

環境分子生物学研究室

Environmental Molecular Biology Laboratory

主任研究員 加藤 礼三

KATO, Reizo

当研究室は、環境や生態系における微生物の機能と適応・進化について分子生態学的及び分子生物学的視点から解明していきたいと考え、以下の研究を進めている。(1)熱帯陸上生態系の物質循環において重要な役割を果たすシロアリ-微生物共生系の研究を、培養を介さない微生物研究法の開発を進めながら行っている。これまで培養が困難なためアクセスできなかった多様な未利用微生物資源の探索・利用技術の開発も目指している。(2)多くの芳香族化合物は生体機能を攪乱する内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)として働くことが明らかになってきた。環境汚染化学物質分解微生物をモデルとして微生物進化・適応の研究や応用研究を進めている。(3)細菌の環境適応と細胞内環境の維持には密接な関係がある。細胞内イオン環境維持に重要な役割を果たしている Na^+/H^+ アンチポーターシステムの多機能性について研究を進めている。

1. 共生微生物など微生物の相互作用に関する研究(工藤、大熊、守屋、本郷^{*1}、野田^{*1}、雪^{*3}、井上^{*3}、佐藤^{*3}、野堀^{*4}、栗崎^{*4}、鈴木^{*4}、大畑^{*5}、大沼^{*6}、高橋^{*6})

シロアリ共生原生動物群より構築した cDNA ライブラリーによる、メタトランスクリプトーム解析によって得られた5種の糖質加水分解酵素ファミリーについて発現・精製とその性質決定を行い、5種のうち1種類の発現・精製と性質決定を終了した。解析に用いたシロアリ共生原生動物由来のファミリー5エンドグルカナーゼ RsSymEG1 は、セロピオースとグルコースを主要な生産物として生成することから、高分子からグルコースまで効率よく分解を行う酵素であると言える。また、Km 値はセルロース結合ドメインを持つ細菌性セルラーゼと同様の低い値を示し、また Vmax 値は従来知られる酵素に比べて著しく高い値を示した。これらはこの酵素が非常に反応性の高い高機能酵素であることを示している。また、本年度はシロアリ宿主の EST 解析および、共生系のメタボローム・プロテオーム解析にも着手し、新規の機能性遺伝子探索技術の開発を開始した。

共生原生動物群から水素の生成酵素(鉄型ヒドロゲナーゼ)を同定して異種発現によって酵素を解析した結果、水素取込よりも水素生成により高い反応性を有する酵素であることを明らかにした。また、原生動物が生産する水素は、その原生動物の細胞内共生細菌が利用する場合があることを明らかにし、水素を積極的に利用することにより分解を促進する共生関係と考えられた。この細胞内共生細菌(Bacteroidales 目細菌)は宿主のシロアリならびに原生動物と階層をもった3者間共生関係において互いに共種分化してきたものであることも見出した。原生動物に共生するものとして、Bacteroidales 目の髭状の細胞表層共生細菌、宿主原生動物の運動に関与する Synergistes 門の共生細菌、数多くの原生動物種の細胞内に共生する新規門 Termite Group 1 細菌も同定した。腸内細菌の重要な機能である窒素固定について、様々なシロアリ種で *nifH* 遺伝子を解析した結果、シロアリの生活様式と最も強い相関が認められた。生活様式の差による生息環境からの金属補因子の利用性が影響していると考察した。

2. 環境保全と微生物進化に関する研究(工藤、飯田、堀之内、本山、TAJUL^{*2}、田口^{*2}、杉原^{*4}、俵谷^{*4}、中村^{*6}、林^{*7})

