

東北大学大学院生命科学研究科

微生物進化機能開発寄附講座

## 実績報告書

2016年10月1日～2022年3月31日

2022年3月

教授 永田 裕二

講師 矢野 大和

助教 加藤 広海

助教 佐藤 優花里

学術研究員 野々山 翔太

## 目次

1. 寄附講座の概要	2
2. 研究内容と成果の概要	3
3. 研究費	22
4. 教育実績	23
5. 研究業績	24

## 1. 寄附講座の概要

本学の生命科学研究における微生物分野を活性化させるために、本学大学院生命科学研究科に、公益財団法人発酵研究所（IFO）の支援の元に、本寄附講座を開設した。微生物は未だ未開拓な多くの潜在能力や、未解明な生命現象を有し、生命科学研究の対象として重要である。さらに、ゲノム・メタゲノム解析技術の著しい進歩などの技術的革新もあり、微生物研究はこれから益々活性化が期待される分野である。本寄附講座では、特に微生物の難分解性環境汚染物質分解能力に焦点を絞り、環境浄化への貢献も視野に入れながら、微生物の機能進化機構の解明と未開拓能力の開発手法の確立を目指した。生命科学研究科では、本寄附講座を設置することで、当該分野における先進的な研究体制を確立すると共に、微生物関連分野における新たな展開への挑戦が可能となり、本研究科における微生物研究の活性化と継続性の維持・展開および微生物研究を志す学生の受入体制が拡大した。生命科学研究科における微生物分野の活性化は、本学のみならず、東北地区、さらには日本全体の発展に貢献した。

本寄附講座における研究では、環境細菌の環境汚染物質などの新規物質代謝能に焦点を絞り、環境細菌の環境適応・機能進化機構の本質を包括的に理解し、細菌機能の実環境での高度利用、および画期的な未開拓潜在機能開発に応用するための基盤を確立することを目的とし、一連の研究を通じて学生の教育と生命科学分野の指導的人材の育成を実施した。微生物の様々な機能に対して応用可能な普遍性の高い成果が得られたことから、今後、微生物の機能開発の新たな方法論として微生物関連分野全般に大きな波及効果が期待できる。さらに、各種化学物質による環境汚染は未だ世界的規模で深刻な問題であり、環境浄化への応用の観点からも本研究の社会的重要性は高く、本研究の成果は、微生物研究のフラッグシップとして、微生物機能開発の有用性の社会的再認識と将来的な微生物研究の活性化にも繋がるものと期待される。

## 2. 研究内容と成果の概要

### 2-1. はじめに

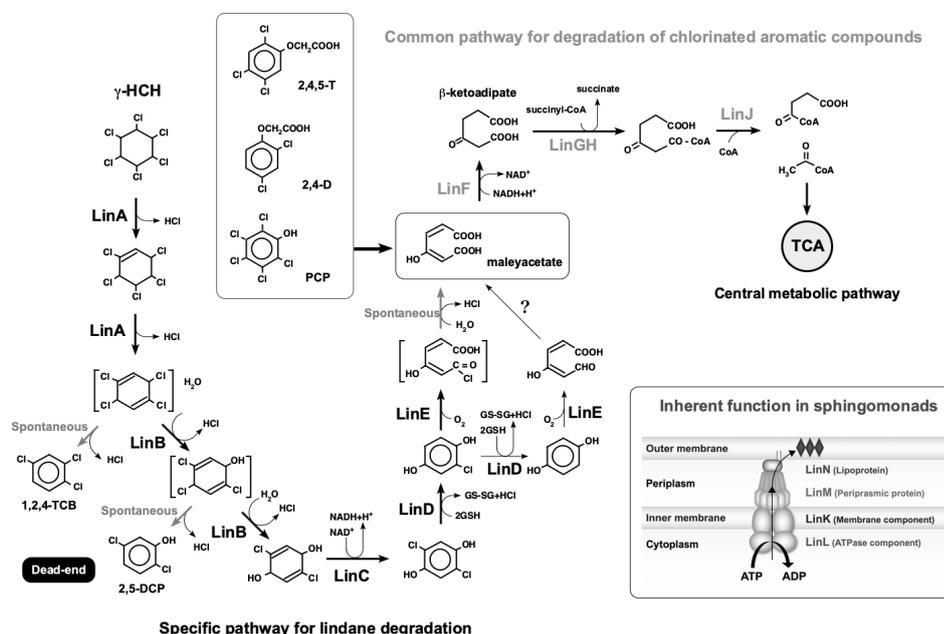
人類の活動によって、様々な化学物質が環境中に放出され、深刻な環境問題を引き起こしている一方で、人為起源の難分解性物質をも分解・資化する微生物の存在が知られている (Janssen *et al.*, 2005)。それら微生物は、比較的短期間で新奇物質代謝能を獲得したと考えられ、環境浄化への応用だけでなく、生物の環境適応・進化機構の解明という基礎学問的にも優れた研究対象である。これまでに、様々な環境汚染物質分解資化細菌に関する研究が行われ、難分解性の環境汚染物質の中では比較的易分解性である芳香族化合物の分解資化細菌の分解代謝系遺伝子群は、発現制御系を備えたセットとして存在し、可動性遺伝因子に載って環境細菌中に流布していることが明らかになっている (Tsuda *et al.*, 1999)。これに対して、人工農薬などの高度に難分解性の環境汚染物質については、完全分解細菌の報告例はあるものの (Janssen *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2016)、それら細菌がどのように新奇代謝能力を獲得したのかは不明な点が多い。

有機塩素系殺虫剤  $\gamma$ -ヘキサクロロシクロヘキサン ( $\gamma$ -HCH) は人為起源の難分解性物質であり、ストックホルム条約により残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) にも指定され、その汚染に対する国際的な取り組みが求められている。HCH には 8 つの異性体 (鏡像異性体を含めると 9 つ) が存在する。殺虫活性を有するのは  $\gamma$ -HCH のみであるが、工業生産の際に、主に 4 つの異性体  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -体が生じ、これら異性体の全てが環境中に残留し、汚染物質として問題になっている (Vijgen *et al.*, 2011)。中でも  $\beta$ -HCH は塩素原子の全てがシクロヘキサン環のエクアトリアル位置に存在するために化学的に最も安定である。

$\gamma$ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株は、 $\gamma$ -HCH が 12 年間散布された日本の試験圃場から単離された (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989)。UT26 株は  $\gamma$ -HCH を唯一炭素源として生育し、その代謝経路と代謝反応を触媒する酵素、およびそれら酵素をコードする *lin* 遺伝子群が解明された (Fig. 1)。本代謝経路において、 $\gamma$ -HCH は各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である  $\beta$ -ケトアジピン酸を経て代謝されたため、LinA ( $\gamma$ -HCH dehydrochlorinase)、LinB (1,4-TCND halohydrolyase)、LinC (2,5-DDOL dehydrogenase)、LinD (2,5-DCHQ reductive dehalogenase)、LinE (CHQ 1,2-dioxygenase)、LinF (マレイル酢酸 reductase) の 6 つの代謝酵素によって担われる  $\beta$ -ケトアジピン酸までの代謝が  $\gamma$ -HCH 分解に特異的な反応と考えられる (Nagata *et al.*, 2007)。UT26 株は、 $\gamma$ -HCH の完全分解が可能であるが、代謝過程で有毒な dead-end 産物を生じる (Fig. 1)。また、*linA*, *linB*, *linC* は構成的に発現

している (Nagata *et al.*, 2007)。さらに, *lin* 遺伝子群はゲノム中に散在し、第一染色体に存在する *linA*, *linB*, *linC* はオペロンを形成していない (Nagata *et al.*, 2011)。 *linA*, *linC* および *linRED* クラスターの近傍には挿入配列 *IS6100* が存在し, *lin* 遺伝子群の遺伝的不安定さの主要因となっている。このように, UT26 株の  $\gamma$ -HCH 代謝経路は洗練度が低く、成立して間もない代謝系であることを示唆する多くの特徴を有している (Nagata *et al.*, 2019)。

UT26 株以外にも,  $\gamma$ -HCH を分解資化する細菌株が世界各地の汚染環境から単離されているが、分解に関与する酵素遺伝子が解明されている  $\gamma$ -HCH 分解資化菌は、ほぼ全てスフィンゴモナッド細菌群に属する (Lal *et al.*, 2010)。スフィンゴモナッド細菌群は *Alphaproteobacteria* に属するグラム陰性菌で、外膜にリポ多糖を持たずにスフィンゴ糖脂質を持ち (Kawahara *et al.*, 1990)、多様な難分解性物質の分解能を有する株が単離されていることから、潜在的に多彩な物質代謝能を有する細菌群と考えられて



**Fig. 1** Functions necessary for  $\gamma$ -HCH utilization in sphingomonads (Nagata *et al.*, 2019).  $\beta$ -Ketoacid pathway is common pathway for the degradation of aromatic compounds and is widely distributed among environmental bacteria. 1,2,4-TCB and 2,5-DCP are dead-end products, and 2,5-DCP has toxic effect on the cells. The LinKLNM-type ABC transporter, which is an inherent function in sphingomonads, is involved in the tolerance for the toxic effect of 2,5-DCP.

