

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の
CO₂ 要求性に関する研究

大畑 奈緒子
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞機能学講座
(高木 博史 教授)

平成 20 年 1 月 28 日提出

目次

序論	3
第1章 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 の低栄養生育	
はじめに	5
実験材料および方法	5
結果	11
1 備蓄原油中からの低栄養性細菌のスクリーニング	11
2 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 株の培養条件の検討	12
3 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 株における既存炭酸固定経路の探索	14
4 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 株と同様の生育を示す微生物の検索	15
考察	18
第2章 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 株の低栄養生育に特異的に発現するタンパク質の解析	
はじめに	21
実験材料および方法	21
結果	27
1 二次元電気泳動によるプロテオーム解析	27
2 <i>R. erythropolis</i> N9T-4 株のホルムアルデヒド除去活性	29
3 鍵酵素遺伝子破壊株の取得と性質	34
4 炭酸水素塩による ALDH および MNO の誘導	35
5 ホルムアルデヒド同化経路の解析	37
考察	39
まとめと今後の課題	42
謝辞	44
参考文献	45

序論

まだまだ私たちの知り得ない微生物の機能がありそうである・・・応用微生物学の分野では現在でも有用微生物を自然界からスクリーニングする方法論がとられている。何かを分解する微生物が欲しい場合はその物質を、また何かを生産する微生物が欲しい場合はその前駆体となるような物質を炭素源あるいは窒素源として用いた培地を用い、土壌などのサンプルからまずは生育する微生物をスクリーニングする。当研究室でも応用微生物学的な思考をもとに、様々な微生物をスクリーニングしてきた。本論文も備蓄原油から見いだした低栄養性細菌の新規な機能に関するものである。

低栄養細菌 (oligotroph) は極限栄養状態の環境下においても増殖が可能な細菌群であり、一種の極限微生物であるとも考えられる。低栄養細菌についての明確な定義はないが、他の様々な環境因子に対する微生物の成育による分類（例えば好塩性菌、耐塩性菌）と同様に、一般的に知られている培地の栄養源濃度では生育しないが、ある一定濃度以下の栄養条件で生育出来るもの（偏性低栄養細菌、obligate oligotroph）、どちらでも生育するもの（通性低栄養細菌、facultative oligotroph）の2タイプに大別できる。Kuznetsov ら (1) は「1-10 mgC/L 以下の炭素源でも生育可能な微生物」と炭素源の濃度を基準に定義しており、服部ら (2) も 1 mgC/L を基準としているが、有機態窒素あるいは塩に対する感受性という観点からも微生物を栄養源で分類できるとしている。

低栄養性細菌は一般に知られている細菌に比べ、極端に低濃度の栄養源で生育可能であることから、微生物の生理的な興味以外にも様々な応用が考えられる。近年、精油所や化学工場の排水などの微生物浄化（バイオレメディエーション）に関する研究が盛んに行われているが、これらの排水には汚染物質である炭素源は比較的多く含まれているのに対し、微生物の生育に必要なリンや窒素等の栄養塩類はほとんど含まれていない。そのため、生物処理を行う際には栄養塩類の添加が必要となるが、栄養塩類の添加は廃水処理コストを高くし、また過剰な添加は環境の富栄養化といった二次汚染の原因ともなる。これらの問題を解決するため、炭素源以外の栄養源に対しての低栄養性が有用となる (3)。また、配・給水系に存在する低栄養性細菌の数を調べることによって衛生状態を評価するという利用法もある (4)。しかしながら、これまでに様々な環境中からの低栄養性細菌の単離に着目した研究がなされているが、取り扱いの困難さや定義の曖昧さにより生化学的、生理的および遺伝学的な研究はほとんど行われていない。

現在では低栄養性細菌の利用に関しては上記のようなバイオレメディエーション

的な利用方法が主なものであるが、我々は微生物変換（バイオコンバージョン）への応用に興味を持っている。バイオコンバージョンに用いる触媒としての微生物が低栄養性であれば、それだけ低コストなプロセスが実現できる。また、低栄養性細菌の機能そのものを使うのではなく、低栄養的に増殖可能な宿主として用いる場合も有用である。当研究室では、様々な微生物をスクリーニングする傍ら、その培地から炭素源を抜いた培地で生育してくる微生物を探していた。

本博士論文は、備蓄原油サンプルを用いた低栄養性細菌のスクリーニングにより見いだされた超低栄養細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のユニークな CO₂ 要求性に関するものである。第 1 章では備蓄原油からの超低栄養細菌のスクリーニング、得られた N9T-4 株について生育条件などの検討および自然界からの再スクリーニングについて記述してある。第 2 章では N9T-4 株の低栄養生育に関与するタンパク質の探索とその解析について記述し、現時点で推定できる N9T-4 株の低栄養性育時における CO₂ 要求メカニズムを提唱した。

