

2014年度 生物工学功績賞 受賞



細菌走化性の分子生態工学的研究と微生物機能を活用するケミカル生産に関する研究

加藤 純一



Molecular ecological engineering of microbial chemotaxis and biotechnology for microbial chemical production

Junichi Kato (*Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530*) *Seibutsu-kogaku* **93**: 70-75, 2015.

はじめに

細菌走化性とケミカル生産，非常にかけ離れた内容と思われるかもしれない。しかし，細菌走化性では微生物の物質認識機能に着目し，ケミカル生産では微生物が有する物質変換能を利用する，すなわちいずれも微生物の優れた生物機能を活用した生物工学的研究であると認識しており，特段ばらばらなテーマで研究を行っているとは思っていない。本来であれば，両テーマについて紹介すべきであろうが，本稿ではより解説が必要となる（というよりは，より解説したい）細菌走化性と「分子生態工学」について紹介したい。なお，微生物によるケミカル生産については，*Journal of Bioscience and Bioengineering*で発表した我々の論文¹⁻⁵⁾を参照いただきたい。また，現在，微生物機能を活用して福島復興に寄与するバイオ技術開発を展開しているが，それについては文献6を参照されたい。

培養の direct regulation, レーダー搭載型環境浄化細菌

1990年，大竹久夫先生が主宰する広島大学工学部発酵工学講座培養工学研究室に助手として赴任した。赴任後開始した研究テーマの一つが細菌走化性の分子機構解明であった。細菌は周囲の化学物質の濃度変化を感知し，「好ましい」物質の濃度が高い領域に集積し，「好ましくない」物質からは逃避する。この行動的環境応答を走化

性という（図1）。細菌は化学物質の濃度勾配を認識して走化性を引き起こすのであるが，細菌細胞はきわめて小さいため，ある時点での空間的濃度勾配を検知することはできない。その代わり，泳ぎながら常時特定の化学物質の濃度を感知し，過去の濃度情報（3秒前の情報）と現在の濃度情報を比較し，その演算結果に基づいて鞭毛モーターの回転方向を制御し，走化性応答を示す。いわば， μ サイズのセンシング-プロセッサシステムともとらえることができる。当時，大竹先生は微生物培養系での制御が，pHであったり，通気量であったり，微生物細胞に対し間接的な制御しかないことに不満を抱いておられた。しかし，もし走化性「センシング-プロセッ

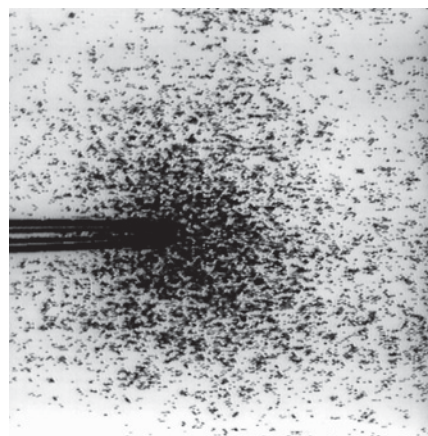


図1. 誘引物質を含むガラスキャピラリー開口部に走化性応答を示す *Pseudomonas aeruginosa*

サーシステム」を活用できれば、微生物細胞に直接シグナルを入力するdirect regulationが可能になるのではないかと発想され、走化性研究を開始した。もう一つの出口として考えられたのは、走化性機能を強化した環境浄化細菌の育種である。走化性/運動性機能を有さない細菌への走化性の付与はきわめて困難であるが、運動性/走化性機能を有する環境浄化細菌に、浄化の対象となる環境汚染物質に対する正の走化性を付与できれば、積極的に汚染物質を探し出して分解する「レーダー搭載型環境浄化細菌」を創成できると発想したのである。実のところ、斬新な制御法となるであろうdirect regulationについての筆者の理解は消化不足で、もっぱら分かりやすい「レーダー搭載型環境浄化細菌」に飛びつき、漫画まで自作した(図2)。そして、運動性が良好であることと、バイオレメディエーションを勘案し、その当時走化性研究があまり進んでいなかった*Pseudomonas aeruginosa*を研究対象に選んだ。実は、この菌株選択がラッキーであったことは、後年になって判明した。