難分解性の環境汚染物質であるダイオキシン類は、発ガン性や内分泌かく乱活性を有する毒性物質である。ダイオキシン類は廃棄物燃焼などの過程で非意図的に生成し、低濃度であるが広範囲にわたって環境を汚染していることから、低コストで環境負荷の低い浄化処理技術の開発が求められている。我々は微生物の能力を利用したダイオキシン類の分解処理を目指し、これまでに多くのジベンゾフラン (DF) やピフェニル資化性細菌を自然界より単離・解析してきた。本年度は、DF 資化性放線菌 *Rhodococcus* sp. YK2 株において、DF 分解の第一段階を触媒する酵素の遺伝子、*dfdA1*~*A4* は、DF 存在下転写が誘導される。本研究ではその転写制御メカニズムの解明を目指した。ノーザン解析により、YK2 株の *dfdA1* の転写活性化が、DF の代謝中間産物である 2,2',3-trihydroxybiphenyl やサリチル酸では起こらず、DF によってのみ誘起されることを示し、この転写活性化が疎水性の芳香族化合物である DF を誘導基質とすることが示された。YK2 株の *dfd* 遺伝子クラスター内に、DNA 結合ドメインを擁するものの、配列相同性からその機能推定が困難な遺伝子、*dfdR* を見出した。ドメイン構造解析により、DfdR 推定アミノ酸配列中に GAF ドメイン様構造の存在が示唆された。この遺伝子を破壊した YK2 株は、DF 資化性及び *dfdA* 転写誘導能が消失したが、*dfdR* 遺伝子の相補により両形質は復帰した。*dfdA1* プロモーター領域とレポーター遺伝子 *luxAB* の融合組換え体に *dfdR* 遺伝子を組み込み、*R. erythropolis* JCM 2892 株に導入したところ、DF 依存的な *dfdA1* プロモーターの活性化が確認された。また、DF に類似の芳香族化合物(ジベンゾ-*p*-ダイオキシンやピフェニルなど)でも転写が活性化されることが示された。DfdR を異種発現させた *R. erythropolis* JCM 2892 株の細胞破砕液は、*dfdA1* プロモーター領域を含む遺伝子断片に DF 依存的に結合した。以上の結果から、新規 DNA 結合タンパク質 DfdR が、DF 等の疎水性芳香族化合物依存的に *dfdA* 遺伝子群の転写を活性化する、特徴的な転写因子であることが示された。

細菌によるステロイド分解は医薬品への応用を目的に研究が進められたが、本研究以前には分解遺伝子に関する知見はわずかであった。本研究では代表的なステロイド化合物分解菌である *Comamonas testosteroni* がステロイドの A 環を芳香環化し、芳香族化合物分解と類似の経路を経てステロイド化合物を分解し、その分解遺伝子も細菌の芳香族分解遺伝子と類似していることを示した。後半は酸化により D 環、C 環の順に開裂して完全分解される事を示した。これら分解に関わる遺伝子は主にふたつの遺伝子クラスターに存在するが、その二つのクラスターは数十 kb の間において同じ DNA 上に存在する可能性が示され、その間にも別のステロイド分解遺伝子が存在する可能性が高いことが示唆された。一方、データベース検索により、主にゲノム解析の結果にステロイド分解遺伝子と思われる遺伝子が多数見いだされ、それらは並び順などが TA441 株とは異なっていた。多くの菌に異なった形で見いだされることから、ステロイド分解遺伝子は細菌の進化において古い時期に獲得され、細菌の進化と共に進化してきたことが予想された。

植物根圏糸状菌の根圏環境適応メカニズムの解明と、ダイオキシン類等のファイトレメディエーションへの応用を目指している。植物根圏生態系中では植物根圏バクテリアが抗菌物質を生産して近隣の植物根圏糸状菌をコントロールしていることが知ら

れている。このメカニズムを解明することにより、植物根圏系状菌の植物根圏での定着能を上昇させることや、不要な植物根圏系状菌を除去するなどのコントロールが可能になると考えられる。植物根圏バクテリア由来の抗菌物質ピロールニトリン及びその類似物のターゲットである植物根圏系状菌の二成分情報伝達系の解析を行った。二成分情報伝達系のグループ III ヒスチジンキナーゼ (HK III) を発現する酵母は抗菌物質に感受性になる。この系を用いることにより、土壌バクテリア *Sorangium cellulosum* 由来のポリケタイド化合物 ambruticin が HK III を標的とすることを明らかにした。ambruticin は、特異的作用を示す医薬や農薬として利用できる可能性がある。二成分情報伝達系のレスポンスレギュレーター遺伝子のノックアウト株では、高浸透圧感受性の上昇、ピロールニトリン類似物への感受性の低下、二次代謝産物であるメラニン生産能の上昇、宿主植物への寄生能の低下が認められた。この結果から、二成分情報伝達系は、高浸透圧環境応答、薬剤作用、二次代謝の負の制御、及び植物との相互作用に関与することが明らかになった。

3. 微生物の環境適応に関する研究 (工藤、古園、小田切^{*1}、梶山^{*4})