第 1 章 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 の低栄養生育

当研究室では 1999 年から 3 年間、旧石油公団などとの共同研究で「備蓄原油の品質管理技術に関する調査」というプロジェクトが行われた (5、6、7)。これは全国各地に存在している備蓄タンクに長期保管されている原油中に微生物の存在が示唆されていたことから、原油中の微生物相を非培養法によって解析したものである。環境微生物学の分野で行われるようになった 16S rDNA-DGGE 法を原油に適用し、様々な細菌の存在を明らかにすることができた (8)。約 3 年間に渡って 4 カ所の備蓄施設 (北海道、福井、愛媛、鹿児島) 由来の 3 種類の原油をサンプリングし、上記方法で微生物相を解析した結果、原油中の微生物相はサンプリング時期、原油種などで違いが見られたが、興味深いことに異なる原油サンプルで比較的多く見られる 5 種の細菌 (*Ochrobactrum anthropi*、*Burkholderia cepacia*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Propionibacterium acnes*、*Brevundimonas diminuta*) が同定され、特に *Ochrobactrum* 属に属する細菌は試験した全ての原油で確認できた。また、硫酸還元菌の存在も確認することができ、備蓄施設の金属配管の腐蝕に関与する可能性が示された。さらに、備蓄タンクの底に溜まる泥 (原油スラッジ) からは多数のメタン生成菌を始めとした古細菌の存在が予想され、スラッジ形成にメタン生成コンソーシアが関与している可能性も示された。

様々な微生物の存在が明らかとなり、原油は改めて魅力ある微生物スクリーニング源となった。「原油」ということでナフタレン、アントラセン、ピレンなどの難分解性芳香族化合物の分解菌の検索も行われ (9)、いくつかの分解菌は得られたが、これまでに報告のある分解菌以上の能力を示すものは得られなかった。本章では、本論文の研究のきっかけとなった原油サンプルからの低栄養性細菌の検索、および得られた超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の培養特性などについて述べる。

実験材料および方法

備蓄原油サンプル

本研究では苫小牧東部石油備蓄基地 (北海道)、福井石油備蓄基地 (福井)、菊間石油備蓄基地 (愛媛) および、志布志石油備蓄基地 (鹿児島) の計 4 カ所の備蓄原油施設から分与して頂いた 3 種類の原油 (カフジ原油 (重質油)、アラビアンライト原油

(中質油)、アッパーザクム原油(中質油))を用いた。これらの原油サンプルは使用するまで4°Cで保存した。

菌株

DNA クローニングには *Escherichia coli* DH5 α [F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 hsdR17* (*r_K⁻m_K⁺*) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*]を用いた。

タイプカルチャーとして用いた *R. erythropolis* NBRC12320、*R. erythropolis* NBRC15567、*R. erythropolis* NBRC16296、*Streptomyces aureus* NBRC 100912、*S. griseus* subsp. alpha NBRC 15421、*S. bikiniensis* NBRC 14598 および *S. venezuelae* NBRC 13096 は製品評価技術基盤機構の生物遺伝資源部門より購入した。*R. erythropolis* IFM155、*R. erythropolis* DMS743、*R. rhodochrous* NCIMB11215、*R. rhodochrous* ATCC12674、*R. rhodochrous* ATCC17895、*R. rhodochrous* ATCC19410、*R. rhodochrous* ATCC17041 および ATCC33258 は研究室保存のものを用いた。

培地および培養方法

本研究を通して用いた無機塩培地 (BM 培地) の組成は 0.1% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄•7H₂O、0.01% CaCl₂•9H₂O、0.1% (v/v) ビタミン溶液とし、pH を 7.0 に調整した。ビタミン溶液は、逆浸透膜水 (RO 水) 100 ml に 1 mg 塩酸チアミン、2 mg リボフラビン、2 mg パントテン酸カルシウム、2 mg 塩酸ピリドキシン、0.1 mg ビオチン、1 mg *p*-アミノ安息香酸、2 mg ニコチン酸、0.1 mg 葉酸を溶解することにより作製し、メンブレンフィルター (DISMIC-25cs、0.45 μ m、アドバンテック社製) によりろ過滅菌した。CaCl₂•9H₂O は 100 倍濃度の溶液を調整し、メンブレンフィルターによりろ過滅菌後、ビタミン溶液とともにオートクレーブ後の BM 培地に添加した。BM プレート培地の作製には精製寒天 (ナカライテスク社製) を用い、1.5% となるように培地に添加した。ニュートリエントブロス (NB) はベクトン・ディッキンソン社製を用い、プレート培地の作製には 1.5% の寒天 (タイトー社製) を用いた。LB 培地は、1% トリプトン (Bacto、ベクトン・ディッキンソン社製)、0.5% 酵母エキス (Bacto、ベクトン・ディッキンソン社製)、1% NaCl とし、プレート培地の作製には 1.5% 寒天 (タイトー社製) を用いた。

CO₂ 制限条件は、15 g の CO₂ 吸着剤 (Sodasorb、W. R. グレース社製) を入れたシャーレと、菌体を接種したプレートを共にパウチ袋 (アネロパック、三菱ガス化学社製) に入れることにより作製した (図 1)。