最初に行ったのは、走化性アッセイ法の確立である。標準的なキャピラリーアッセイ (Alder法)⁷⁾は手間暇がかかることから、走化性応答の顕微動画(図1)をビデオ録画し、そのビデオ画面上の菌体数の増加率で走化性を測定する改変キャピラリー法を開発した⁸⁾。この方法は2-3分の測定で定量的に走化性を評価できる簡便・迅速な測定法である。顕微画像を用いるので直感的にも分かりやすいので、より簡易な判定的利用も可能である。以降の研究に対する本測定法の貢献は計り知れないものがある。

ゲノム時代到来

感知できる化学物質のレパートリーをその細菌の走化性の「個性」と見なすことができよう。非常に研究が進んでいた*Escherichia coli*は5つの走化性センサーを有する。*P. aeruginosa*の走化性研究の早い時期から、我々

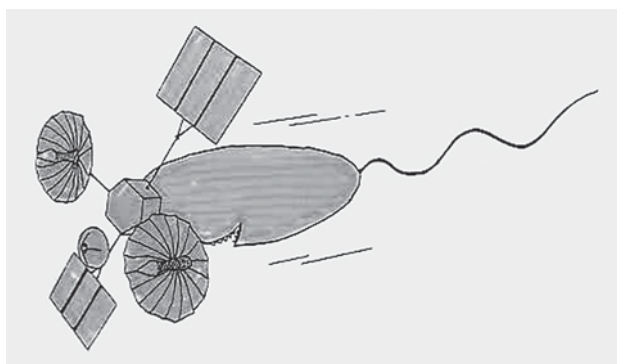


図2. レーダー搭載型環境浄化細菌

はこの細菌がかなり多数の走化性センサーを有している(つまり個性豊か)であることに気づいていた⁹⁾。幸運なことにすでに*P. aeruginosa* PAO1のゲノム解析が進行しており、筆者はゲノムアノテーションの国際コンソーシアに加わり走化性と運動性に関わる遺伝子のアノテーションを担当した¹⁰⁾(著者には入っていないが、acknowledgementsに入っている)。アノテーションを通じ、*P. aeruginosa*が26もの走化性センサー遺伝子、それに3セットの細胞内走化性シグナル伝達系遺伝子を有するというきわめて特徴的なゲノムを持つことを、文献10が公表されるかなり前から知っていた。

典型的な走化性センサーは図3のような構造をしている。すなわち、N末端に2か所の膜貫通領域を持つ膜貫通型のホモダイマーであり、膜貫通領域に挟まれた部分がペリプラズムドメインを構成し、C末端側が細胞質内のシグナルドメインを構成する。走化性リガンドはペリプラズムドメインに結合する。走化性リガンドの多様性を反映し、ペリプラズムドメインの配列は多様性に富んでいる。それに対し、シグナル伝達系のタンパク質と相互作用する細胞質内ドメインの配列は保存されている。特にCheWタンパク質が結合する約50アミノ酸残基からなるシグナル領域は原核生物全体で高度に保存されている。したがって、シグナル領域をクエリー配列としたBlastp解析できわめて容易に走化性センサーを特定することができる(ちなみに環境細菌は実に多数の走化性センサー(20~60)を有する傾向がある)。しかし、感知する化合物が特定された走化性センサーは*E. coli*と*Salmonella typhimurium*のものを除き、ほとんどない状況であった。そのため、ペリプラズムドメインの配列の

