



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Cupriavidus necator

NH9株のゲノム情報に基づく芳香族塩素化合物分解
に関する遺伝学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森内, 良太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81614

氏 名 (本 国 籍)	森内 良太	(静岡県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)	
学 位 記 番 号	農博甲第 7 6 8 号	
学 位 授 与 年 月 日	令和 3 年 3 月 3 1 日	
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	静岡大学	
学 位 論 文 題 目	<i>Cupriavidus necator</i> NH9 株のゲノム情報に基づく芳香族 塩素化合物分解に関する遺伝学的研究	
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 森 田 明 雄	
	副査 静岡大学 教授 小 川 直 人	
	副査 岐阜大学 教授 鈴 木 徹	
	副査 静岡大学 准教授 道 羅 英 夫	

論 文 の 内 容 の 要 旨

芳香族化合物は、自然界において広範囲に存在する有機化合物の一つであり、その構造から難分解性を示す。中でも芳香族塩素化合物は生物に対する有害性が高く、環境中における蓄積が問題となっている。細菌の中には、このような汚染物質を分解できるものが存在し、バイオレメディエーション（生物学的環境修復）への利用が期待されている。*Cupriavidus necator* NH9 株は、芳香族塩素化合物のモデル化合物である 3-クロロ安息香酸 (3-CB) を分解する細菌である。芳香族塩素化合物分解細菌について、その分解能力をゲノムレベルで解析した研究例は少なく、芳香族塩素化合物分解細菌を分解細菌たらしめるゲノム上の特徴や、芳香族塩素化合物の分解能力に関わる遺伝子群の全貌は明らかになっていない。このような背景に基づき本研究では、次世代シーケンサーを使用し、NH9 株の芳香族塩素化合物分解能に関するゲノムレベルの解析を行った。

まず初めに、NH9 株の全ゲノム配列を決定した。その結果、NH9 株は 2 つの染色体と 2 つのプラスミドを有していることが判明した。また 3-CB の他に安息香酸 (BA) やヒドロキシ安息香酸類、アントラニル酸などの分解に関わる遺伝子群を有しており、これら化合物の分解能を有することが推定された。HPLC 解析により分解能を調べた結果、NH9 株は少なくとも 3-CB、BA、3-ヒドロキシ安息香酸を完全に分解することが判明した。

続いて、NH9 株が 3-CB を分解する際の遺伝子発現及び機能変動の特徴を明らかにすることを目的として、3-CB 培養と、塩素置換基がない BA 培養との比較により、RNA-seq 解析を行った。3-CB 及び BA の各分解遺伝子群は各化合物分解中に高発現していた。特に 3-CB 培養においては、その分解中間産物であるクロロカテコール分解遺伝子群の発現が、BA 分解時と比較して大幅に上昇していた。芳香族化合物の取り込みに関わると推定されるトランスポーター遺伝子の発現

を調べたところ、3つのMFSトランスポーターと1セットのABC-typeトランスポーターをコードする遺伝子群が3-CBで高発現しており、3-CBを含む芳香族化合物の取り込みに関与することが推測された。機能変動の違いを調べた結果、走化性やシグナル伝達、細胞の運動性に関する機能について、BAのみで上昇していた。そこでスライディングプレートアッセイにより走化性を調べたところ、NH9株はBAに対して強い走化性を示し、3-CBに対しては弱い走化性を示した。これらの結果よりNH9株は、3-CBの取り込みと分解に関しては適応できているが、走化性に関しては完全には適応できていないと考えた。

最後に、NH9株を含めて分解菌がしばしば分離されている*Cupriavidus*属細菌と、分解菌は少ないが*Cupriavidus*属と属レベルで誤同定が多いと考えられた近縁の*Ralstonia*属細菌について、系統樹による解析と全ゲノム配列を使用した複数の解析方法により、再分類を行った。その結果、NH9株は*C. necator*種への分類が妥当であるとわかり、*Cupriavidus*属細菌に特徴的な芳香族化合物分解遺伝子群を明らかにした。また両属の対象全150株中41株の再分類の提案に成功した。本解析により、*Cupriavidus*属及び近縁の細菌について、ゲノムレベルで比較解析が可能な基盤を構築できた。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、森内良太は、難分解性芳香族塩素化合物である3-クロロ安息香酸（3-CB）の分解細菌、*Cupriavidus necator* NH9株の全ゲノム配列を決定し、2つの染色体と2つのプラスミド上に、3-CB及び各種の芳香族化合物の分解遺伝子群を持っていることを明らかにした。そしてNH9株を含めて分解菌がしばしば分離されている*Cupriavidus*属細菌と、分解菌は少ないが*Cupriavidus*属と属レベルでの誤同定が多い近縁の*Ralstonia*属細菌について、系統解析と全ゲノム配列を使用した解析により再編成を行って、*Cupriavidus*属細菌の芳香族化合物分解能の特徴を明らかにした。さらにNH9株の、3-CBでの培養時と安息香酸での培養時の遺伝子発現プロファイルの相違等から、同株が、自然界にも存在する安息香酸の利用には良く適応しているのに対して、3-CBに対しては、取り込みのためには既存の芳香族化合物の取り込みのための遺伝子を使用し、走化性はごく弱いことなど、環境中の3-CBの利用のためには、十分に適応していないことを明らかにした。これらの結果は、細菌による芳香族塩素化合物分解能の適応・進化の研究に寄与し、細菌を利用した環境汚染物質の浄化技術の発展のために基礎的な知見を提供するものと認められる。

基礎となる学術論文

1) Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Yu Kanasaki and Naoto Ogawa: Complete genome sequence of 3-chlorobenzoate-degrading bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and reclassification of the strains of the genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* based on phylogenetic and whole-genome sequence analyses. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, Article 133, 2019.

2) Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Yu Kanesaki and Naoto Ogawa: Transcriptome differences between *Cupriavidus necator* NH9 grown with 3-chlorobenzoate and that grown with benzoate. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, in press

既発表学術論文

1) Ryota Moriuchi, Kaori Takada, Masae Takabayashi, Yuko Yamamoto, Jun Shimodaira, Naoko Kuroda, Emiko Akiyama, Mayumi Udagawa, Ryoichi Minai, Masao Fukuda, Toshiya Senda and Naoto Ogawa: Amino acid residues critical for DNA binding and inducer recognition in CbnR, a LysR-type transcriptional regulator from *Cupriavidus necator* NH9. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 81, No. 11, p.2119-2129, 2017.