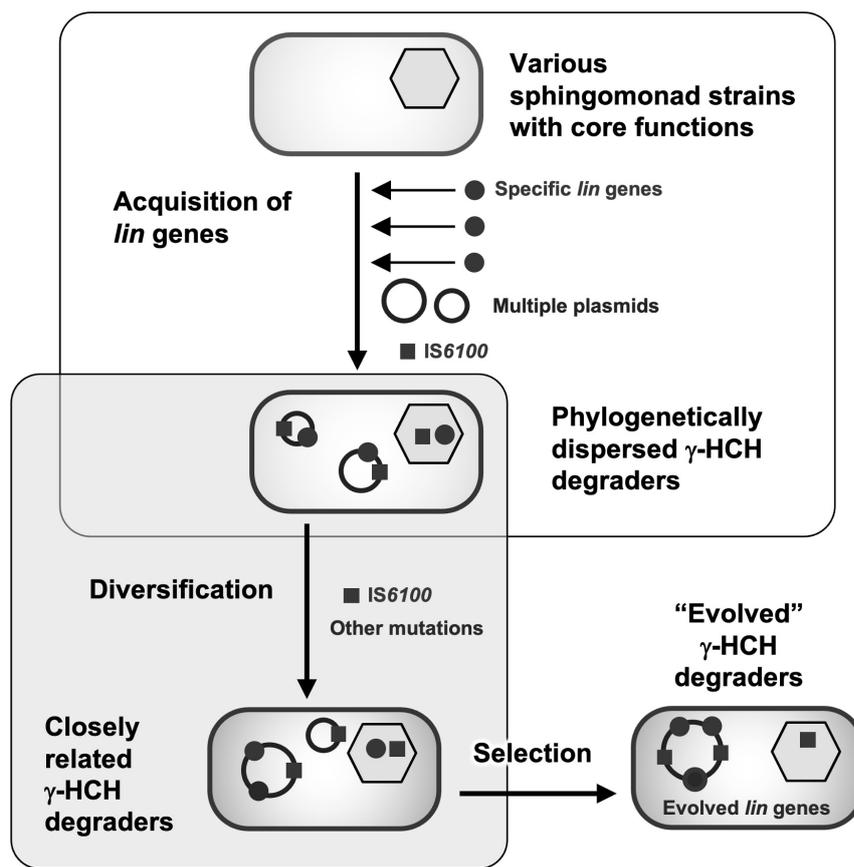
いる (Stolz, 2009)。我々の研究グループは、UT26 株に加えて、 $\gamma$ -HCH 分解資化細菌 *Sphingomonas* sp. MM-1 株、*Sphingobium* sp. MI1205 株、*Sphingobium* sp. TKS 株の全ゲノム配列を完全決定した (Tabata *et al.*, 2016)。これらの株は、16S rRNA 遺伝子の解析により、互いに系統学的にある程度離れているが、 $\gamma$ -HCH 分解に関しては、UT26 株の *linA* から *linE* とほぼ同一の遺伝子を利用する。このことは、同一起源の  $\gamma$ -HCH 分解細菌株が世界中に広まったのではなく、複数の祖先株がほぼ同一の  $\gamma$ -HCH 代謝に必要な「特殊遺伝子」を獲得し、 $\gamma$ -HCH 分解細菌株が世界各地で「独立に」誕生したことを強く示唆する。また、代謝酵素遺伝子以外にも、UT26 株の  $\gamma$ -HCH 分解資化には *linKLMN* がコードする ABC トランスポーターが必須である (Endo *et al.*, 2007)。*linKLMN* ホモログは、他の  $\gamma$ -HCH 分解細菌株のみならず、 $\gamma$ -HCH 分解能を持たないスフィンゴモナッド株にも保存されており、スフィンゴモナッド細菌群がコア機能として有する  $\gamma$ -HCH 分解に必要な因子と考えられている (Endo *et al.*, 2007)。すなわち、適当な遺伝的背景を持つ細菌株が特殊性の高い酵素をコードする *lin* 遺伝子群を獲得し、代表的な  $\gamma$ -HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株で解明された代謝経路で  $\gamma$ -HCH を分解資化すると考えられる。さらに、多様化と選択の過程を経て、進化型の  $\gamma$ -HCH 分解資化細菌が生まれると推察される (Fig. 2) (Nagata *et al.*, 2019)。しかし、このモデルにはまだまだ多くの謎が残っている。そもそも、特殊遺伝子をどこから、どのように獲得したのか？酵素進化のメカニズムはどのようなものなのか？進化に重要な細胞機能とはどのようなものなのか？また、実際の環境中では分解細菌が単独で存在している状況は考え難く、他細菌細胞との相互作用も重要なはずである。すなわち、集団の形成と集団としての進化はどのようなものなのか？

以上の背景を踏まえ、本寄付講座では、「細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と環境細菌の高度利用および未開拓潜在機能開発への応用」という題目を掲げ、 $\gamma$ -HCH 分解資化細菌を主な研究対象として、遺伝子 (ゲノム)・酵素・細胞・集団の各レベルから細菌が有する「特殊」機能を多面的に解析することで、細菌の環境適応・機能進化機構の本質を包括的に理解し、得られる知見を元に細菌の実環境での高度利用、および画期的な未開拓潜在機能開発に応用するための基盤を確立することを目的として、研究を実施した。

## 2-2. 研究成果の概要

### 2-2-1. 特殊性の高い遺伝子の起源と細菌がそれら遺伝子を獲得する機構

細菌が人工化合物の分解等で利用する特殊性の高い遺伝子の起源と、細菌がそれら遺伝子を獲得する機構の解明を目的として、 $\gamma$ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株の土壌環境中でのゲ

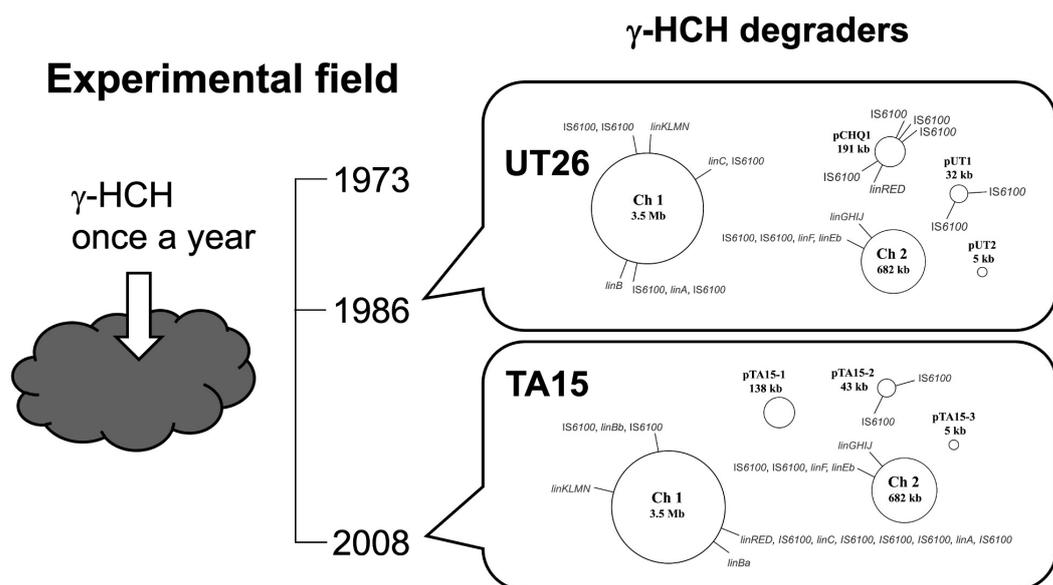


**Fig. 2** Proposed model for the emergence and evolution of  $\gamma$ -HCH-degrading sphingomonad strains (Nagata *et al.*, 2019). Ancestral various non- $\gamma$ -HCH-degrading sphingomonad strains with core functions, *e.g.* LinKLMN-type ABC transporter and  $\beta$ -ketoacid pathway turned to be primitive  $\gamma$ -HCH degraders by the acquisition of specific *lin* genes using sphingomonads-specific multiple plasmids and IS6100. The primitive  $\gamma$ -HCH degraders were diversified by the involvement of IS6100 and other mutations. The selective pressure may produce the 'evolved'  $\gamma$ -HCH degraders.