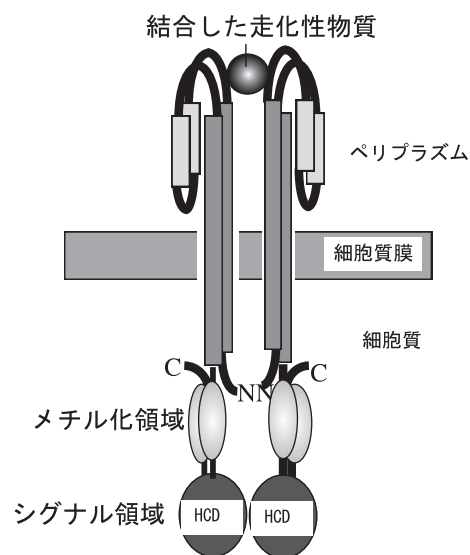


図3. 典型的な走化性センサーの構造

Blastp解析によりある走化性センサーの走化性リガンドを予測するなどと言うことは、望むべくもないことであった。

そこで、事前に得た*P. aeruginosa*のゲノムデータを基に26の走化性遺伝子の単独破壊株ライブラリーを3年かけて構築した。そしてそのライブラリーのスクリーニングにより、アミノ酸、リン酸、酸素、リンゴ酸、エチレンに対する走化性センサーの特定に成功した¹¹⁻¹⁶。環境汚染物質関連では、トリクロロエチレン、クロロホルム、チオシアン酸エステル、クロロアニリンの走化性センサーを特定できた¹⁷⁻¹⁹。

走化性センサーの特性化

*P. aeruginosa*には26も走化性センサーがあるためか、一つの走化性物質を感知する走化性センサーが複数ある場合が多い。アミノ酸を感知する走化性センサーはPctA、PctBおよびPctCの3つであり、それらの遺伝子は互いに隣接してゲノム上にコードされている。PctA、PctBおよびPctCはそれぞれ18、7、2種類のアミノ酸を認識する(図4)¹³。*E. coli*も複数のアミノ酸走化性センサー(TsrおよびTar)を持つ。TsrとTarはそれぞれセリン、アスパラギン酸という極限られた数のアミノ酸を認識する。それに対し、PctAは18種類ものアミノ酸を認識する。TsrとTarのペリプラズムドメインは約150アミノ酸残基とコンパクトであるのに対し、PctAのペリプラズムドメインは約240アミノ酸残基と長い。それ故、PctAは複数のアミノ酸結合サイトを持ち、そのため多数のアミノ酸を認識できると考えた。最近、PctA

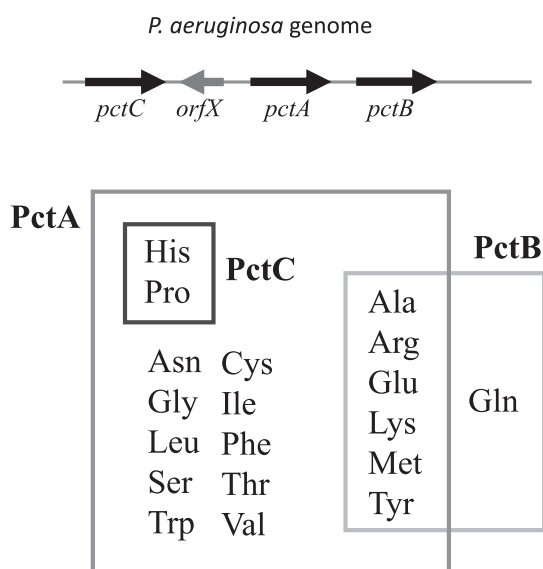


図4. *pctA*, *pctB*, *pctC* 遺伝子の配置とそれぞれのセンサーが感知するアミノ酸

のペリプラズムドメインの結晶構造解析がなされたので、実際にどのようにアミノ酸が結合するかについても明らかになるであろう²⁰。現在多数の細菌ゲノムが解読されているが、この*pctA*のオースログは運動性細菌に広く分布しており、アミノ酸走化性が細菌の生存に重要な役割を果たしていることが推測される。ところでこれらアミノ酸走化性センサーは、トリクロロエチレンやクロロホルムに対する忌避応答(負の走化性)のセンサーでもあることが分かっている¹⁸。トリクロロエチレンやクロロホルムがPctABCのどの部位に結合するのか、興味あるところである。