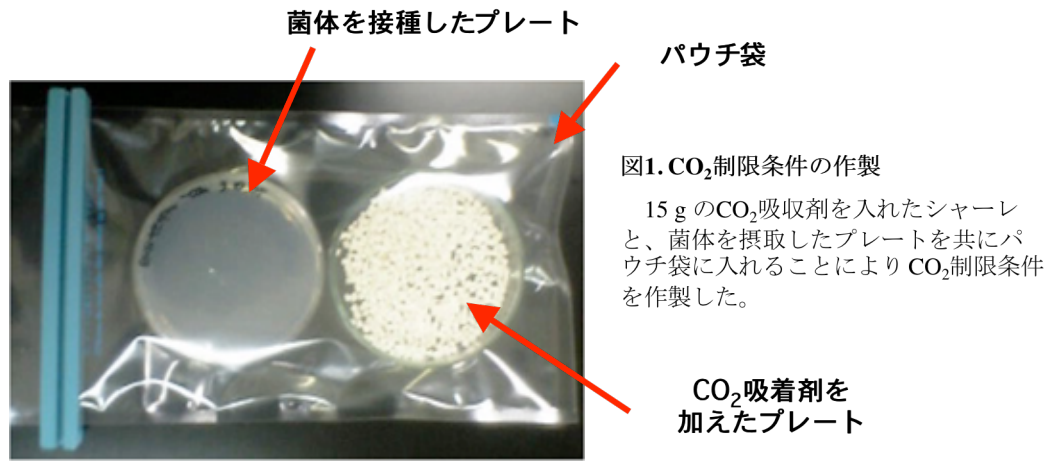


図1. CO₂制限条件の作製

15 g のCO₂吸収剤を入れたシャーレと、菌体を接種したプレートと共にパウチ袋に入れることによりCO₂制限条件を作製した。

CO₂吸着剤を加えたプレート

炭素源の検討には1% 糖類（フルクトース、ガラクトース、マンノース、デンプン）、1% 有機酸（コハク酸、クエン酸、リンゴ酸）、1% アルコール（メタノール、エタノール、プロパノール）、直鎖アルカン（*n*-ヘキサン、*n*-デカン、*n*-テトラデカン、*n*-ヘキサデカン）をそれぞれBM培地に添加した。寒天培地において*n*-ヘキサデカンや*n*-テトラデカンなどのアルカンを炭素源として用いる場合には、シャーレの蓋部分に2 ml のアルカンを含ませたろ紙を置くことにより気化させて培地に供給した。それ以外の炭素源はろ過滅菌（0.45 μm、DISMIC、アドバンテック社製）後、培地に添加した。

シリカゲル培地の作製はFunkら(10)の方法に従った。10 g のシリカゲル 60 (0.063~0.200 nm、メルク社製) を100 ml の7% KOH 溶液に溶かし、このシリカゲル溶液とオートクレーブ滅菌した2×BM培地を30 ml バイアル瓶にて転倒混合後、1.75 ml の20% *o*-リン酸を添加しペトリ皿に流し込み固化させた。作製したプレートを裏返しにし、30°Cで一晩静置すると水が出てくるため、これをピペットで除去した。菌体を植菌する前に、プレートをクリーンベンチ内で30分UV滅菌した。

N9T-4株は栄養源の持ち込みを防ぐために、-80°Cで凍結保存している菌体を直接BMプレート培地に生育させ、再度BMプレート培地に植え継いだものを実験に使用した。種々のプレート培地に接種する際には菌体を0.85% KClにて懸濁し、OD₆₆₀を0.1に調整した菌体懸濁液をプレート培地に塗抹した。液体培地に接種する際には、菌体を0.85% KClにて懸濁し、初発菌体濃度がOD₆₆₀ 0.05になるように接種した。N9T-4株の培養は静置培養、振とう培養ともに30°Cで行った。

原油からの微生物の単離

スクリーニング源として用いた原油サンプルは2,2,4-トリメチルペンタン（イソオクタン）を用いて以下のように洗浄、濃縮を行ってから用いた(8)。原油サンプル(200 ml)に等量のイソオクタンを添加し、ボルテックスにより攪拌後、8,000 × g、4°Cで20分間遠心分離を行った。沈殿画分に2倍量のイソオクタンを添加し、ボルテックスにより攪拌後、上記と同様に遠心分離を行った。最終的に沈殿画分を10 ml のイ

ソオクタンに懸濁した。イソオクタン処理後のサンプルを各種濃度 (2×、1×、1/10×、1/100×) の NB プレート培地および炭素源無添加の BM プレートに塗布後、30°C で数日培養し微生物の単離を試みた。

16S rRNA 遺伝子のクローニング

単離した細菌を同定するために、16S rRNA 遺伝子断片コロニーPCR により増幅した。プライマーは以下のものを用いた。

341F 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'

(*E. coli* 16S RNA 遺伝子領域 341 番目~357 番目)

907R 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'

(*E. coli* 16S RNA 遺伝子領域 907 番目~926 番目)

PCR 反応は、95°C で 3 分間熱処理後、95°C 1 分→56°C 1 分→72°C 1 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間処理した。得られた PCR 産物は TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社製) を用いて pCR2.1-TOPO に導入し、塩化カルシウム法により *E. coli* を形質転換した。塩基配列を決定した 16S rRNA 遺伝子のデータベース検索は主として BLAST プログラムを用いて行った。

各種酵素活性の測定法

各種緩衝液で懸濁した菌体に対して、約半量のガラスビーズ (0.1 mm) を加え、ミニ・ビードビーター (model 13110BX、バイオスペック社製) にて 4,200 rpm で 30 秒菌体破碎した後、即座に 30 秒氷冷した。この操作を 6 回繰り返した後、10,000 × g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上清を無細胞抽出液とし、各種酵素活性の測定に供した。タンパク質濃度の測定はバイオラッド・プロテインアッセイ (日本バイオラッドラボラトリーズ社製) にて行い、検量線は牛血清アルブミンを用いて作成した。

1. カルビンサイクル

リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) 活性 (11)

RubisCO 活性は 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) およびホスホクレアチンリンキナーゼ (CK) を共役させた NADH の酸化量により決定した。反応溶液組成は 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM MgCl₂、1 mM EDTA、28 unit PGK (シグマアルドリッチジャパン社製)、45 unit GAPDH (シグマアルドリッチジャパン社製)、10 unit CK (シグマアルドリッチジャパン社製)、1 mM ATP、0.1 mM NADH、5 mM ホスホクレアチン、20 mM NaHCO₃、および 2 mM リブローズ 1,5-ビスリン酸 (RuBP) に N9T-4 株の無細胞抽出液を加え終量