ノム進化に関する解析、 $\gamma$ -HCH 代謝における鍵反応を触媒する 2 種類の脱ハロゲン酵素 LinA と LinB をコードする遺伝子のキャプチャリング系の構築を実施すると共に、メンブレンベシクル (MV) が遺伝情報リザーバーとしての機能する可能性について検討した。

かつて UT26 株が単離された土壌 (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989) を  $\gamma$ -HCH で再汚染化したところ、菌叢が変化し、メタゲノム中の  $\gamma$ -HCH 分解関連遺伝子の割合が顕著に増加した。 $\gamma$ -HCH 分解細菌株が増加したと考えられたため、本再汚染化土壌から  $\gamma$ -HCH 分解細菌株を単離した。単離株の代表株

である TA15 株は、UT26 株とゲノムの基本骨格は同一であったが、*lin* 遺伝子群の構成と存在様式が異なっていた (Kato *et al.*, 2022) (Fig. 3)。特に、*lin* 遺伝子群の集中化と *linB* 遺伝子のコピー数の増加という顕著な違いが観察され、 $\gamma$ -HCH 分解機能に関する UT26 株との違いが予想された。そこで、本株の  $\gamma$ -HCH 分解機能を検討したところ、本株は UT26 株に比べて dead-end 産物の蓄積量が少なく、 $\gamma$ -HCH の代謝バランスの観点から、UT26 株に比べて進化型である可能性が示唆された (Kato *et al.*, 2022)。以上、実際の土壌中で、 $\gamma$ -HCH 分解機能に関するゲノム進化が進行中であることを提示した。



**Fig. 3** Genome evolution related to the  $\gamma$ -HCH metabolic function in the soil microbial population (Kato *et al.*, 2022).  $\gamma$ -HCH-degrading strain, *Sphingobium* sp. TA15, was newly isolated from an experimental field soil from which the archetypal  $\gamma$ -HCH-degrading strain, *S. japonicum* UT26, was isolated previously. Comparison of the complete genome sequences of these 2 strains revealed that TA15 shares the same basic genome backbone with UT26, but also has the variable regions that are presumed to have changed either from UT26 or from a putative common ancestor. Organization and localization of *lin* genes of TA15 were different from those of UT26. It was inferred that transposition of *IS6100* had played a crucial role in these genome rearrangements. The accumulation of toxic dead-end products in TA15 was lower than in UT26, suggesting that TA15 utilizes  $\gamma$ -HCH more effectively than UT26. These results suggested that genome evolution related to the  $\gamma$ -HCH metabolic function in the soil microbial population is ongoing.

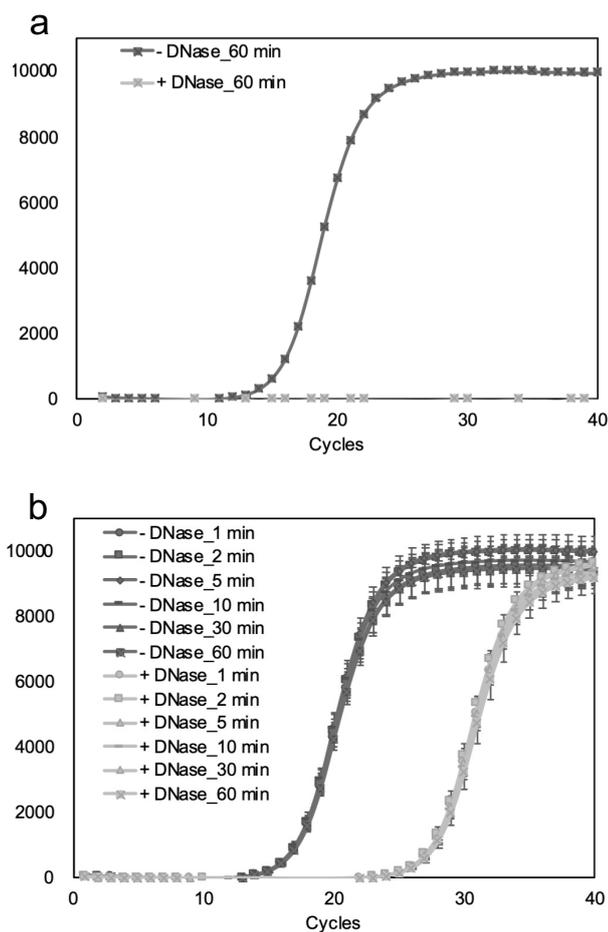
一方、天然の  $\gamma$ -HCH 分解細菌では、分解に関与する *lin* 遺伝子群がゲノム中に散在し、近傍に存在する IS6100 等の影響で遺伝的に不安定であるという問題がある (Tabata *et al.*, 2016)。そこで、UT26 株ではゲノム中に散在する *linA* から *linF* 遺伝子をクラスター化して IS6100 を持たない他のスフィンゴモナッド株に導入することで、人工的な  $\gamma$ -HCH 分解細菌を構築した。作製した人工株の中には、明らかに  $\gamma$ -HCH 資化能を示し、dead-end 産物の蓄積量が天然株より少ないものもあり、今後、天然株には存在しない発現制御系を備えさせるなど、本研究で得られた知見を元にして、より改良型の人工株の作製が期待できる。さらに、これら人工株を元に *linA* と *linB* のキャプチャリング株を構築し、これら株が、当該遺伝子導入により  $\gamma$ -HCH 資化能を回復することを確認した。

新たに蛍光標識するなどして作製した天然株由来の *linA* と *linB* のキャプチャリング株と、上記の人工株由来のキャプチャリング株を各種環境試料と混合し、当該遺伝子の取得を試みたが、期間内で目的の遺伝子取得株は得られなかった。本研究で作製した既存株で、さらに実験を行う必要がある。しかし、本研究でのスクリーニングの過程で、明確な  $\gamma$ -HCH 資化能を示さないにも関わらず、 $\gamma$ -HCH 培地上でわずかながらクリアゾーンを形成して生育する株が土壌環境試料に存在し、スクリーニングを阻害した。このようなノイズを排除するために、キャプチャリング株の改良を含め、さらなる取得系の改良が望まれる。

本研究では、近年、環境中で「遺伝情報のリザーバー」や「水平伝播のベクター」として機能することが示唆されている MV に着目した (Toyofuku *et al.*, 2019; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)。まず、 $\gamma$ -HCH 分解細菌 UT26 株が MV を産生することを明らかにした。また、 $\gamma$ -HCH 資化に必須の ABC トランスポーター LinKLMN 遺伝子破壊株では、野生株より多量の MV を産出した。さらに、UT26 株の MV には DNase による分解を受けにくい *linA* 遺伝子が含まれることを示し (Fig. 4)、MV が遺伝情報リザーバーとして機能する可能性を提示した。今後、UT26 株が産出する MV に存在する遺伝情報が、実際に細菌細胞に取り込まれて機能するか、検討する必要がある。

## 2-2-2. 脱ハロゲン酵素の機能進化

脱ハロゲン酵素は、有機ハロゲン系化合物の分解の鍵となる酵素であり、有機ハロゲン系化合物が環境汚染物質や工業副産物など、主要な有害物質グループのひとつであることから、応用的な観点から極めて重要な酵素である (Fetzner, 1998)。また、様々な人工的に合成された有機ハロゲン化合物が存在することから、それらに直接アタックする脱ハロゲン酵素は、酵素の起源や進化、構造-機能相関関係の研究にも適した研究材料である (Nagata *et al.*, 2016)。本研究では、脱ハロゲン酵素の機能進化に関する知見を得ることを目的として、 $\gamma$ -HCH 代謝系に関与する脱ハロゲン酵素のうち、類似酵素が

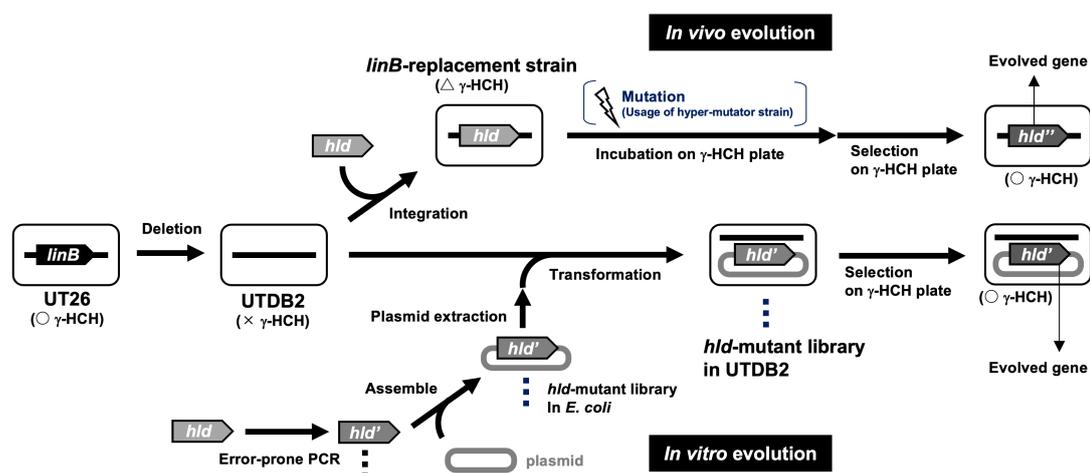


**Fig. 4** Membrane vesicle (MV) produced by UT26 has potential as genetic information reservoir. Effect of DNase treatment on abundance of *linA* gene in genomic DNA solution (a) and in membrane vesicle fraction (b) was analyzed by qPCR.