リン酸は生命に必須の分子であり、環境中ではしばしば枯渇することから、無機リン酸に走化性を示したとしても驚くに当たらないだろう。しかし、100年以上続いている走化性研究の中で細菌のリン酸走化性を初めて発見したのは筆者らであった²¹。実はこれ、種も仕掛けもある話で、Adlerらが走化性測定で推奨した緩衝液はリン酸バッファー(これではリン酸走化性は測定できない)であったのに対し⁷、筆者らはHEPESバッファーを菌体懸濁液に用いていたため、「運良く」リン酸走化性を発見することができたのである(それと*E. coli*や*S. typhimurium*はリン酸走化性を示さない)。リン酸走化性のセンサーも複数存在する(CtpHとCtpL)(図5)¹⁴。この二つのセンサーは機能的に役割分担がなされており、CtpHは高濃度のリン酸、CtpLは低濃度のリン酸の感知を行っている。両センサーともリン酸欠乏条件で発現が誘導されるが、CtpLがいわゆるリン酸レギュロン

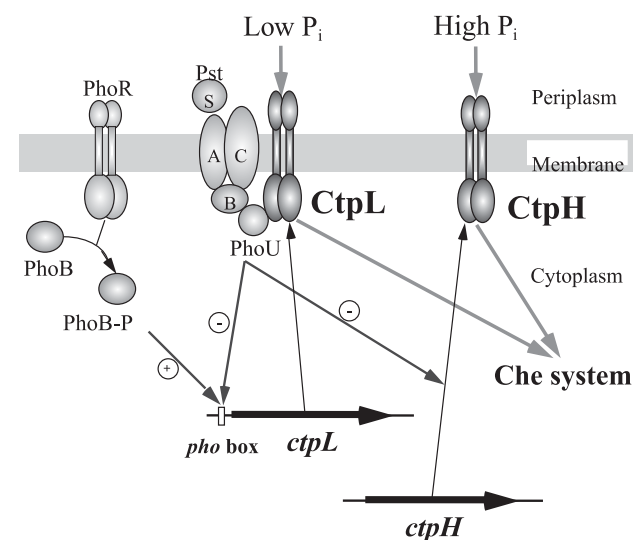


図5. リン酸走化性の分子機構。CtpL、低濃度リン酸走化性センサーCtpH、高濃度リン酸走化性センサー；PhoR/PhoB、リン酸レギュロンのHisキナーゼ/レスポンスレギュレーター；Pst、リン酸特異的トランスポーター。

侵入し感染を引き起こす。 *P. fluorescens* は植物の根圏に定着し、病原菌の感染を直接的（抗生物質の生産）、間接的（ニッチの占有）に防除するとともに、バイオアベイラビリティの低い栄養源の植物利用性を高めたり（不溶性リン酸の可溶化）、植物ホルモン様化合物を分泌することで植物の成長を促進する。植物感染にしても、根圏定着にしてもまずは環境細菌が当該の植物宿主と出会わなければ始まらないはずで、その生物-生物間の出会い（すなわち生態学的生物相互作用の最初期段階）に走化性が関与するとの作業仮説は妥当なものと考えられる。確かに少なからずのところ「*R. solanacearum* の根圏への移動、根の傷口の探索、*P. fluorescens* の根圏への移動には走化性が関与する」となげなく説明されているが、実際にそれが実験的に証明されたのは21世紀に入ってからである。しかし、具体的にどの化合物に対する走化性がこれら生物相互作用の最初期過程に関与しているかは分からずじまいであった。それは偏に走化性センサーの特性化が遅れていたためである。