を 100 μl とした。反応開始は RubisCO の基質である RuBP の添加により行い、経時的な NADH の減少を 340 nm の吸光度で測定した ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

2. 還元的 TCA サイクル

ATP : クエン酸リアーゼ活性 (12)

ATP クエン酸 : リアーゼ活性は生成するアセチル-CoA 量をヒドロキサム酸と反応させて測定する方法を用いた。反応溶液組成は 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl_2 、10 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM クエン酸カリウム、0.1 mM CoA、0.2 M ヒドロキシルアミン (pH 8.4)、5 mM ATP および N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 1 ml とした。反応開始は ATP の添加により行い、37°C で 30 分反応させた後、1.2 ml の 20% トリクロロ酢酸と 0.3 ml の 2 M FeCl_3 を加え、アセチルヒドロキサム酸の形成による赤色の比色を 520 nm の吸光度により測定した。アセチル-CoA を用いた検量線を作成して、アセチルヒドロキサム酸量を測定した。ブランクは CoA を除いた条件で測定した。

3. 3-ヒドロキシプロピオン酸 サイクル (13)

① マロニル-CoA レダクターゼ 活性

マロニル-CoA レダクターゼ活性は NADPH の酸化量により測定した。反応溶液組成は 100 mM Tris-HCl (pH 7.8)、2 mM MgCl_2 、2 mM NADPH、0.4 mM マロニル-CoA および N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 2 ml とした。反応開始はマロニル-CoA の添加により行い、経時的な NADPH の減少を 340 nm の吸光度で測定した。

② プロピオニル-CoA シンターゼ活性 (14)

プロピオニル-CoA 活性は NADPH の酸化量により測定した。反応溶液組成は 100 mM Tris-HCl (pH 7.8)、10 mM KCl、5 mM MgCl_2 、3 mM ATP、0.5 mM CoA、0.4 mM NADPH、1 mM 3-ヒドロキシプロピオン酸および N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 2 ml とした。反応開始は 3-ヒドロキシプロピオン酸の添加により行い、経時的な NADPH の減少を 340 nm の吸光度で測定した ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

4. アセチル-CoA 経路 (15)

CO デヒドロゲナーゼ活性 (16)

CO デヒドロゲナーゼ活性は 2-(4-インドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-2H-テトラゾリウム塩化物 (INT) の還元量により測定した。反応液組成は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2)、2.5 mM INT、0.45 mM 1-メトキシフェナジンメソサルフェート (MPMS)、12.5% Triton X-100 および N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 0.8 ml とした。反応開始は CO ガスを飽和させた 0.2 ml の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) を添加することに

より反応を開始し、経時的な INT の増加を 496 nm の吸光度で測定した ($\epsilon=17.98 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

結果

1 備蓄原油中からの低栄養性細菌のスクリーニング

炭素源を含まない無機塩培地で生育する N9T-4 株の発見

種々の濃度の NB および炭素源を含まない BM を用いて、原油サンプルから低栄養性細菌の単離を試みた。その結果、計 123 株の細菌を単離し、16S rDNA 解析により同定を行った (図 1)。高 G+C グラム陽性細菌 (放線菌) が全ての培地条件下で見られ、単離された細菌の 50%以上がこのグループに属していた。高濃度 NB プレート培地 (2×NB) では低 G+C グラム陽性細菌の割合が高く (44%)、低濃度 NB プレート培地 (1/100×NB) ではα-プロテオバクテリアの割合が高かった (43%)。β-プロテオバクテリアは 1×NB プレート培地でのみ見られた。また炭素源無添加の BM プレートからは、カフジ原油サンプル由来の細菌 N9T-4 株のみが単離できた。ただし、本菌はイソオクタン処理した原油サンプルを BM 液体培地で培養した際、培地が懸濁するほどの生育を示したわけではなく、試験管の上部の内壁にこびりつくように生育していた。その菌体を掻き取りプレートによって単離したものである。N9T-4 株は 16S rDNA 配列解析により *R. erythropolis* と同定した (相同性 100%)。また、N9T-4 株はグラム陽性の桿菌であり、芽胞無形成、カタラーゼ反応陽性、オキシターゼ反応陰性を示し、形態学および生理学的特徴も *Rhodococcus* 属細菌の特徴と一致した (図 2)。

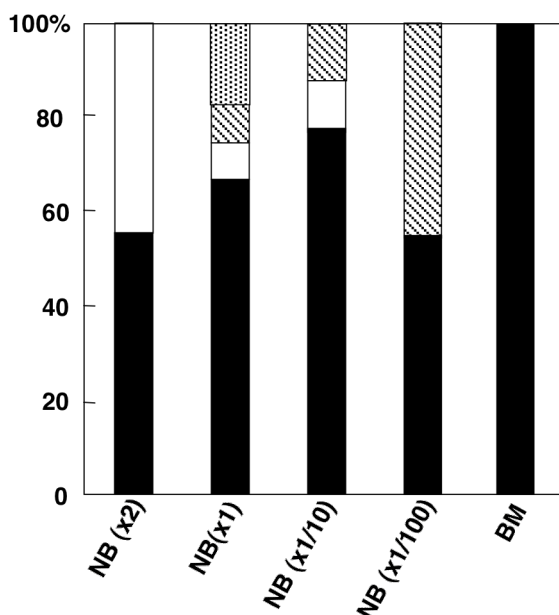


図2. 原油より単離したバクテリアの16S rDNA塩基配列による分類

種々の濃度のNBおよび炭素源無添加のBMを用いて原油サンプルより微生物の単離を行い、16S rDNA解析により単離バクテリアの同定を行った。各培地より単離したバクテリアのグループの割合をパーセンテージとして表している。黒帯：高G+C グラム陽性細菌、白帯：低G+C グラム陽性細菌、点線帯 β-プロテオバクテリア、斜線帯：α-プロテオバクテリア