知られていないユニークな脱塩化水素酵素 LinA (Imai *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 2016) と、多くの類似酵素が知られており、構造-機能相関の研究に適した HLD の一員である LinB (Nagata *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 2015; Nagata *et al.*, 2016) に関する解析を行った。

$\gamma$ -HCH 代謝に関わる LinB は、細菌が広く有し、基質特異性が広く、活性特性が変化しやすいという特徴を有する HLD の一員である (Moriuchi *et al.*, 2014) が、既知の  $\gamma$ -HCH 分解菌で利用されている HLD は LinB のみである。本研究では、 $\gamma$ -HCH 分解細菌 UT26 株の *linB* 遺伝子を他の HLD あるいは HLD ホモログ遺伝子に置換した株を作製し、LinB 以外の HLD も  $\gamma$ -HCH 代謝に関与し得ることを明示した。

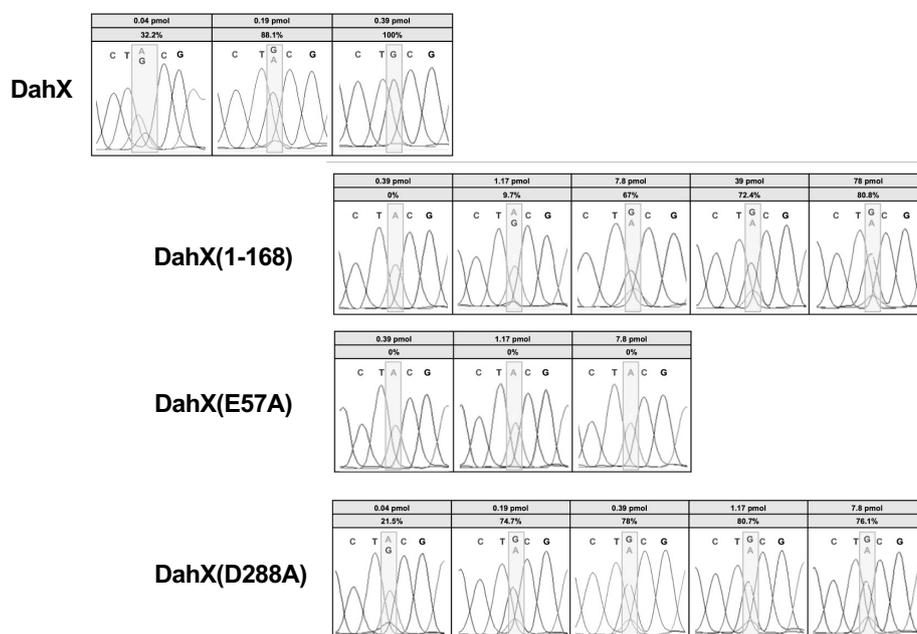
さらに、HLD の $\gamma$ -HCH 代謝機能に関する実験進化系を構築し (Fig. 5)、特に、error-prone PCR により変異を導入する *in vitro* 進化実験系において、実際に、dead-end 産物を蓄積しにくいという $\gamma$ -HCH 代謝における機能が向上したと考えられる進化型酵素の取得に成功した。以上、*in vivo* での生育を指標としたスクリーニングを用いる本実験進化系は良好に機能し、 $\gamma$ -HCH 資化に対する HLD の進化過程の一端を観察することができたと結論した。今後、得られた進化型酵素のより詳細な解析で、LinB 型の活性の鍵となるアミノ酸残基の機能解明が期待できる。



**Fig. 5** Strategy for experimental evolution of haloalkane dehalogenase (HLD) and its related proteins toward  $\gamma$ -HCH utilization.

ポリ塩化ビフェニル (PCB) /biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株 (Kimbara *et al.*, 1989) は、*Betaproteobacteria* に属し、全ゲノム配列も決定されている (Ohtsubo *et al.*, 2012)。KKS102 株のゲノムに、N 末端側に *Escherichia coli* K12 株の tRNA adenosine deaminase (TadA) (Wolf *et al.*, 2012) と有意な相同性を示す CDA 領域、C 末端側に HLD と相同性を示す融合タンパク質をコードする遺伝子を見出し、*dahX* と命名して解析を行った。遺伝子破壊株の解析から、本酵素の CDA 領域は、通常の増殖に必須ではないが、重要であることが明らかになった。本酵素の HLD 領域は、新奇の基質特性を有する HLD 活性を示した。また、CDA 領域は tRNA-specific deaminase 活性を示し、HLD と融合すること、

およびHLD活性が tRNA-specific deaminase 活性にも影響を及ぼしていると示唆された (Fig. 6)。以上、通常の増殖にも重要な tRNA-specific deaminase 活性を有する酵素と融合して存在する新奇な HLD を発見した。



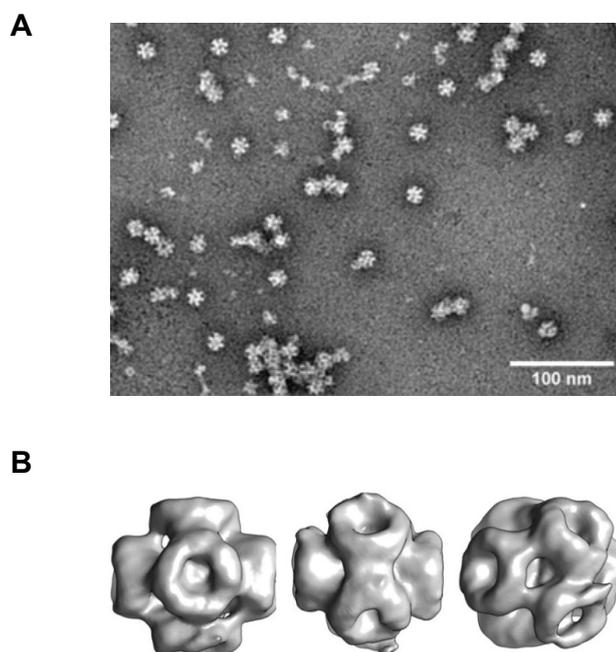
**Fig. 6** tRNA-editing activity of DahX and its derivatives. tRNA<sup>Arg</sup>\_A<sub>34</sub>CG was incubated with purified DahX and its derivatives, and the change of A<sub>34</sub> to I was detected by Sanger sequencing. Note that I is sequenced as G in this system. Concentration of proteins and ratio of the editing (%) are shown at the top of each wave form data.