そこで、*P. fluorescens* Pf0-1株を用い、走化性センサーの特性化を行った。まず、*P. fluorescens* Pf0-1の植物関連物質に対する走化性応答を調べた結果、*P. aeruginosa*と同様にアミノ酸やジカルボン酸（リンゴ酸、コハク酸、フマル酸）に対し強い走化性応答を示すことが分かった²⁴⁾。一方、糖に対しては走化性応答を示さなかった。アミノ酸やジカルボン酸は根分泌物の主要成分であるので、これらの走化性センサーを探索した。*P. fluorescens* Pf0-1は37の走化性センサー遺伝子を持ち、その中には *P. aeruginosa* *pctA* のオーソログが3遺伝子ある。それらをPCRで増幅してプラスミドにクローニング、*P. aeruginosa* の *pctABC* 変異株（アミノ酸走化性欠損株）に導入したところ、確かにアミノ酸走化性センサーであることが確認でき、*ctaA*, *ctaB*, *ctaC* と命名した。これらもやはり *PctA* タイプの性質を持ち、多数のアミノ酸（それぞれ16アミノ酸、16アミノ酸、5アミノ酸）を感知する。ジカルボン酸に対する走化性センサーは、*P. fluorescens* Pf0-1の37の走化性センサー遺伝子のプラスミドライブラリーを構築し、それを *P. aeruginosa* PAO1のL-リンゴ酸走化性変異株に導入し、L-リンゴ酸走化性の復帰を指標にスクリーニングした。その結果、*mcpS1* と *mcpS2* の2遺伝子の導入によりL-リンゴ酸走化性が復帰することが分かった²⁵⁾。McpS1とMcpS2はL-リンゴ酸に加え、コハク酸も感知する。

ついで、*P. fluorescens* の根コロニー形成へのアミノ酸やジカルボン酸に対する走化性の寄与を検討するために、トマトを用い競合的根コロニー形成試験を行った。この試験では、トマトを無菌的に砂耕栽培し、その砂に

検定菌と競合菌を1:1に混合して接種する。1~2週間後に根を回収し、根上に存在するそれぞれの菌株の細胞数を比較することで、根コロニー形成競合能を比較する試験である。*P. fluorescens* Pf0-1親株とPf0-1のアミノ酸走化性欠損株 (Δ *ctaABC*株) との競合試験では Δ *ctaABC*株の競合的コロニー形成能が有意に劣っていた(図7)。次に、アミノ酸走化性欠損株 (Δ *ctaABC*株) とアミノ酸+ジカルボン酸走化性欠損株 (Δ *ctaABC-mcpS1S2*株) を比較すると Δ *ctaABC*株の競合能の方が有意に優れていた。以上の結果から、*P. fluorescens* の主要な根分泌物アミノ酸、カルボン酸に対する走化性は効率的な根コロニー形成に寄与していることが初めて示された。

R. solanacearum の走化性センサー特性化は難儀した。*P. fluorescens* と同様に *R. solanacearum* が有する22の走化性センサー遺伝子のプラスミドライブラリーを構築し、*P. aeruginosa* のアミノ酸走化性変異株もしくはL-リンゴ酸走化性変異株に導入することでアミノ酸、L-リンゴ酸の走化性センサーの特定を図ったが、いずれも特定できなかった。そこで、*R. solanacearum* の走化性センサー遺伝子単独破壊株ライブラリーを構築し、それをスクリーニングする戦略に転換した。その結果、アミノ酸走化性センサーMcpAとL-リンゴ酸走化性センサーMcpMを特定することに成功した²⁶⁾。ついで、*P. fluorescens* の競合的根コロニー形成試験で用いたトマトの無菌培養系を利用して、トマト感染へのアミノ酸、L-リンゴ酸走化性の寄与を検討した。その結果、アミノ酸走化性変異株 (Δ *mcpA*株) は親株と同等のトマト感染能を有するが、L-リンゴ酸走化性変異株 (Δ *mcpM*株) は感染能が有意に低下していることが分かった(図8)。