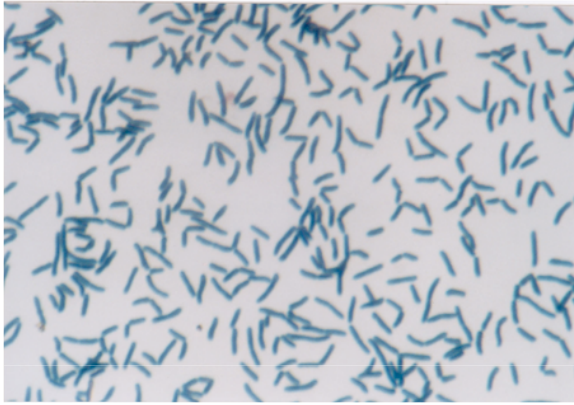


図3. N9T-4株のグラム染色像

N9T-4株はグラム陽性の桿菌であり、色は薄オレンジ色で胞子はなく、カタラーゼ反応は陽性、オキシダーゼ反応は陰性であった。以上の形態学および生理学的性質に加え、16S rDNA塩基配列から *Rhodococcus erythropolis* と同定された。

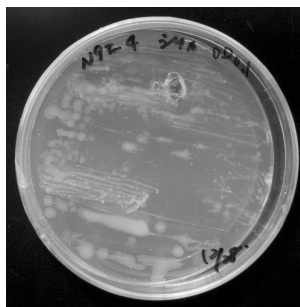
2 *R. erythropolis* N9T-4 株の培養条件の検討

炭素源・窒素源の検討

N9T-4 株は極端な低栄養生育を示し、炭素源無添加の BM プレートにて 30°C、5 日間の培養で半透明・白色のコロニーを形成した。BM 液体培地での生育はやはり悪く、48 時間の培養で菌体濃度が 5 倍 (OD₆₆₀ 0.25) に増加したが、それ以降の菌体の増殖は見られなかった。また、液体培地中では菌体が分散されず、試験管壁面に付着する様子が観察された。そこで最初に考えられたのはプレートの固化に用いた寒天の資化であったので、無機物であるシリカゲルを支持体とした BM プレートを作製し、N9T-4 株の生育を検討した (図 4)。シリカゲルプレートは適切に乾燥させるのが困難であり (乾燥し過ぎると表面にひび割れを起す)、コロニーの拡散が見られたが、N9T-4 株は BM シリカゲルプレート培地でも良好に生育した。しかし CO₂ 制限下において、N9T-4 株は BM シリカゲルプレート培地上で生育を示さなかった。



BM寒天プレート



BMシリカゲルプレート

図4. N9T-4株の低栄養性生育

N9T-4株はBMプレートまたはBMシリカゲルプレートでプラスチック袋内にて30°Cで5日間培養した。シリカゲルの乾燥を防ぐためにパウチ内に水を入れたプレートを置いた。

次に考えられる可能性は二酸化炭素 (CO₂) の利用であった。そこで、CO₂ 要求性を検討するために、プラスチックバックと CO₂ 吸収剤を用いて CO₂ 制限条件を独自に作製した。プラスチックバック内の気体をガスクロマトグラフィー解析したところ

CO₂は検出されなかった（データ示さず）。N9T-4株はプラスチックバック内（CO₂吸収剤なし）では良好な生育を示したが、上記CO₂制限下では生育を示さなかった（図4）。またCO₂制限下にて生育を示さなかったプレートを大気中に戻し数日間培養したところ、コロニーの形成が確認された。さらにBMプレートへ0.1% NaHCO₃を添加すると、N9T-4株はCO₂制限下においても生育を示した（図5）。これらの結果から、N9T-4株における低栄養生育はCO₂に依存していることが明らかとなった。また、N9T-4株はCO₂制限下において、BMプレートにグルコースを添加しても生育を示さなかった（図5）。そこでCO₂制限下でN9T-4株の生育を維持できる炭素源を調べるために、様々な糖（フルクトース、ガラクトース、マンノース、デンプン）、有機酸（コハク酸、クエン酸、リンゴ酸）、アルコール（メタノール、エタノール、プロパノール）、アルカン（*n*-ヘキサン、*n*-デカン、*n*-ヘキサデカン、*n*-テトラデカン）をBMに添加し、N9T-4株の生育を確認した。その結果、N9T-4株は*n*-ヘキサデカンおよび*n*-テトラデカンを炭素源として用いた時のみCO₂制限下でも生育を示した（図5）。グルコースなどの糖類がCO₂制限下でN9T-4株の生育を支持できなかったことは興味深く、また以後の実験では*n*-テトラデカンをCO₂制限下での炭素源として用いた。液体培養時に上記炭素源を添加したところ、アルコール、*n*-ヘキサン、*n*-デカン以外でOD₆₆₀ 1以上の培地の濁度が得られた。