細菌の pH / 塩環境適応に重要なマルチ遺伝子型 Na⁺/H⁺ アンチポーター (Sha) の構造及び機能解析を進めている。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Sha 輸送体は機能に *shaABCDEFGHIJ* 遺伝子産物を必要とすることから、遺伝学的にマルチコンポーネント複合体の存在が示唆されている。本年度は、Sha 複合体の分子レベルでの証明を目標とした。各 *sha* 欠損株に対し、His タグを付加した形で *sha* 遺伝子産物をトランスに相補させた枯草菌株 (*sha::sha*-his 相補株) を作成した。His タグ付加された *sha* 遺伝子産物はいずれも野生型と同等の機能を維持していることを確認した。これらの *sha::sha*-his 相補株を用いて、His タグによるアフィニティー精製を行い、ShaE 抗体を用いたプルダウンアッセイにより、全ての *sha* 遺伝子産物が ShaE と共沈することを示した。次に、各 *sha::sha*-his 相補株の膜画分試料について、複合体構造を維持したまま分子量による分画が可能な Blue Native (BN)-PAGE により一次元目展開を行い、二次元目を SDS-PAGE で展開後、ウエスタンブロットによる His タグ付加 *sha* 遺伝子産物の検出を行った。その結果、BN-PAGE 上の同じ分子量の位置に全ての *sha* 遺伝子産物が含まれることを示した。以上の結果から、*shaABCDEFGHIJ* 遺伝子産物が細胞膜上で複合体を形成していることを分子レベルで初めて明らかにした。分子量マーカーの移動度との比較、及び複合体への CBB 結合量を考慮すると、Sha 複合体の分子量は約 228 kDa と見積もられた。この値は、複合体に各 Sha サブユニットが 1 分子ずつ含まれる場合の理論値 (210 kDa) に近い値であった。

多くの Na⁺ や H⁺ 輸送性トランスポーターでは、Na⁺ や H⁺ 結合に膜貫通領域に位置する酸性アミノ酸残基が重要である。*sha* 遺伝子産物には、該当する保存性の高い酸性アミノ酸残基が合計 12 存在した。これらの 12 残基について Sha 輸送への機能的関与を知るために、部位特異的変異解析を行った。その結果、ShaA における Glu-113, Glu-657, Asp-743, Glu-747, ShaB における Asp-121, ShaD における Glu-137 の合計 6 残基が機能に必須であった。作成した全ての変異体について膜における発現は正常であり、また ShaE との会合にも影響がないことを確認した。以上の結果より、*shaABCDEFGHIJ* 遺伝子産物より構成される Sha 輸送体において、機能に必要な酸性アミノ酸残基を含む A, B, D サブユニットがイオン輸送通路を形成する可能性が考えられた。特に ShaA の Glu-113 と ShaD の Glu-137 は、相同な関係にある A/D サブユニット及び H⁺ 輸送性トランスポーターにおいても保存されていたことから、Na⁺ もしくは H⁺ 結合部位を形成している可能性が強く示唆された。これまで詳細が全く不明であった Sha 輸送体構造の分子レベルでの成り立ちを一部明らかにすることができた。

Sha 輸送体は、代表的な日和見感染菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の病原性に関与する。緑膿菌 Sha 欠損株では、定常期転写の誘導に必要な定常期シグマ因子 RpoS とクオラムセンシング (LasR, RhlR) の活性化が NaCl の存在により強く阻害され、またその制御下にある多くの病原性遺伝子の転写が低下していることを GeneChip 解析により明らかにした。GeneChip 解析結果に対応して、バイオフィーム形成、エラスターゼ活性、ピオシアニン生産が Sha 欠損株では NaCl 依存的に低下することを示した。緑膿菌 Sha 欠損株の病原性が低下した原因は、定常期移行阻害による病原性遺伝子の発現低下が一因であると考えられた。

*1 協力研究員, *2 訪問研究員, *3 ジュニアリサーチアソシエイト, *4 研修生, *5 委託研究生, *6 テクニカルサイエンティスト, *7 業務嘱託

We are studying the functions, evolution and adaptation of microorganisms in natural environments and ecosystems by the methods of molecular microbial ecology and molecular biology. We have an interest in the roles of microorganisms as "decomposer" in the cycle of biological matter. Main research activities are as below.

1. Study on termite-microorganisms symbiotic system using culture-independent approaches

An endoglucanase-encoding cDNA, *Rssymeg1*, from a symbiotic protist in the hindgut of termite, *Reticulitermes speratus*, has been expressed, purified and characterized. RsSymEG1 belonged to the glycosyl hydrolase family 7. The Km and Vmax values were 1.97 mg/ml and 769.6 mmol/min/mg protein, respectively. The hydrolysis pattern of RsSymEG1 analyzed by TLC showed that the main products from cellodextrins were glucose and cellobiose. All of these results showed the great potential of cellulases of symbiotic protist origin. We also started the EST analysis of the host termite and the proteome/metabolome analysis of the termite symbiotic system in order to develop a novel strategy for discovering functional genes from environmental samples.

