

環境修復・環境生態に関する先導的ゲノム研究

●津田 雅孝¹⁾ ◆福田 雅夫²⁾ ◆小川 直人³⁾ ◆宮崎 健太郎⁴⁾

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 4) 産業技術総合研究所

<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、多様な自然環境では、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を有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、そして、ゲノムと環境の相互作用を解明する。第1に、グラム陰性で多様な有機化合物分解能を持つ *Burkholderia multivorans* とグラム陽性でPCBや様々な環境汚染芳香族化合物分解能を持つ *Rhodococcus jostii* という進化系統的関係が低い2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について、各種炭素源分解資化能を主たる対象にし、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) 土壌に接種した2株において、土壌特異的発現遺伝子群と土壌での生存・増殖に必須な遺伝子群の遺伝学的カタログ化に各々適したIVETとSTMを用いて、当該遺伝子を取得し、それら遺伝子機能の実験室系と土壌での役割を提示するとともに、土壌接種菌株から抽出した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。第2に、土壌に環境汚染物質添加という環境要因変動付加時の、本土壌での汚染物質分解酵素遺伝子を含む遺伝子プールの経時的変動をメタゲノムの観点から解析し、環境修復菌群と土壌環境との相互作用を解明する。

<2008年度の研究の当初計画>

- 実験室系でのゲノム情報発現の検討: *B. multivorans* では、(a)各種芳香族化合物を含む様々な炭素源分解に関わる遺伝子群のグルコースによる転写抑制、(b)多様な生物機能発揮に関与する鉄レギュロン統括的発現制御因子Furの当該機能遺伝子群への鉄情報伝達、の分子機構解明のための基盤的知見を取得する。*R. jostii* では、グルコースやフルクトース存在下でのPCB/ビフェニル分解酵素 (*bph*) 遺伝子群を含む各種遺伝子群転写抑制の分子機構を、*bph* 遺伝子群発現に必要な二成分シグナル伝達系 *BphST* の遺伝子転写制御機構も視野に入れて、検討する。
- 生態系でのゲノム情報発現解析の検討: *B. multivorans* の花崗岩質土壌特異的発現遺伝子について、その土壌抽出液や他土壌を用いた発現を検討し、これら条件での遺伝子発現の様式を規定する化学的並びに物理的要因を絞り込む。一方、花崗岩質土壌での生存・増殖に必須な本菌遺伝子群候補を更に絞り込み、遺伝子破壊株を解析する。また、*R. jostii* でも土壌での生存・増殖必須遺伝子取得のためのSTM系を構築する。一方、花崗岩質土壌に接種した *R. jostii* の全RNAを用いたマイクロアレイ解析では、絞り込んだ土壌特異的発現上昇遺伝子について、土壌での機能を提示する。さらに、土壌での遺伝子特異的発現に関わる化学的並びに物理的要因明示のために、人工的模擬土壌系を構築する。
- 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: 非滅菌土壌を複数環境汚染物質で汚染させ、経時的に調製した土壌微生物集団メタゲノムでの遺伝子プールの構成と変動様式を、塩基配列の大規模決定と情報学的解析で検討する。また、メタゲノムから環境汚染物質分解活性を示す酵素遺伝子を取得し、本遺伝子とその近傍領域を解析し、土壌棲息細菌群ゲノムの当該酵素遺伝子群の構成様式を提示する。

<2008年度の成果>

(1) 実験室系でのゲノム情報発現

(1-1) *B. multivorans* において、Fur変異株は、鉄代謝異常、様々な炭素源利用能消失、活性酸素種と活性窒素種NOへの高感受性の表現型を示すが、NO高感受性に焦点を当てた解析により、NO解毒酵素の発現はFurによって間接的に促進されることが示唆された。また、Fur変異株のNO抵抗性サプレッサー変異株の解析で、NO抵抗性と各種炭素源利用能の間での密接な関連性が判明した。一方、芳香族化合物を含む多くの化合物の分解酵素遺伝子群がグルコース存在時にレスポンスレギュレーター *BphQ* 関与のもとで転写抑制される本菌カタボライト抑制系では、グルコース6-リン酸、グルコン酸、6-ホスホグルコン酸、ガラクトースも抑制基質になることを見出し、これら化合物のペリプラズムと細胞質での代謝、細胞内への取り込みが抑制現象に関与する知見を得た。また、グルコース存在下で3-クロロ安息香酸 (3CB) 分解が減少する別のカタボライト抑制では、当該化合物取り込みに関与する3候補遺伝子のうちの1遺伝子の転写がグルコース存在下で抑制された。3遺伝子の各破壊株の解析で、2遺伝子がゲンチジン酸と3CBの取り込みに各々関与すると示唆された。