アンモニア態窒素はエネルギー源として用いられることが知られている（17）。そこで様々な無機窒素化合物（NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、NaNO₃、NaNO₂、NH₄NO₃）および有機窒素化合物（0.05% 酵母エキス、0.05% カザミノ酸、ポリペプトン）をBMプレートに添加しN9T-4株の生育を確認した。その結果、NaNO₂を除いて、全ての窒素源で良好な生育を示し、またCO₂制限下でN9T-4株は生育を示さなかった。このことから、N9T-4株は低栄養性育時にアンモニアをエネルギー源として用いていないことが明らかとなった。

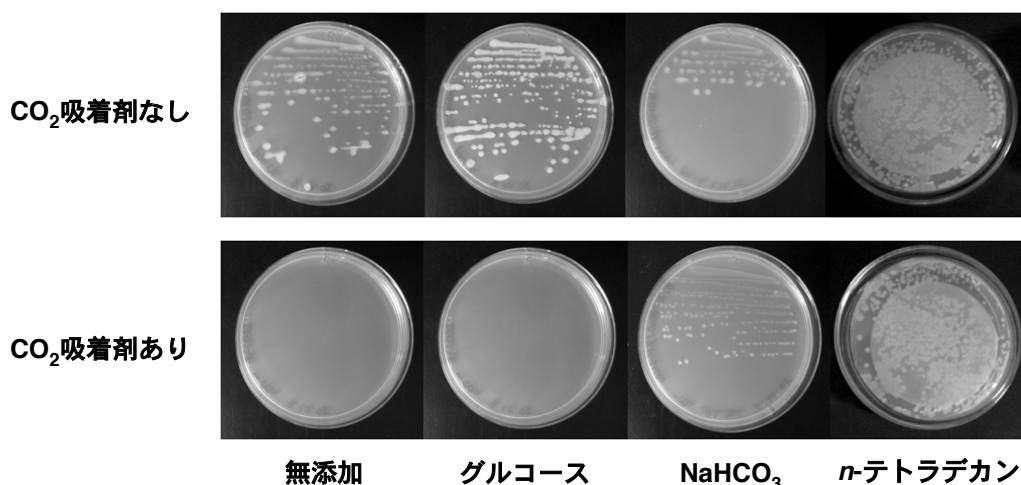


図5. 各種炭素源添加BM培地でのN9T-4株の低栄養性生育

N9T-4株は様々な炭素源を添加したBMプレートでCO₂吸着剤なし、またはCO₂吸着剤ありの条件下にてパウチ内で30°Cで5日間培養した。

3 N9T-4 株における既存炭酸固定経路の探索

既存炭酸固定経路鍵酵素をコードする遺伝子の探索

上記のように N9T-4 株は炭酸固定系を有することが示唆されたため、現在独立栄養性細菌で明らかとなっている 4 つの炭酸固定経路 (カルビンサイクル、還元的 TCA サイクル、アセチル-CoA 経路、3-ヒドロキシプロピオン酸 (3-HP) サイクル) が N9T-4 株に存在するかどうかをゲノム情報をもとに解析した。全ゲノム解析が終了した *Rhodococcus* sp. RHA1 株のデータベースを用いて (18)、上記固定経路の鍵酵素の検索を試みた。その結果、表 1 に示すように、RubisCO (カルビンサイクル)、ピルビン酸：受容体オキシドレダクターゼおよび ATP：クエン酸リアーゼ (還元的 TCA サイクル)、マロニル-CoA レダクターゼおよびプロピオニル-CoA シンターゼ (3-HP サイクル) は存在していないことが明らかとなった。

表1. *Rhodococcus* RHA1株のゲノム上に存在する既存炭酸固定経路の鍵酵素遺伝子

酵素名	遺伝子座	情報
カルビンサイクル		
リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ	NF	
還元的TCAサイクル		
ATP：クエン酸リアーゼ		
2-オキシグルタル酸：アクセプターオキシドレダクターゼ	ro02390 ro02389	
ピルビン酸：アクセプターオキシドレダクターゼ	NF	
還元的アセチル-CoA経路		
CO デヒドロゲナーゼ	ro04976 ro04975 ro04977 ro05231 ro05232 ro03488 ro03489 ro03490	ラージサブユニット メディアムサブユニット スモールサブユニット スモールサブユニット ラージサブユニット サブユニットG ラージサブユニット スモールサブユニット
3-ヒドロキシプロピオン酸サイクル		
マロニル-CoAレダクターゼ	probably NF	
プロピオニル-CoAシンターゼ	probably NF	
アセチル-CoAカルボキシラーゼ	ro06096 ro02935	α サブユニット β サブユニット
プロピオニル-CoAカルボキシラーゼ	ro03742 ro06282 ro06292 ro04222 ro06570 ro04066 ro01202 ro03744 ro08919	α サブユニット α サブユニット β サブユニット α サブユニット β サブユニット α サブユニット β サブユニット β サブユニット β サブユニット

しかしながら、アセチル-CoA 経路の鍵酵素である CO デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は RHA1 株のゲノム上に多数存在していることが明らかとなった。実際に BM プレートで生育させた N9T-4 株の無細胞抽出液および膜画分を用いて、上記炭酸固定系の各種鍵酵素の検出を試みたが、いずれの酵素活性も検出できなかった。

