制御ネットワークの解明：各種炭素源分解能の発現制御ネットワークを主たる対象にして、レポーター遺伝子やマイクロアレイを用いた解析等で解明し、環境シグナル伝達の分子機構の全容を提示する。(2-1) 生態系でゲノム情報発現を解析する技術構築：本研究での統一土壌に接種した菌株のゲノム情報発現検討のため、土壌特異的発現遺伝子群と土壌での生存・増殖に必要な遺伝子群の遺伝学的カタログ化に各々適した IVET と STM の構築を行うとともに、本土壌接種菌株由来の全 RNA 抽出技術を構築する。(2-2) 自然生態系でのゲノム情報発現とその制御ネットワークの解明：統一土壌を用いた IVET と STM で取得する遺伝子の機能の実験室系と土壌での役割を提示する。また、統一土壌から抽出した RNA を用いてゲノム情報発現の解析を行い、実験室系の結果と比較し、相違を規定する環境因子と細菌因子を提示する。さらに本年度第4四半期から、(3) 閉鎖系の統一土壌に環境汚染物質添加という環境要因変動付与時の微生物遺伝子プール変動をメタゲノムの観点から解析する。

## ＜2007年度の研究の当初計画＞

## (1) 実験室系でのゲノム情報発現の検討

(1-1) *B. multivorans* ではマイクロアレイ解析等で、各種芳香族化合物を含む様々な炭素源や鉄濃度などの変動によるゲノム情報発現変動を、野生型株と統括的制御因子変異株で検討し、ゲノム情報発現への各種環境変動の情報伝達様式を提示する。

(1-2) *R. jostii* では、PCB/ピフェニル分解 (*bph*) 遺伝子群をはじめとする各種遺伝子のグルコースによる転写抑制の分子機構を、グルコース存在下の情報伝達様式の解明に主眼を据えて、検討する。

(1-3) ダイズ根粒菌では、リグニンモノマー分解能の解析過程で見出した C1 代謝経路の分子機構の解明と根圏土壌に存在するとされる C1 化合物の資化能を検討する。

## (2) 生態系でゲノム情報発現解析技術の構築と適用

(2-1) *B. multivorans* 土壌特異的発現遺伝子候補について、その発現検出系を野生型株で再構築して土壌特異的発現を検証後、この発現様式を規定する物理的並びに化学的要因を検討する。一方、土壌での生存・増殖に必要な本菌遺伝子群候補の更なる取得と解析をする。ダイズ根粒菌でも土壌生存に必要な遺伝子群を取得し、*R. jostii* で STM 系の構築を試みる。

(2-2) マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析に適した土壌接種菌株由来全 RNA 抽出技術の更なる改良・簡便化を行う。そして、主に *R. jostii* を用いて、ゲノム情報発現変動のアレ

イ解析を実施し、土壌特異的発現をする遺伝子群を絞り込む。

## ＜2007年度の成果＞

## (1) 実験室系でのゲノム情報発現

(1-1) *B. multivorans* では、自作ソフトウェアを用いて近縁種株とゲノム構造を比較し、本菌のゲノム構造確立に関与した可動性因子とこれら因子によるゲノム再編成機構を明らかにした。鉄レギュロン統括的転写制御因子 Fur や窒素代謝に関与するシグマ因子 RpoN の変異体は、様々な炭素源利用能を消失していたが、75 種エネルギー源利用能への影響はなかった。一方、グルコースの芳香族化合物分解遺伝子転写抑制という本菌のカタボライト抑制系に関わるレスポンスレギュレーター BphQ の変異体は、多くのエネルギー源の利用能を失っていた。また、グルコース存在下で、BphQ は複数芳香族化合物の分解遺伝子群を含む 40 以上の遺伝子の転写を抑制することをマイクロアレイ解析で示した。さらに、ペリプラズムでのグルコース代謝で生じる産物が本抑制現象に関与する予備的成果を得た。また本菌では、芳香族化合物取り込み系候補タンパク質遺伝子のグルコース存在下での転写抑制系が存在するが、当該遺伝子産物の塩素化芳香族化合物取り込みへの関与が示唆された。

(1-2) *R. jostii* では、グルコース存在下で、*bph* 構造遺伝子群や芳香族化合物分解には直接関与しない遺伝子等の 200 以上の遺伝子が転写抑制される。*bph* 構造遺伝子群の転写抑制は、本遺伝子群転写に必要な二成分シグナル伝達系コードする *bphST* 遺伝子の転写がグルコース存在時に抑制されることに起因することを示した。また、フルクトースも *bph* 遺伝子群の転写を抑制した。PTS システムの構成員 HPr の遺伝子破壊株は、フルクトースの取り込みと *bph* 遺伝子群転写抑制に欠損を示し、フルクトースによる転写抑制は本物質取り込みレベルに起因すると示唆された。