さらに、酵素としても、コードする遺伝子としてもユニークな脱塩化水素酵素である LinA が、 $\gamma$ -HCH 関連物質だけでなく、重要な環境汚染物質である人工殺虫剤 DDT を DDE に変換する活性も有することを明らかにした。すなわち、人工化学物質の分解に関わるユニークな脱ハロゲン酵素の新たな潜在能力を提示した。以上、本研究において、脱ハロゲン酵素の潜在能力の高さと機能開発の素材としての有用性を提示することができた。

### 2-2-3. 細菌の環境適応・進化に関する細胞機能

細菌の環境適応・進化に関する細胞機能に関する知見を得ることを目的として、 $\gamma$ -HCH 分解資化細菌 *Spingobium japonicum* UT26 株の分解代謝酵素以外の $\gamma$ -HCH 資化に必須な因子である ABC トランスポーターLinKLMN と、本株の低栄養環境での増殖現象について解析を行った。

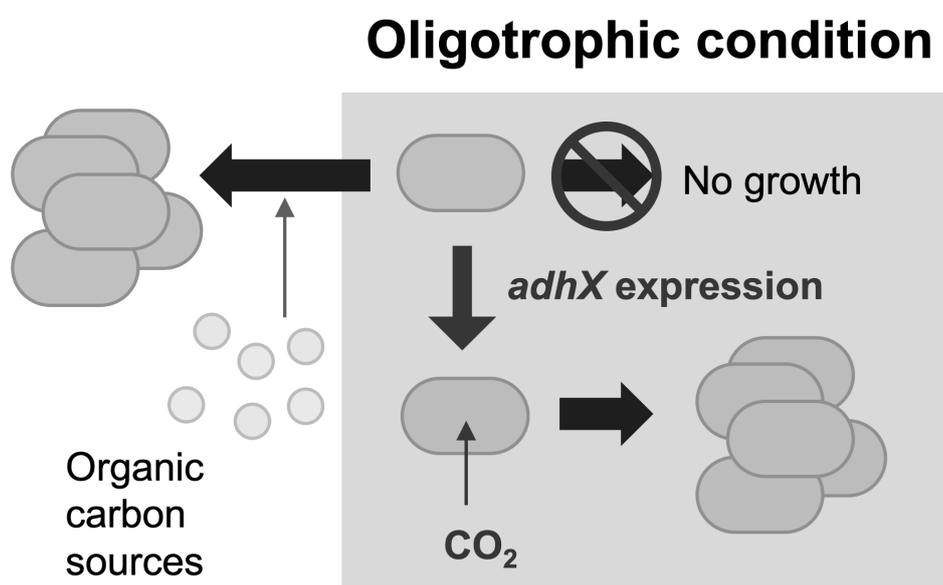
UT26 株の LinKLMN に関する以前の研究では、薬剤耐性遺伝子で当該遺伝子を破壊した株が用いられていた (Endo *et al.*, 2007) ため、本研究では、当該領域のみをマーカーレスで完全欠失した *linKLMN* 破壊株を新たに作製し、新たに作製した相補用プラスミドを持つ相補株と合わせて解析を行った。その結果、破壊株では、(i) コハク酸を唯一炭素源とした際の生育能が上昇すること、(ii) 細胞染色剤の取り込み能が上昇すること、(iii) 野生株に比べて多量の MV を産生すること、が明らかになった。さらに、LinKLMN 特有の機能を規定する因子と考えられる LinM と LinN の生化学的解析を実施し、(iv) 大腸菌で発現・精製した LinM にリン脂質が結合していると示唆された。以上の結果は、LinKLMN は細胞膜成分の輸送を介して細胞外膜の integrity に関与するという仮説を支持する。一方、LinM と LinN



**Fig. 7** Multimer structure of LinN, a component of LinKLMN ABC transporter system. Purified His-LinN expressed in *E. coli* was analyzed by TEM (a), and 3D structure model of His-LinN was constructed by using single molecules observed by TEM analysis (b).

がそれぞれ多量体を形成し、互いに相互作用する可能性を示唆する結果が精製蛋白質のゲルろ過クロマトグラフィー解析により得られた。特に LinN については、構造学的解析を進め、8 量体構造であることが TEM 解析により強く示唆された (Fig. 7)。これらの結果は、LinM と LinN の多量体の内部のチャンネルを輸送基質が通過するという LinKLMN の予想モデル図 (Fig. 1) と矛盾しない。

UT26 株は *Alphaproteobacteria* に属する従属栄養細菌であり、生育に有機炭素源を必要とし、炭素源を添加しない無機塩培地では生育しないが、本株がアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *adhX* 遺伝子の高発現で炭素源非添加の無機培地で CO<sub>2</sub> 依存的に細胞増殖する現象 (HYGO 表現型) を見出した (Fig. 8) (Inaba *et al.*, 2020)。本現象は、広く環境細菌が有する機能である可能性が示唆され、また、UT26 株は独立栄養細菌の CO<sub>2</sub> 固定機構の鍵酵素遺伝子ホモログは有しておらず、HYGO 表現型において新規の CO<sub>2</sub> 固定経路が機能している可能性も考えられたため、機構解明を進めた。特に、より定量的な解析が可能な qTn-Seq 法を開発し、HYGO 表現型に関与する遺伝子の網羅的同定を行った。そ



**Fig. 8** CO<sub>2</sub>-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO) phenotype of *Sphingobium japonicum* UT26 (Inaba *et al.*, 2020). A heterotrophic bacterium strain UT26 can grow under oligotrophic conditions by expression of the *adhX* gene encoding alcohol dehydrogenase.

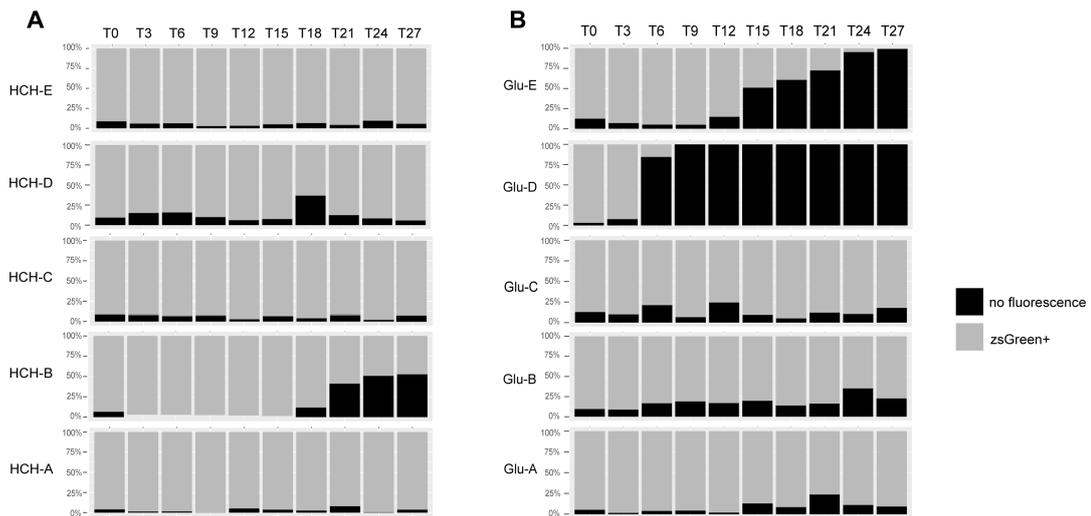
の結果、HYGO 表現型株は、低栄養環境下でグリオキシル酸回路で CO<sub>2</sub> の放出を抑えつつ、環境中に低濃度で存在するエタノールを主な基質として利用して増殖している可能性が示唆された。今後、HYGO 表現型のより詳細な機構が解明されれば、多くの環境細菌が有する常温・常圧環境での CO<sub>2</sub> 固定機構として生態学的意義が大きいだけでなく、CO<sub>2</sub> 削減問題への展開も期待できる。また、発酵産業において、有用微生物を培養し物質生産するための培地の費用を抑えるに越したことはない。従属栄養細菌が低栄養環境で生残し、積極的に増殖する機構が解明されれば、こうした有用細菌の培養において、栄養源の添加量を抑えた効率的な培養法が開発できるかもしれない。一方、浄水や工業パイプライン、医療器具など、低栄養と思われる環境でも有害細菌が増殖し、問題となるケースが多い。HYGO 表現型の機構は、こうした有害細菌の低栄養環境での増殖機構とも関連している可能性が考えられ、有害細菌の増殖抑制による汚染防止技術への展開も期待できる。さらに、環境バイオテクノロジーの観点からは、分解菌が汚染環境に定着せず、十分な分解能を発揮しないことがしばしば問題となっており (Ramos *et al.*, 2011)、本現象は、分解菌を汚染環境に接種するバイオオーグメンテーションへの直接的応用が期待できる。

#### 2-2-4. 細菌集団の形成と進化

細菌集団の形成と進化に関する原理を理解し、バイオレメディエーションなどの実際の応用技術にも資する基礎知見を得るために、有機塩素系殺虫剤-γ-HCH 分解能力を有する細菌細胞集団を対象とした研究を実施した。

U26 株の *linA* 遺伝子下流に緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を挿入した SHY12 株を構築し、これを祖先株として、クローナルなγ-HCH 分解細胞集団を空間構造のある平板培地上で世代交代を繰り返した結果、染色体の部分欠失を持つ系統が自然発生し、その欠失をもたない系統と共存し続ける現象が観察された (Fig. 9)。それら系統のゲノム解析と集団のメタゲノム解析から、異なる系統の共存の機構のひとつとして、TBDR ホモログ遺伝子に変異が起こり、膜の透過性の向上と凝集性を獲得することが重要であることが明らかになった。総じて、染色体欠失を保有する株と保有していない株の共存は、資源または空間のニッチ分割が保証されることで成立していることが示唆された。