4 *R. erythropolis* N9T-4 株と同様の生育を示す微生物の検索

他の *Rhodococcus* 属細菌における低栄養性の検討

N9T-4 株の低栄養性は *R. erythropolis* あるいは *Rhodococcus* 属細菌の一般的な性質なのかを調べるために、保存機関から取り寄せたタイプカルチャー 11 株について BM プレートでの生育を検討した。 *R. erythropolis* の NBRC 株全て、および *R. rhodochrous* NCIMB11215 株、ATCC12674 株、ATCC17895 株、ATCC19410 株が N9T-4 株と同様に BM プレートで生育し、CO₂ 制限条件では生育を示さなかったが、*R. erythropolis* NBRC15567 株のコロニーは細胞密度が高い部分でしか形成されなかった (表 2)。生育を示さなかった 4 株 (*R. erythropolis* IFM155 および DMS743 株、*R. rhodochrous* ATCC17041 および ATCC33258) は *n*-テトラデカンを単一炭素源とした培地でも生育しなかったため、栄養要求性株である可能性が示唆された。そこで、ビタミン溶液および微量金属の代わりに 0.1% 酵母エキスを添加した BM プレートでの生育を検討した。その結果、全ての株で N9T-4 株と同様の生育が見られた (表 3)。しかしながら、最も大きなコロニーを形成したのは N9T-4 株であった。

表2. N9T-4株および*Rhodococcus*属細菌の低栄養性生育
N9T-4および他の*Rhodococcus*属細菌はBMプレートにて30°C、5日間培養した。

Strain	CO ₂ 吸着剤なし		BM/CO ₂ 吸着剤あり	
	BM		無添加	<i>n</i> -テトラデカン
<i>R. erythropolis</i> N9T-4	+++		-	++
<i>R. erythropolis</i> NBRC12320	+++		-	++
<i>R. erythropolis</i> NBRC15567	+		-	+
<i>R. erythropolis</i> NBRC16296	+++		-	++
<i>R. erythropolis</i> IFM155	-		-	-
<i>R. erythropolis</i> DSM743	-		-	-
<i>R. rhodochrous</i> NCIMB11215	++		-	+
<i>R. rhodochrous</i> ATCC12674	+++		-	++
<i>R. rhodochrous</i> ATCC17041	-		-	-
<i>R. rhodochrous</i> ATCC17895	+++		-	++
<i>R. rhodochrous</i> ATCC19710	++		-	++
<i>R. rhodochrous</i> ATCC33258	-		-	-

表3. N9T-4株および*Rhodococcus*属細菌の低栄養性生育
N9T-4および他の*Rhodococcus*属細菌はBMプレートにて30°C、5日間培養した。

Strain	CO ₂ 吸着剤なし	BM+YE ^a /CO ₂ 吸着剤あり	
	BM+YE ^a	無添加	<i>n</i> -テトラデカン
<i>R. erythropolis</i> N9T-4	+++	-	++
<i>R. erythropolis</i> IFM155	+++	-	++
<i>R. erythropolis</i> DSM743	+++	-	++
<i>R. rhodochrous</i> ATCC17041	+++	-	++
<i>R. rhodochrous</i> ATCC33258	++	-	++

^a ビタミン溶液の代わりに0.1% 酵母エキスを添加したBMプレート培地。

土壌からの再スクリーニング

葉さじ1杯の土壌サンプルを5 mlの0.85% KClに懸濁し、懸濁液上清をBMプレート培地に画線（植菌）後、30°Cで数日間培養する方法を一次スクリーニングとし、387土壌サンプルから178株を単離した。得られた178株を大気中およびCO₂制限下で培養したところ、14株がCO₂制限下で生育が低下または生育が見られなかった（二次スクリーニング）。これら14株について、1.5% NaHCO₃またはKHCO₃を添加したBMプレート培地にてCO₂制限下での生育を確認したところ、14株全て生育を示さなかった。そこでCO₂制限下のパウチ袋内にてCO₂ガスを発生させた条件下で培養を行ったところ、14株中4株（No. 3、31、56および59）が良好な生育を示した（三次スクリーニング）。三次スクリーニングで生育が見られた4株についてシリカゲルを支持体としたBMプレートでの生育を検討した。その結果、No. 3、31および56はシリカゲルBMプレート培地でも良好に生育したが、N9T-4株の時と同様にコロニーの拡散がみられた（図6）。またCO₂制限下において、これら3株はシリカゲルBMプレート培地上では生育を示さなかった。これらの結果から、No. 3、31および56株はN9T-4株と同様の超低栄養生育を示すことが明らかとなった。

N9T-4株と同様の低栄養生育を示した土壌単離菌3株について、16S rDNA塩基配列解析による同定を行った。No. 3、31および56はそれぞれ*Streptomyces viridobranneus* (accession no. AB184714、相同性99%)、*S. bikiniensis* (accession no. AB184602、相同性99%) および*S. exfoliatus* (accession no. AB184324、相同性99%) と高い相同性を示した。

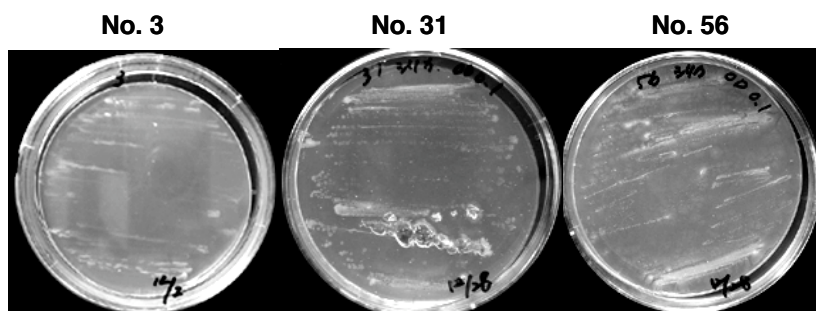


図6. 土壌単離菌株のBMシリカゲルプレートでの低栄養性生育

N9T-4株と同様の低栄養生育を示した土壌単離菌3株（No.3, 31, 56）をBMシリカゲルプレートで30°C、5日間培養した。シリカゲルの乾燥を防ぐためにパウチ内に水を入れたプレートを置いた。