(1-3) ダイズ根粒菌では、パニリン分解過程で生じるホルムアルデヒドは異化的 C1 代謝の一部酵素群で CO<sub>2</sub> まで解毒されるが、本酵素群遺伝子は、メタノールをホルムアルデヒドに酸化する酵素遺伝子とオペロンを形成していた。そして、本菌はメタノールを唯一炭素源として利用できた。ダイズ根粒菌では別属根粒菌と異なり、C1 代謝系は根粒形成・共生窒素固定に必要ななかった。

## (2) 生態系でゲノム情報発現

(2-1) *B. multivorans* の 250 程の土壌特異的発現候補遺伝子群には、芳香族化合物分解や物質取り込み輸送系、LPS 合成などに関わる遺伝子が複数存在した。これら候補遺伝子の一部について、接種土壌での転写量が実際に増大すること、そして、発現検出系を野生型株で再構築した解析で、検討遺伝子の土壌特異的発現を明示した。また、土壌の水抽出液を用いた解析から、候補遺伝子群には本抽出液存在下で発現誘導されるものとそうでないものがあつた。一方、本菌トランスポゾン挿入突然変異体約 7,000 株の土壌での生存・増殖に対する欠損の第一次並びに第二次スクリーニングを行い、39 の候補変異株を取得した。この中には Fur や物質取り込み輸送系、ストレス応答の変異株が存在した。ダイズ根粒菌では、STM ライブラリーの構築を終えたが、本研究の統一土壌には先住性ダイズ根粒菌が多いことが判明したため、別土壌を用いて増殖・生存に必要な遺伝子変異株のスクリーニングを行っている。*R. jostii* では STM 実施に必要なトランスポゾン誘発系の開発を行った。

(2-2) 昨年度確立した土壌接種菌株由来全 RNA 抽出手法では、

精製度が実験毎で一定しなかったが、種々の改良を加え、精製度が常に高い RNA 抽出技術を確立した。ピフェニル添加土壌に接種した *R. jostii* から回収した全 RNA とピフェニル添加無機液体培地に接種した本菌対数増殖期の全 RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行い、土壌で転写が上昇した数百の遺伝子群を見出した。土壌環境では様々な増殖期の細胞が混在すると想定されたことから、ピフェニル添加無機液体培地で生育した対数後期や定常期の菌体から調製した RNA、さらには、ピルビン酸添加土壌生育菌体とピルビン酸添加無機液体培地生育菌体から抽出した RNA を用いてアレイ解析を実施することで、土壌で発現上昇する遺伝子群を約 200 個に絞り込んだ。この中には、脂質や窒素源の代謝、各種輸送系タンパク質、炭水素分解に関わる遺伝子が存在し、*B. multivorans* の IVET 解析で認められた同一機能を有する遺伝子も存在した。

(3) 新たに実施する「環境修復菌と土壌環境との相互作用に関わるメタゲノム解析」遂行の基盤となる予備的研究を行った。閉鎖系にした統一土壌を複数環境汚染物質 (ピフェニルと他 3 種の芳香族化合物) で人工的に同時汚染化し、経時的に土壌から全 DNA を回収し、16S rRNA 遺伝子解析での菌叢変動と既知分解酵素遺伝子の定量 PCR による量的変動を検討した。汚染化後 7-9 週目で菌叢の大幅な変動があり、分解酵素遺伝子の 10-10,000 倍の増加が認められた。

#### <国内外での成果の位置づけ>

本研究では、(1) *B. multivorans* での 2 種のカタボライト抑制と 3 種の発現制御因子 (Fur, BphQ, RpoN) の多様な炭素・エネルギー源利用能への関与、(2) *R. jostii* でのピフェニルによる数多くの遺伝子の転写促進と多岐の遺伝子の転写に対するカタボライト抑制、そして、(3) ダイズ根粒菌における C1 代謝系存在、の現象を世界に先駆けて見出してきた。前 2 者では、新規性が高い分子機構を備えるとともに、土壌細菌群での普遍的存在が判明しつつある点、(3) では、C1 化合物が多量存在する土壌での根粒菌の生存戦略の新たな側面を提示した点、で大きな意義がある。土壌接種菌株から全 RNA を高純度で調製し、トランスクリプトーム解析を実施する研究は世界をリードしている。また、統一土壌を用いて、IVET と STM を用いた解析とトランスクリプトーム解析を平行して行い、これらを統合した形で、生態系でのゲノム情報発現とその制御機構を体系的に解明するための各段階の研究が着実に進行している点でも、世界に例を見ない。従来のメタゲノム解析では、開放系環境での遺伝子レパートリー提示に留まっていたが、本研究では、可能な限りの再現性保証を念頭におき、閉鎖系環境での環境要因変動に伴う遺伝子プールの経時的変動を提示する点で、世界をリードする独創性・先導性がある。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