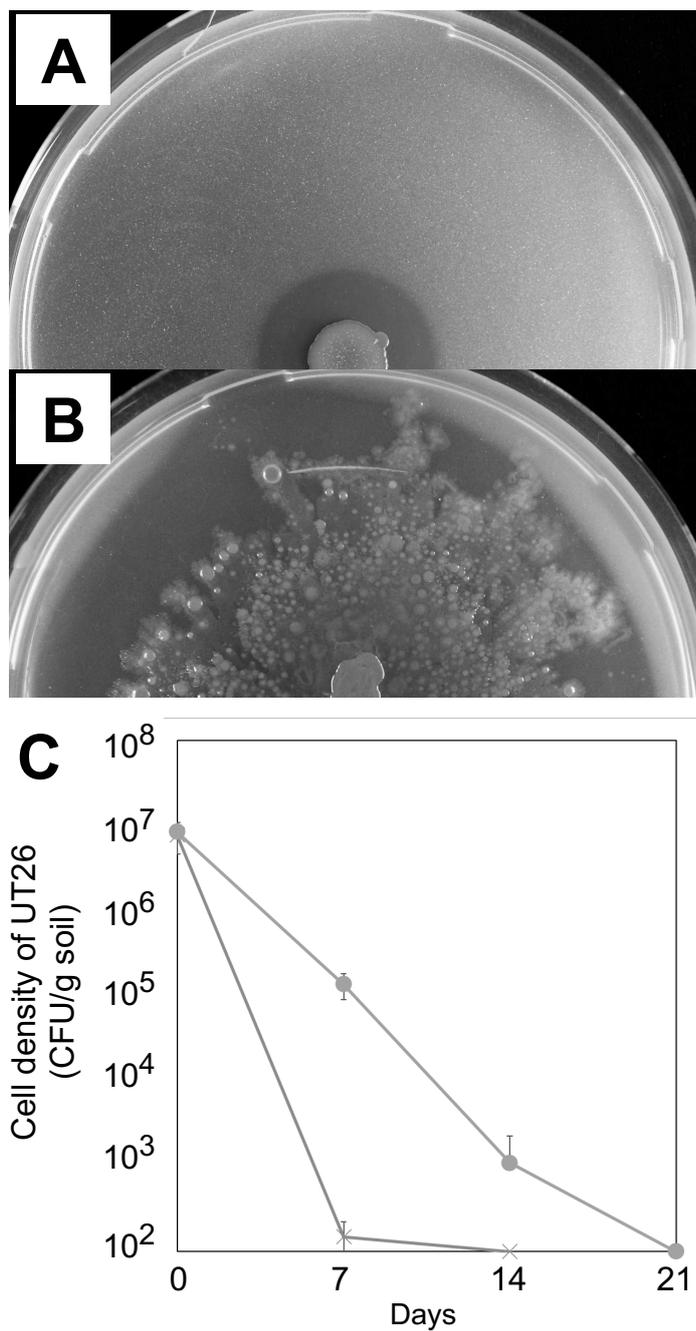
γ-HCH 分解細菌を環境試料から単離する場合、γ-HCH による集積培養を行い、固体培地上でのシングルコロニーアイソレーションで分解菌を単離する。その際、一見シングルコロニーと思われる細胞集団の中にγ-HCH 分解細菌だけでなく非分解細菌が共存し続けることがあり、純粋分離に種々の培地が必要になるケースがある。このような現象はγ-HCH 分解細菌の場合だけでなく、様々な分解細菌の分離の際にしばしば観察される現象である。本研究では、このような経緯で取得したヘテロなγ-HCH



**Fig. 9** Coexistence of nonfluorescent and fluorescent cells in evolving populations. (A) Five population lineages evolved on g-HCH minimal agar plates. (B) Five population lineages evolved on glucose minimal agar plates. Up to 5 % cells in each population can be regarded as nonfluorescent cell due to the nature of data analysis.

分解細菌集団について解析を行った。その結果、(i)  $\gamma$ -HCH を唯一の炭素源とした液体培地による継代培養を繰り返しても、分解菌が優占種とならないこと、(ii)  $\gamma$ -HCH を唯一の炭素源とした固体培地上で、非分解細菌の存在により長期持続的な巨大コロニーを形成すること、から非分解細菌の重要性が明らかになった。さらに、本集団より単離した細菌株の解析により、非分解細菌が分解細菌にコロニー伸長する directional colony growth (DCG) 現象を見出すと共に、本表現型を示す *Cupriavidus* 株が巨大コロニー形成にも重要であることを明らかにした。また、移動性細菌を利用して非移動性細菌が棲息域を拡大するヒッチハイク現象 (Finkelshtein *et al.*, 2015; Shrivastava *et al.*, 2018) が、 $\gamma$ -HCH 分解細菌で観察された。すなわち、非移動性の $\gamma$ -HCH 分解細菌 UT26 株を移動性の *Paenibacillus* sp. NKL2 株と固体培地上に共接種すると、UT26 株の棲息域拡大と広領域の $\gamma$ -HCH の分解が観察された (Fig. 10AB)。さらに、本現象が UT26 株の土壤環境での生残性の向上へも関与することが示唆された (Fig. 10C)。すなわち、本現象のバイオレメディエーションへの直接的な応用が期待できる。一方、易培養性の *Burkholderia* が生産する菌体外多糖 (EPS) が難培養性の *Verrucomicrobia* の増殖を選択的に促進するこ

とを見出し、新たな細菌間の相互作用を利用した難培養性細菌の培養手法を提示した。



**Fig. 10** *Paenibacillus* sp. NKL2 promoted growth of *Sphingobium japonicum* UT26. Colony formation of monoculture of UT26 (A) and co-culture of UT26 and a swarming bacterium *Paenibacillus* sp. NKL2 (B) on 1/3LB plate with  $\gamma$ -HCH. Clear zone around the large colony on the plate with cloudy color derived from  $\gamma$ -HCH particles indicates area where UT26 degraded  $\gamma$ -HCH. Effect of co-culturing with NKL2 on survivability of UT26 in  $\gamma$ -irradiated soil (C). Monoculture of UT26 (cross) and co-culture of UT26 and NKL2 (circle)

## 2-3. おわりに

人工の化学物質である  $\gamma$ -HCH を分解資化する能力を有する細菌を主な研究対象として、遺伝子（ゲノム）・酵素・細胞・集団の各レベルから研究を実施し、遺伝子（ゲノム）レベルでは、 $\gamma$ -HCH 代謝機能に関するゲノム進化が実際の土壌環境中で進行中であることを明示すると共に、MV の遺伝情報のリザーバーとしての機能の可能性を提示した。酵素レベルでは、 $\gamma$ -HCH 分解に関与する脱ハロゲン酵素およびHLD の潜在能力の高さと、自然界にはまだまだ新奇性の高い類似酵素が存在することを示した。細胞レベルでは、スフィンゴモナッド細菌群の多彩な代謝能力を支える重要な機能と考えられるABC トランスポーターの機能解明に繋がる知見を得ると共に、低栄養環境での  $\text{CO}_2$  固定を伴う増殖（HYGO 表現型）という新奇性の高い現象を見出し、その機構に関しても一定の知見を得た。HYGO 表現型は、進化において「多様化」と「選択」が必須であることを考えると、低栄養環境でも何とか細胞数を増やすことで新奇代謝能力の獲得の可能性が広がり、環境適応という観点だけでなく、進化的観点からも重要な因子であると考えられる。集団レベルにおいては、クローナルな集団が実験進化により多様化し共存することを観察でき、共存の機構に関しても TBDR の関与を示すことができた。また、 $\gamma$ -HCH 分解細菌株単独より、非分解細菌株を含む集団の方が長期持続的に $\gamma$ -HCH を分解すること、およびその集団形成における *Cupriavidus* 株の重要性を示すと共に、移動性のある *Paenibacillus* 株との共存で $\gamma$ -HCH 細菌株が固相での棲息域を拡げ、土壌での生残性も上昇することを示した。このような集団レベルで得られた知見は、実際のバイオレメディエーションへの応用にも直結する成果である。