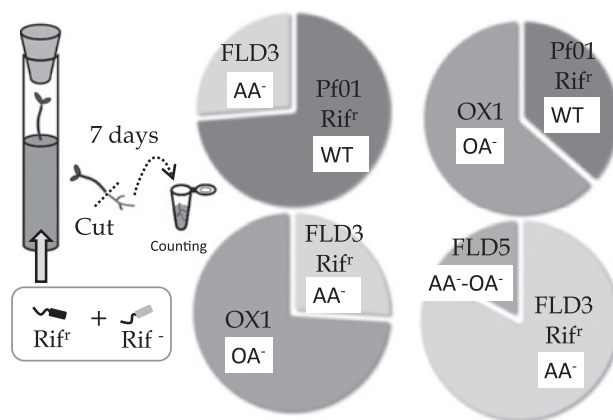


図7. *Pseudomonas fluorescens* の競合的根コロニー形成試験。トマトを植えた試験管に2種の菌株を同時に植菌する。2週間後、根を回収し、根に存在する菌株を平板計数法で定量した。WT: 親株, AA⁻: アミノ酸走化性欠損株, OA⁻: 有機酸走化性欠損株, AA⁻-OA⁻: アミノ酸/有機酸走化性欠損株。

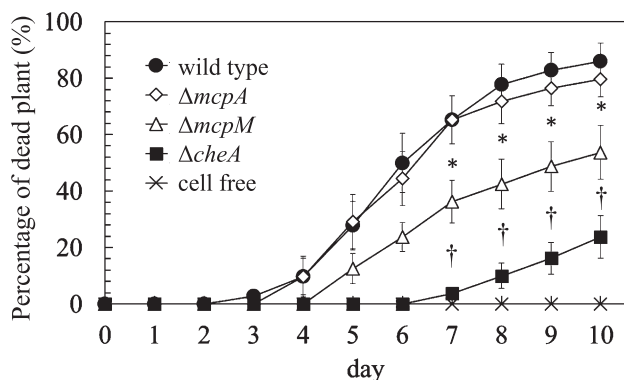


図8. *Ralstonia solanacearum*のトマト感染実験。トマトを植えた試験管に野生株、アミノ酸走化性欠損株 ($\Delta mcpA$)、リンゴ酸走化性欠損株 ($\Delta mcpM$)、走化性全般の欠損株 ($\Delta cheA$)を植菌し、枯死したトマトの割合を計測した。Cell freeはコントロール。

分子生態工学

生態学的生物相互作用の最初期過程で走化性が重要な役割を果たしていることが分かってきた。さらに筆者らの研究により、その最初期過程に関与する具体的な走化性リガンドおよび走化性センサーも明らかになってきている。となると、走化性を標的にして環境細菌の生態学的挙動を制御したくなるのは、生物工学研究者の当然ながらの性である。筆者はこれを分子生態工学と称し、今後の研究の主課題に据えるつもりである。前節の菌株でたとえるならば、*P. fluorescens*のアミノ酸やジカルボン酸への走化性応答を強化して根圏定着能を向上させる(それによってPGPR能をより効果的に発揮させる)、あるいは、*R. solanacearum*の走化性をかく乱することにより植物感染の防除を図ることが分子生態工学に相当しよう。現在まだ予備的試験の段階であるが、*R. solanacearum*の走化性/運動性をかく乱することで、確かに植物感染能を低下させることができるとの結果を得ている。今後研究対象を他の生態的に重要な運動性細菌に広げ、分子生態工学を実践していきたいと考えている。

謝 辞

本稿の研究成果は、多くの方々からのご指導、ご援助が初めて得られたものである。広島大学での大竹久夫先生(現・大阪大学)、黒田章夫先生、池田幸先生(現・宇都宮大学)、滝口昇先生(現・金沢大学)、田島譽久先生、中島田豊先生、東京大学での兒玉徹先生、五十嵐泰夫先生、イリノイ大学でのAnanda M. Chakrabarty先生はじめ、お世話になった多くの先生方、所属した学生諸君にこの場を借りて御礼申し上げます。

文 献

1) Na, K.-S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohatek, H., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 378–382 (2005).