*B. multivorans* を用いた IVET で数多くの土壌特異的発現遺伝子を同定した。これら遺伝子の土壌での発現を規定する物理的並びに化学的要因検討のために、土壌の単純な水抽出液を用いて、取得遺伝子の発現様式を検討したが、一部の遺伝子のみの発現が認められた。現在、模擬土壌や数種の抽出条件による土壌抽出液を調製しており、これら試料を用いて、取得遺伝子の発現様式を体系的に検討する。*R. jostii* では、詳細な分子遺伝学的解析や STM の実施に必要なゲノム上特定遺伝子の破壊とトランスポゾンによるゲノムのランダムな突然変異誘発がたいへん非効率であったが、様々な試行の後、いずれも効率が相当改善された。ダイズ根粒菌 STM では、本研究の統一土壌が不適であることが判明し、現在、別土壌を用いている。

#### <今後の課題>

実験室系での *B. multivorans* と *R. jostii* の各種炭素源分解資化能発現制御ネットワークについて、関連するカタボライト抑制系とともに、詳細な分子機能の解析を行い、これらの全体像を提示する。IVET を基盤とした解析とトランスクリプトーム解析では、同定遺伝子の土壌特異的発現を規定する物理的或いは化学的要因の特定を、各種の土壌抽出液や模擬土壌などを用いて実施する。また、STM を基盤とした解析を進展させて、土壌での生存・増

殖に必須な遺伝子を明示する。そして、これら 3 手法で同定した遺伝子について、実験室系と土壌生態系での機能を解明する。「環境修復菌と土壌環境との相互作用に関わるメタゲノム解析」では、統一土壌に環境汚染物質添加という環境要因変動付与時の微生物遺伝子プール経時的変動に関するメタゲノムの観点的解析を本格化させる。なお、ピフェニル添加土壌接種 *R. jostii* のトランスクリプトーム解析では、分解酵素のみならず分解とは直接関連性がない様々な遺伝子群の転写増加が認められることから、汚染化土壌では、分解酵素遺伝子も含む多様な遺伝子群の質的並びに量的変動がおきると想定される。

#### <成果公表リスト>

- 1) 論文
  1. 0701281907: Sugawara, M, Haramaki, R., Nonaka, S., Ezura, H., Okazaki, S., Eda, S., Mitsui, H., Minamisawa, K.: Rhizobitoxine production in *Agrobacterium tumefaciens* C58 by *Bradyrhizobium elkanii* *rtxACDEFG* genes. FEMS Microbiol. Lett. 269: 29-35 (2007)
  2. 0702101506: Ono, A., Miyazaki, R., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda M.: Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. App. Microbiol. Biotechnol. 74, 501-510 (2007)
  3. 0705051617: Yano, H., Garruto, C. E., Sota, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Zylstra, G. J., Williams, P. A., Tsuda M.: Complete sequence determination combined with analysis of transposition/site-specific recombination events to explain genetic organization of IncP-7 TOL plasmid pWW53 and related mobile genetic elements. J. Mol. Biol. 369: 11-26 (2007)
  4. 0801211136: Sota, M., Tsuda, M., Yano, H., Forney, L. J., Top E. M.: Region-specific insertion of transposons in combination with selection for high plasmid transferability and stability accounts for the structural similarity of IncP-1 plasmids. J. Bacteriol. 189: 3091-3098 (2007)
  5. 0801211138: Endo, R. Ohtsubo, Y. Tsuda, M. Nagata Y.: Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for the utilization of g-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. J. Bacteriol. 189: 3712-3720 (2007)
  6. 0801211139: Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo Y., Tsuda M.: Aerobic degradation of lindane (g-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 741-752 (2007)
  7. 0801201812: Kawaharada Y., Eda S., Minamisawa K., Mitsui, H.: A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicus*. Microbiology 153: 3983-3993 (2007)
  8. 0801171921: Patrauchan, M.A., Florizone, C., Eapen, S., Gomez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., Davies, J., Mohn, W.W., Eltis, L.D.: Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. J. Bacteriol. 190: 37-47 (2008)
  9. 0801221045: Wang, Y., Shimodaira, J., Miyasaka, T., Morimoto, S., Oomori, T., Ogawa, N., Fukuda, M., Fujii, T.: Detection of *bphAa* gene expression of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 in soil using a new method for RNA preparation from soil. Biosci. Biotechnol. Biochem. (in press)
- 2) データベース / ソフトウェア
  1. 0707192058: Rhodococcus ゲノムデータベース: Rhodococcus Genome Project, <http://www.rhodococcus.ca/index.jsp>
  2. 0801231618: 比較ゲノム解析ツール: GenomeMatcher, <http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmanual/>