(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数多く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、*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が、グルコースキナーゼ遺伝子破壊株の解析から、本遺伝子機能がグルコースによる *bph* 構造遺伝子群の転写抑制に関わることを示した。また、グルコース取り込みに主に関わるMFS系タンパク質の遺伝子を明らかにした。一方、フルクトースによる *bph* 遺伝子群転写抑制にはPTSシステム構成員HPrが関与するが、HPrはグルコース取り込みとグルコースによる *bph* 構造遺伝子群転写抑制に関与しなかった。さらに、*R. jostii* はスチレンを単一炭素源にでき、本化合物分解遺伝子群発現にも *BphST* 系が関与することを示した。

(2) 生態系でのゲノム情報発現

(2-1) *B. multivorans* において、花崗岩質土壌で特異的に発現し芳香族化合物分解や物質取り込み系などに関わる30程の遺伝子について、土壌学的に異なる水田低地土壌での発現、花崗岩質土壌の水抽出液並びに酢酸エチル抽出液での発現を検討した。いずれの遺伝子も基本的には水田低地土壌でも発現することを確認した。また、2種抽出液を用いた解析で、片方の抽出液でのみ発現する遺伝子、両方で発現する遺伝子、両方でも発現しない遺伝子の4グループに分類できた。6割を占めた最後のグループの遺伝子の転写には、2条件でも抽出されなかった化学物質が土壌の物理的要因に関与すると示唆された。一方、本菌トランスポゾン挿入突然変異体約7,000株の中から花崗岩質土壌での生存・増殖に欠損がある変異候補を39株取得していたが、これらの株について更なるスクリーニングを行い、Fur機能や、rRNAやmRNAの高次構造維持機能、ストレス応答関連機能が土壌での生存・増殖に必要であると示唆された。

(2-2) *R. jostii* の形質転換法に改良を加えることで、トランスポゾン挿入変異誘発用プラスミドの本菌への導入効率が大幅に上昇し、土壌での生存・増殖に必要な遺伝子の取得系を確立した。

(2-3) 滅菌花崗岩質土壌に接種した *R. jostii* から回収した全RNAを用いたトランスクリプトーム解析で、土壌特異的に発現上昇

する遺伝子を202個に限定していたが、更に人工固体培地上で発現上昇する遺伝子を除くことで、滅菌土壌特異的発現上昇遺伝子を165個に絞り込んだ。その半分近くは機能未知の遺伝子で、残りの大多数は代謝関連遺伝子であった。各種物質取り込み系や窒素や脂肪酸の代謝系を担う当該遺伝子群ではオペロン単位での発現上昇が示唆された。窒素代謝系の亜硝酸還元酵素の遺伝子破壊株は、野生株に比べて、滅菌土壌での増殖が遅れた。

(2-4) 市販の海砂や腐植酸から構成される人工的模擬土壌を複製し、*B. multivorans*と*R. jostii*が増殖する条件を各々検討することで、本環境での生残性の確認と炭素源添加時の増殖を見出した。

(3) 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閉鎖系にした非滅菌花崗質土壌を3CBとピフェニル、フェナントレン、カルバゾールの4種芳香族化合物で人工的に同時汚染化し、半年間にわたり、汚染物質残存量測定と、全土壌DNAを用いた菌叢変動と定量PCRでの既知分解酵素遺伝子変動を1週間毎に検討した。3CBが消失した2週間後に当該分解酵素遺伝子量が最大になり、他3種化合物が著しく減少する5週間後に当該分解酵素遺伝子が検出された。また、汚染化後6週において、菌叢の大幅な変動が認められた。汚染前と汚染化後の3、6、12週の土壌メタゲノムDNAを調製し、大規模に塩基配列決定を本年度中に実施する段階に至った。同時に、当該DNAをクローン化したメタゲノムライブラリー構築し、活性スクリーニングを実施する段階に至った。一方、工業廃水活性汚泥由来メタゲノム内で、芳香環開裂活性のある酵素の遺伝子を含む複数DNA断片を1.5 Mb解析し、本環境棲息細菌群ゲノムでは、培養可能な芳香族完全分解細菌群の場合とは異なり、当該遺伝子とその近傍領域は新規性のある多様な構造を持ち、分解酵素遺伝子群は完全なオペロン構造を形成していない例が多かった。