個々の研究は、各レベルごとに行ったが、様々なレベルで解析したことにより、包括的な知見も得られた。例えば、TBDR がHYGO 表現型にも、遺伝的に多様化した集団の共存にも鍵になる因子であること、 $\gamma$ -HCH 代謝において、dead-end 産物の蓄積を抑えるという適応が、細菌細胞において酵素レベルでもゲノムレベルでも起こっていること、などを提示することができた。後者に関しては、さらに、 $\gamma$ -HCH 分解細菌集団における非分解細菌の共存の意義として、発現制御系を備えない  $\gamma$ -HCH 分解細菌単独では、分解活性が細胞集団全体として強すぎる結果、dead-end 産物が溜まりやすいのに対して、非分解細菌が共存することで強すぎる活性のブレーキの役割を果たし、dead-end 産物の蓄積を抑制している可能性が予想される。すなわち、分解菌単独では不足している調節機能を他細胞の存在で補っている、と捉えることもできる。このような包括的な知見が得られたのも、本寄付講座のような体制で研究を実施することができた成果であると考えている。

なお、2-2 の各論では触れられなかったが、植物発現用に改変した合成 *linA* 遺伝子（Nanasato *et al.*,

2016) をシロイヌナズナに導入し、 $\gamma$ -HCH 耐性および分解活性を示す形質転換完全植物体の作製に成功するなどの成果 (Deng *et al.*, unpublished data) や、 $\gamma$ -HCH 分解細菌以外の環境細菌を対象とした遺伝子発現制御、可動性遺伝因子等に関する研究成果を挙げることもできた。以上、人工化学物質代謝能を有する細菌を軸として様々な角度から多様な研究を実施し、今後の関連分野の研究の発展・展開に繋がる多くの成果を挙げる事ができたと考えている。

## 2-4. 謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成 28 年度寄付講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして、東北大学大学院生命科学研究科の津田雅孝教授 (定年退職)、大坪嘉行准教授、東谷篤志教授、田中良和教授、渡辺正夫教授、高田美信技術研究員、東京大学農学生命科学研究科の妹尾啓史教授、大塚重人准教授、筑波大学生命環境系の野村暢彦教授、豊福雅典准教授、山本達也博士、チェコ Masaryk 大学の Jiri Damborsky 教授、Zbynek Prokop 教授、のご支援とご協力、東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発講座に在籍した大学院生の皆さんの協力の賜物です。あわせて感謝します。また、文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (永田裕二 19H02865)、挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877 ; 佐藤優花里 16K14908)、ならびに東北大学男女共同参画推進センター (TUMUG) が実施する TUMUG 支援事業 (男女共同参画・女性研究者支援事業) の支援 (佐藤優花里) にも感謝致します。

## 2-5. 文 献

Endo, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2007). Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for utilization of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. *J Bacteriol* **189**: 3712-3720.

Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 633-657.

Finkelshtein, A., Roth, D., Ben Jacob, E. & Ingham, C. J. (2015). Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *Mbio* **6**.

Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A. & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* **18**: 425-432.

Imai, R., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1991). Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis*

- gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from gamma-hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* **173**: 6811-6819.
- Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989). Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas-paucimobilis*. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2015-2017.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology (Reading)* **166**: 531-545.
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J., Poelarends, G. J. & Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* **7**: 1868-1882.
- Kato, H., Su, L., Tanaka, A., Katsu, H., Ohtsubo, Y., Otsuka, S., Senoo, K. & Nagata, Y. (2022). Genome evolution related to gamma-hexachlorocyclohexane metabolic function in the soil microbial population. *Biosci Biotechnol Biochem* **86**: 800-809.
- Kawahara, K., Matsuura, M. & Danbara, H. (1990). Chemical structure and biological activity of lipooligosaccharide isolated from *Sphingomonas paucimobilis*, a gram-negative bacterium lacking usual lipopolysaccharide. *Jpn J Med Sci Biol* **43**: 250.
- Kimbara, K., Hashimoto, T., Fukuda, M., Koana, T., Takagi, M., Oishi, M. & Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Bacteriol* **171**: 2740-2747.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., et al. (2010). Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 58-80.
- Moriuchi, R., Tanaka, H., Nikawadori, Y., et al. (2014). Stepwise enhancement of catalytic performance of haloalkane dehalogenase LinB towards beta-hexachlorocyclohexane. *AMB Express* **4**: 72.
- Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993a). Purification and characterization of g-hexachlorocyclohexane (g-HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1582-1583.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993b). Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* **175**: 6403-6410.
- Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansorgova, A. & Takagi, M. (1997). Purification and

characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3707-3710.

Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 741-752.

Nagata, Y., Natsui, S., Endo, R., et al. (2011). Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb Technol* **49**: 499-508.

Nagata, Y., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2015). Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 9865-9881.

Nagata, Y., Tabata, M., Ohtsubo, Y., and Tsuda, M. (2016) Biodegradation of organochlorine pesticides. *Chapter 512 p 1-30 In Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (ed), Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition ASM Press, Washington, DC.*

Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ Microbiol Rep* **11**: 630-644.

Nanasato, Y., Namiki, S., Ohsima, M., Moriuchi R., Konagaya, K., Seike, N., Otani, T., Nagata, Y., Tsuda, M., Tabei, Y., (2016) Biodegradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by transgenic hairy root cultures of *Cucurbita moschata* that accumulate recombinant bacterial LinA. *Plant Cell Reports* **35**: 1963-1974

Ohtsubo, Y., Maruyama, F., Mitsui, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2012). Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971.

Ramos, J. L., Marques, S., van Dillewijn, P., et al. (2011). Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends Biotechnol* **29**: 641-647.

Senoo, K. & Wada, H. (1989). Isolation and identification of an aerobic gamma-HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci Plant Nutr* **35**: 79-87.

Shrivastava, A., Patel, V. K., Tang, Y. S., Yost, S. C., Dewhirst, F. E. & Berg, H. C. (2018). Cargo transport shapes the spatial organization of a microbial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 8633-8638.

Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 793-811.

Tabata, M., Ohhata, S., Nikawadori, Y., et al. (2016). Comparison of the complete genome sequences of four gamma-

hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res* **23**: 581-599.

Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 13-24.

Tsuda, M., Tan, H. M., Nishi, A. & Furukawa, K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. *J Biosci Bioeng* **87**: 401-410.

Vijgen, J., Abhilash, P. C., Li, Y. F., et al. (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res Int* **18**: 152-162.

Wolf, J., Gerber, A. P. & Keller, W. (2002). *tadA*, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *Embo Journal* **21**: 3841-3851.

### 3. 研究費

#### 5.5 年間の支出額の内訳

項目	金額 (千円)	内容の簡単な説明
人件費	164,185	教員・永田 (5年半)、教員・矢野 (4年10ヶ月)、教員・加藤 (5年半)、 教員・佐藤 (5年)、ポスドク・野々山 (1年)
備品	29,196	実験台・PC・クリーンベンチ・フリーザー・オートクレーブ・遠心機・ゲル 撮影装置・ジーンパルサー・サーマルサイクラー・リアルタイムPCR装 置・高速液クロ・中型振とう培養機・顕微鏡・試薬棚・GC オートインジ ェクター・TOC メーター・電子レンジ・蒸留水製造装置
消耗品	29,966	実験に必要な機具類・化学試薬類・分子生物学実験試薬類・文具類等
旅費	3,465	学会参加費・研究者招へい・研究打合せ等
その他	21,572	機器類修理代・共同利用スペース使用料・ソフトウェア代・試料輸送量・ シーケンス解析代・実験室工事費・共通機器試料料・英文校正料等
合計	248,384	

## 4. 教育実績

### 4-1. 大学院学生の教育

- ・博士課程3名、修士課程18名が本寄附講座において課程を修了、学位を取得。
- ・本寄附講座最終年度に在籍した博士課程3名、修士課程6名の大学院生については、本寄附講座終了後、東北大学大学院生命科学研究科の基幹講座（微生物遺伝進化分野）に所属替えし、永田が継続して指導を行っている。

### 4-2. 講義等

#### 【学内】

- ・東北大学大学院生命科学研究科「遺伝情報動態特論」
- ・東北大学大学院生命科学研究科「生態学合同講義」
- ・東北大学全学教育「生命科学概論」
- ・東北大学大学院生命科学研究科「分子化学生物学概論」
- ・東北大学大学院生命科学研究科「先端分子化学生物学特論Ⅱ」
- ・東北大学大学院生命科学研究科「応用データ科学」

#### 【学外】

- ・長浜バイオ大学・非常勤講師「生理活性物質概論」
- ・東京大学大学院農学生命科学研究科・非常勤講師「農学生命情報学特論Ⅳ」
- ・広島大学大学院統合生命科学研究科・非常勤講師「生物工学特別講義C」
- ・東京大学大学院農学生命科学研究科・非常勤講師「微生物機能開発学」
- ・静岡大学大学院総合科学技術研究科農学専攻・非常勤講師  
「応用生命科学特別講義Ⅱ」