Genes encoding Fe-hydrogenase were identified in the gut protists and the recombinant enzymes preferentially catalyzed hydrogen evolution. The endosymbiotic bacteria of a gut protist showed strong hydrogen uptake activity, suggesting that the symbiotic relationship enhances cellulose degradation via inter-species hydrogen transfer. We also showed the evidence for cospeciations of the triplex symbiotic partners: gut protists of a certain genus, their endosymbionts, and their host termites. Cellular symbionts belonging to Bacteroidales, Synergistes, and novel candidate phylum 'Termite Group 1' were identified in various protist species in the guts. The phylogenetic divergence of the nitrogen fixation genes *nifH* of gut bacteria was to some extent dependent on host lifestyle.

2. Study on the diversity and evolution of aromatic compound-degrading bacteria

We are investigating microbial degradation of dioxins for bioremediation. Dibenzofuran (DF) is one of the carbon-skeletal compounds of dioxins used as a model to study microbial degradation of dioxins. This study analyzes the

transcriptional regulation of the DF dioxygenase genes *dfdA1-A4* in the DF-utilizing actinomycetes *Rhodococcus* sp. YK2. A gene encoding DNA binding protein that designated *dfdR* was found in the *dfd* gene cluster. The central part of the DfdR amino acid sequence indicates significant homology to GAF-domain sequences by domain search analysis. A *dfdR*-disrupted derivative of YK2 lost the abilities of DF utilization and DF-dependent *dfdA1* transcriptional induction, and these dysfunctions were compensated by the introduction of *dfdR*. Promoter analysis of *dfdA1* in *R. erythropolis* JCM 2892 indicated that the *dfdA1* promoter (P_{dfdA1}) activation was dependent on *dfdR* and DF, and not a metabolite of the DF pathway. The cell extract of *R. erythropolis* JCM 2892 containing DfdR bound to the P_{dfdA1} DNA fragment in a DF-dependent manner. In addition, the P_{dfdA1} activation and DfdR DNA binding were observed in hydrophobic aromatic compounds comprising more than two aromatic rings, suggesting that DfdR has broad effector molecule specificity for several hydrophobic aromatic compounds.

Comamonas testosteroni is known for the ability of utilizing certain steroids. We identified the degradation pathway and the genes involved in steroid degradation by *Comamonas testosteroni* TA441. TA441 degrades steroids via aromatization of A-ring followed by degradation similar to bacterial aromatic compound degradation, and the genes involved in the degradation are also similar. Remaining BCD-ring, D-ring is cleaved prior to C-ring by the pathway similar to beta-oxidation. A lot of possible steroid degradation genes, which are similar but not identical to those of TA441, are found in the data base, indicating that certain bacteria got the steroid degradation genes in the early days in their evolution process.

In bioremediation by plants, rhizosphere-colonizing microorganisms have an important role. Ambruticin is a bacterial polyketide compound that can control rhizosphere fungi. We found that ambruticin targets the group III histidine kinase in the two-component signal transduction system (TCS) of rhizosphere fungi. Knockout mutants of response regulator genes in the TCS were reduced in parasitic ability, suggesting that the TCS is involved in interaction between a host plant and a rhizosphere fungus.

3. Study on the role of Na⁺/H⁺ antiporter systems in bacterial adaptation to the environment

We showed complex formation of the *shaABCDEFG* gene products, which constitute a principal Na⁺/H⁺ antiporter in *Bacillus subtilis*, by pull-down and BN-PAGE analyses. From the estimated molecular mass of the Sha antiporter complex, we consider a possibility that the Sha complex contains each monomer of A-G subunits. We identified by site-directed mutational analysis a total of six essential transmembrane acidic residues (Glu-113, Glu-657, Asp-743, and Glu-747 in ShaA; Asp-121 in ShaB; Glu-137 in ShaD), a few of which probably form an ion translocation site of the Sha antiporter complex.

To understand the role of the Sha antiporter in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, we performed transcriptome analysis of a Sha antiporter-deficient mutant in the presence or absence of NaCl. Activation of the stationary sigma factor RpoS and quorum sensing system (QS) was inhibited by the presence of 0.3 M NaCl in the mutant. Transcription of many virulence genes, mostly RpoS and QS-dependent ones, was decreased in a NaCl-dependent manner in the mutant, which may cause the attenuated virulence of the mutant.

Staff

Head

Dr. Toshiaki KUDO

Dr. Reizo KATO

Members

Dr. Moriya OHKUMA

Dr. Saori KOSONO

Dr. Shigeharu MORIYA

Dr. Toshiya IIDA

Dr. Masae HORINOUCI

Dr. Takayuki MOTOYAMA

Dr. Yuichi HONGO*

Dr. Satoko NODA*

Dr. Masato OTAGIRI*

* Contract Researcher