<国内外での成果の位置づけ>

*B. multivorans*でのグルコースによる2種のカタボライト抑制とFurの多様な炭素源利用能を含む広範な生物機能への関与、そして、*R. jostii*での**bph**遺伝子群発現へのグルコースとフルクトースによる別個のカタボライト抑制では、いずれも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に大きな意義がある。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進行し、さらには模擬土壌での検討をめざしている点で、世界をリードしている。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のスナップショット的提示に留まっていたが、本研究では、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できる点で、世界に例を見ない独創性・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>

土壌での生存・増殖に欠損がある*B. multivorans*変異遺伝子候補については、野生型遺伝子供給による相補実験と野生型株の当該遺伝子再破壊株を用いた検証実験が遅れている。汚染化土壌から調製したメタゲノムDNAについて、長鎖DNAの十分量調製や真核生物由来DNA混入度検討に時間を要し、塩基配列決定作業と分解酵素遺伝子活性スクリーニングが遅れが出た。DNA調製の問題点はクリアでき、真核生物由来DNA混入度は低かった。

<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に主眼を置いた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を用いた解析とトランスクリプトーム解析では、各種の土壌抽出液や模擬土壌などを用いて、同定遺伝子の土壌特異的発現を規定する化学的並びに物理的要因を特定する。また、STMを用い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、環境汚染物質添加後の微生物遺伝子プールの経時的変動様式の検討を情報学

的解析も含めて本格化させるとともに、実際に活性を示す分解酵素の遺伝子の量的並びに質的変動を解明する。

<成果公表リスト>

1) 論文

- 0806180923: Mori, T., Suenaga, H., Miyazaki, K.: A metagenomic approach to the identification of UDP-glucose 4-epimerase as a menadione resistance protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1611-1614 (2008)
- 0806191455: Fuchu, G., Ohtsubo, Y., Ito, M., Miyazaki, R., Ono, A., Nagata, Y., Tsuda, M.: Insertion sequence-based cassette PCR: cultivation-independent isolation of γ -hexachlorocyclohexane-degrading genes from soil DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 627-632 (2008)
- 0806191459: Yuhara, S., Komatsu, H., Goto, H., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M.: Pleiotropic roles of iron-responsive transcriptional regulator Fur in *Burkholderia multivorans*. *Microbiology* 154: 1763-1774 (2008)
- 0811100828: Mori, T., Mizuta, S., Suenaga, H., Miyazaki, K.: Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6803-6805 (2008)
- 0901080945: Roberts, A. P., (9人), Tsuda, M., Berg, D. E.: Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60: 167-173 (2008)
- 0901080947: Miyazaki, R., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Tsuda, M.: Characterization of the *traD* operon of naphthalene-catabolic plasmid NAH7: a host-range modifier in conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 190: 6281-6289 (2008)
- 0901080948: Ohtsubo, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Nagata, Y., Tsuda, M.: GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 9: 376 (2008)
- 0901080951: Sota, M., Yano, H., Tsuda, M.: Bacterial class II catabolic transposons. *In: DNA Transposable Elements Research*. pp. 23-67. Nova Science Publishers, New York. (2008)
- 0901081532: Morimoto, S., Ogawa, N., Hasebe, A., Fujii, T.: Isolation of effective 3-chlorobenzoate-degraders in soil using community analyses by PCR-DGGE. *Microbes Environ.* 24: 285-292 (2008)
- 0901081631: Shimoda, Y., (2人), Minamisawa, K., (3人), Tsuda, M., (5人), Tabata, S., Sato, S.: Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics. *DNA Res.* 15: 297-308 (2008)
- 0901110520: Sukda, P., Gouda, N., Ito, E., Miyauchi, K., Masai, E., Fukuda, M.: Characterization of transcriptional regulatory gene involved in dibenzofuran degradation by *Nocardioides* sp. strain DF412. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)

2) データベース/ソフトウェア

- Rhodococcus* ゲノムデータベース: *Rhodococcus* Genome Project, <http://www.rhodococcus.ca/index.jsp>
- 比較ゲノム解析ツール: GenomeMatcher, <http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gm/gmhome.html>