2) Na, K.-S., Nagayasu, K., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohatek, H., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 408–414 (2005).

3) Sameshima, Y., Honda, K., Kato, J., Omasa, T., and Ohtake, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 199–203 (2008).

4) Hamada, T., Maeda, Y., Matsuda, H., Sameshima, Y., Honda, K., Omasa, T., Kato, J., and Ohtake, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 116–120 (2009).

5) Kataoka, N., Vangnai, A. S., Tajima, T., Nakashimada, Y., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 475–480 (2013).

6) 加藤純一, 金原和秀, 佐々木健, 中村雅哉, 中島田豊, 平井浩文, 大塚祐一郎, 新谷政己: *生物工学*, **92**, 287–290 (2014).

7) Adler, J.: *Science*, **166**, 1588–1597 (1969).

8) Nikata, T., Sumida, K., Kato, J., and Ohtake, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2250–2254 (1991).

9) 黒田章夫, 滝口 昇, 加藤純一, 大竹久夫: *蛋白質核酸酵素*, **41**, 146–153 (1996).

10) Stover, C. K. et al.: *Nature*, **406**, 959–964 (2000).

11) Kato, J., Kim, H.-E., Takiguchi, N., Kuroda, A., and Ohtake, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 1–7 (2008).

12) Kuroda, A., Kumano, T., Takiguchi, K., Nikata, T., Kato, J., and Ohtake, H.: *J. Bacteriol.*, **177**, 7019–7025 (1995).

13) Taguchi, K., Fukutomi, H., Kuroda, A., Kato, J., and Ohtake, H.: *Microbiology*, **143**, 3223–3229 (1997).

14) Wu, H., Kato, J., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., and Ohatek, H.: *J. Bacteriol.*, **182**, 3400–3404 (2000).

15) Hong, C. S., Shitashiro, M., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kato, J.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **231**, 247–252 (2004).

16) Kim, H.-E., Shitashiro, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., and Kato, J.: *Microbes Environ.*, **22**, 186–189 (2007).

17) Kim, H.-E., Shitashiro, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kato, J.: *J. Bacteriol.*, **188**, 6700–6702 (2006).

18) Shitashiro, M., Tanaka, H., Hong, C. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 396–402 (2005).

19) Vangnai, A. S., Takeuchi, K., Oku, S., Kataoka, N., Nitisakulkan, T., Tajima, T., and Kato, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7241–7248 (2013).

20) Rico-Jiménez, M., Muñoz-Martínez, F., Krell, T., Gavira, J. A., and Pineda-Molina, E.: *Acta Cryst.*, **F69**, 1431–1435 (2013).

21) Kato, J., Ito, A., Nikata, T., and Ohtake, H.: *J. Bacteriol.*, **174**, 5149–5151 (1992).

22) Hong, C. S., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kato, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 184–190 (2004).

23) Hong, C. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kato, J.: *J. Bacteriol.*, **187**, 1533–1535 (2005).

24) Oku, S., Komatsu, A., Tajima, T., Nakashimada, Y., and Kato, J.: *Microbes Environ.*, **27**, 462–469 (2012).

25) 奥 正太, 小松彩夏, 桑野靖之, 田島譽久, 中島田豊, 加藤純一: 第29回日本微生物生態学会大会要旨集, p. 95 (2013).

26) 緋田安希子, 奥 正太, Tunchai, M., 中里憲司, 高西寿洋, 米田佳那子, 田島譽久, 中島田豊, 加藤純一: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 219 (2013).