## 5. 研究業績

### 5-1. 学会・シンポジウム等における主な発表

永田裕二「環境汚染物質を食べる細菌から微生物進化を探る～細菌の進化機構の解明と微生物機能開発への応用～」日本農芸化学会東北支部シンポジウム「多様な広がりで魅せる微生物研究」(2017年6月24日・弘前)

加藤広海、小川なつみ、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝「利用する：汚染物質分解コンソーシアムにおける非分解菌の役割」第2回環境微生物系合同大会2017シンポジウム「微生物のサバイバルゲーム」(2017年8月31日・仙台)

加藤広海、永田裕二、津田雅孝「土壌細菌叢メタゲノムの時間的変動と細菌相互作用」第61回日本放線菌学会学術講演会(2017年11月16日・東京)

永田裕二「高度難分解性環境汚染物質分解細菌から微生物進化を探る」日本農芸化学会2018年度大会シンポジウム「微生物の多様性-IFO 寄付講座10年の歩み」(2018年3月18日・名古屋)

Yuji Nagata「Evolution of bacteria degrading highly recalcitrant environmental pollutants」Formal Seminar at University of Hyderabad (February 20th, 2018, Hyderabad, India)

永田裕二「人為起源環境汚染物質分解微生物から進化に迫る」東北大学大学院生命科学研究科改組記念講演会(2018年7月4日・仙台)

永田裕二「HCH脱塩素反応を触媒するハロアルカンデハロゲナーゼの多様性とバイオレメディエーションへの応用」第36回農薬環境科学研究会シンポジウム「POPs等の難分解性農薬の微生物分解」(2018年11月8-9日・甲府)

永田裕二「環境浄化で活躍する微生物」Visionary 農芸化学100シンポジウム・「微生物と私たちの健康・暮らし・環境～世界に誇る日本の微生物研究～」(2018年12月15日・仙台)

永田裕二「細菌の進化機構の理解と環境浄化への応用」社会にインパクトある研究F-1「生命の奇跡のプロセスに学ぶイノベーション」キックオフシンポジウム(2019年2月22日・仙台)

矢野大和、山本達也、仁平賢、野村暢彦、永田裕二「微生物はなぜ群を作るのか？実験進化を用いたBQHの検証」日本ゲノム微生物学会年会(2019年3月7日・東京)

仁平賢、山本達也、平野彰大、野村暢彦、永田裕二、矢野大和「微生物はなぜ群れを作るのか？：平板培地実験進化系を用いたBHQの検証」日本微生物生態学会第33回大会(2019年9月10-13日・甲府)ポスター賞

蘇立俊、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二「人工遺伝子クラスターを利用した有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子キャプチャリング株の作製」日本農芸化学会2020年度大会(福岡・開催中止)優秀ポスター賞

永田裕二「従属栄養細菌の極貧栄養環境でのCO<sub>2</sub>依存的な増殖現象」日本農芸化学会2021年度大会シンポジウム「細菌の低栄養環境に対する増殖を伴う適応機構」(2021年3月21日・オンライン開催)

岩本和音、Kafayat Olaide Yusuf Habibullah、加藤広海、永田裕二「バクテリアにおけるヒッチハイク現象の環境浄化技術への応用」環境バイオテクノロジー学会2021年度大会(2021年9月2-3日・オンライン開催)優秀発表賞

Kato, H., Suzuki, T., Ishihara, T., Soma, T., Toyofuku, M., Nomura, N., & Nagata, Y. Membrane vesicle production and vesicle-related DNA of sphingomonad strain capable of degrading organochlorine pesticide.

EMBO Workshop Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications. (Nov. 23-26, 2021, Tsukuba/online hybrid)

## 5-2. 原著論文

**Kishida K, Inoue K, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M:** Conjugative transfer system of IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7: characterization of its *oriT* region and relaxase and host range of conjugative system. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e02359-16 (2017)

**Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M:** Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 41769 (2017)

**Sugawara M, Tsukui T, Kaneko T, Ohtsubo Y, Sato S, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Minamisawa K:** Complete genome sequence of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122, a nitrogen-fixing soybean symbiont. *Genome A.* **5**:e01743-16 (2017)

**Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M:** Compounds that enhance the tailing activity of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 6520 (2017)

**Sato T, Nonoyama S, Kimura A, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M:** The small protein HemP is a transcriptional activator for the hemin uptake operon in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e00479-17 (2017)

**Kishida K, Ogawa N, Ichihashi E, Kato H, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M:** Establishment of plasmid vector and allelic exchange mutagenesis systems in a mycobacterial strain that is able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biosci Biotechnol Biochem* **82**: 1169-1171 (2018)

**Ohtsubo Y, Sasaki H, Nagata Y, Tsuda M:** Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA Research* **25**: 477-487 (2018)

**Ogawa N, Kato H, Kishida K, Ichihashi E, Ishige T, Yoshikawa H, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M:** Suppression of substrate inhibition in phenanthrene-degrading *Mycobacterium* by co-cultivation with a non-degrading *Burkholderia* strain. *Microbiology* **165**:625–637 (2019)

**Ohtsubo Y, Sakai K, Nagata Y, Tsuda M:** Properties and efficient scrap-and-build repairing of mechanically sheared 3' DNA ends. *Communications Biology* **2**: 409 (2019)

**Kishida K, Nonoyama S, Lukas T, Kawahara S, Kudo K, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M:** Conjugative transfer of IncP-9 catabolic plasmids requires a previously uncharacterized gene, *mpfK*, whose homologs are conserved in various MPFT-type plasmids. *Appl Environ Microbiol* **85**: e01850-19 (2019)

**Inaba S, Sakai H, Kato H, Horiuchi T, Yano H, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y:** Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology* **166**: 531-545 (2020)

**Marek M, Chaloupkova R, Prudnikova T, Sato Y, Rezacova P, Nagata Y, Smatanova IK, Damborsky J:** Structural and catalytic effects of surface loop-helix transplantation within haloalkane dehalogenase family. *Computational and Structural Biotechnology Journal*: **18**: 1352-1362 (2020)

**Miyakoshi M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M:** Transcriptome analysis of zygotic induction during conjugative transfer of plasmid RP4. *Frontiers in Microbiology*: **11**: 1125 (2020)

**Nonoyama S, Kishida K, Sakai K, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M:** A transcriptional regulator, IscR, of *Burkholderia multivorans* acts as both repressor and activator for transcription of iron-sulfur cluster-biosynthetic

*isc* operon. *Research in Microbiology*: **171**: 319-330 (2020)

**Kawamoto Y, Kato H, Nagata Y, and Urabe J**: Microbial communities developing within bulk sediments under fish carcasses on a tidal flat *PLOS ONE* **16**: e0247220 (2021)

**Kato H, Su L, Tanaka A, Katsu H, Ohtsubo Y, Otsuka S, Kenoo K, Nagata Y**: Genome evolution related to g-hexachlorocyclohexane metabolic function in the soil microbial population. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**: 800-809 (2022)

### 5-3. 総説

**加藤広海、小川なつみ、津田雅孝、永田裕二** 汚染物質分解コンソーシアムにおけるキープレイヤーとオーディエンス *環境バイオテクノロジー学会誌* **18** (1): 15-20 (2018)

**Nagata Y, Kato H, Ohtsubo, Y, Tsuda M**: Mobile genetic elements involved in the evolution of bacteria that degrade recalcitrant xenobiotic compounds, Chapter 9. pp 215-244. *In* Nishida H and Oshima T (ed), *DNA Traffic in the Environment*. Springer (2019)

**Nagata Y, Kato H, Ohtsubo, Y, Tsuda M**: Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **11**: 630-644 (2019)

**Nagata Y**: Special Issue: Microbial degradation of xenobiotics. *Microorganisms* **8**: 487 (2020)

**永田裕二** 従属栄養細菌のCO<sub>2</sub>依存的な極貧栄養環境適応 *バイオサイエンスとインダストリー* **78**: 498-500 (2020)

**Ohtsubo Y, Hirose Y, Nagata Y**: Algorithms used for in silico finishing of bacterial genomes based on short-read assemblage implemented in GenoFinisher, AceFileViewer, and ShortReadManager. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**: 693-703 (2022)

**永田裕二、加藤広海、大坪嘉行** 従属栄養細菌の極貧影響環境でのCO<sub>2</sub>依存的な増殖現象 *環境バイオテクノロジー学会誌* **22**: 9-13 (2022)