タイプカルチャーの生育

Streptomyces 属に属する4株の研究室保存菌株 (*S. aureus* NBRC 100912、*S. griseus* subsp. alpha NBRC 15421、*S. bikiniensis* NBRC 14598、*S. venezuelae* NBRC 13096) について上記のスクリーニングを行った。一次スクリーニングでは3株 (*S. aureus*、*S. griseus* および *S. venezuelae*) が BM プレート培地で生育を示した。二次スクリーニングでは *S. venezuelae* のみが顕著な低栄養生育を示し、CO₂制限下では生育を示さなかった (図7)。



図7. *Streptomyces venezuelae*の低栄養生育

*S. venezuelae*は炭素源無添加BMプレート培地でCO₂吸着剤なし、CO₂吸着剤ありの条件下にてパウチ袋内で30℃で5日間培養した。

考察

備蓄原油より単離した *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素源およびエネルギー源無添加の無機塩培地に良好に生育し、その生育に CO_2 を要求した。しかし、エネルギー源が特定できないこと、 CO_2 固定経路が明らかになっていないことから「独立栄養性」とは呼ばず、「低栄養性」と称することとしている。しかしながら、本菌が生育する際に CO_2 を要求することは確かであり、無機塩培地でのコロニー形成も 3-5 日と早いことから、このような生育を「超低栄養性細菌 (super oligotroph) の新規な CO_2 要求性」と位置づけ、研究を進めることにした。

現在までに、独立栄養細菌において 4 種の炭酸固定サイクルおよび経路 (カルビンサイクル、還元的 TCA サイクル、アセチル-CoA 経路、3-HP サイクル) が知られている。カルビンサイクルは植物や多くの光合成または化学合成細菌で機能している最も知られている CO_2 固定経路であり、鍵酵素は RubisCO である。還元的 TCA サイクルは完全嫌気および微好気性独立栄養細菌で知られ、2 分子の CO_2 から 1 分子のアセチル-CoA (または 4 分子の CO_2 から 1 分子のオキサロ酢酸) を生成する。鍵酵素は ATP : クエン酸リアーゼ、2-オキシグルタル酸 : 受容体オキシドレダクターゼおよびピルビン酸 : 受容体オキシドレダクターゼである。アセチル-CoA 経路は 4 つの炭酸固定経路の中で唯一の非回路型経路であり、一酸化炭素 (CO) デヒドロゲナーゼを鍵酵素とし、2 分子の CO_2 からアセチル-CoA を合成する。3-HP サイクルでは 2 分子の CO_2 から 1 分子のグリオキシル酸が合成され、鍵酵素は 3-HP を生成するマロニル-CoA レダクターゼおよびプロピオニル-CoA シンターゼである。N9T-4 株の無細胞抽出液および膜画分からは、注目すべき事に、これら 4 つの微生物 CO_2 固定経路の鍵酵素活性は全て検出されなかった。近年、Jahn らにより *Igninococcus hospitallis* の不完全還元的 TCA サイクル (19) や Berg らにより古細菌 (アーキア) の 3-ヒドロキシプロピオン酸/4-ヒドロキシ酪酸サイクル (20) などいくつかの新規 CO_2 固定経路が報告されている。しかし、これらは完全に新規な CO_2 固定経路ではなく、どちらも既存 CO_2 固定経路の「変形」だと考えられる。既存の炭酸固定経路の鍵酵素のうち唯一アセチル-CoA 経路の CO デヒドロゲナーゼのみが RHA1 株のゲノムに存在していた。しかしながら本酵素活性も N9T-4 株にはなく、CO ガスを吹き込んでパウチ袋内での生育も見てみたが、差は見られなかった。CO デヒドロゲナーゼは CO を唯一の炭素源エネルギー源として生育できる微生物 (カルボキシドバクテリア) の鍵酵素としても知られ、本酵素によって CO が CO_2 へと酸化されるときに 2 電子の伝達が起こりエネルギー源が得られる (21)。この場合の CO_2 固定は RubisCO によるようである (22)。最近 *Mycobacterium* 属のカルボキシドバクテリアの CO デヒドロゲナーゼが一酸化窒

素 (NO) デヒドロゲナーゼ活性も持つという報告がなされた (23)。これは感染性 *Mycobacterium* 属が感染する際、宿主が防御のために生産する NO を分解するためであると考えられている。*Rhodococcus* 属の CO デヒドロゲナーゼにおいても同様の役割があるのかも知れない。

さらに、N9T-4 株の低栄養生育において、理由が不明であり、実験を困難にしている点は BM 液体培地では生育しないことである。NaHCO₃ を添加しても生育は示さないが、グルコースやアルカンを加えると液体培地でも良好に生育する。BM で液体培養を行うと試験管の内壁にこびりつくように生育するが、ここから 2 つのことが考えられる。1 つは生育には大気に存在するガス状態の CO₂ が必要ではないかということである。ただし、プレート培地では CO₂ 制限下で NaHCO₃ を添加した場合生育を示すので、上記の可能性は低い。もう 1 つは本菌の特に低栄養条件での生育は水分含量に敏感であるという点である。プレートを作製する際に乾燥が不十分であると生育は極端に悪くなる。また、寒天濃度の増加に伴い、生育もよくなるようである。したがって、低栄養時には水分が生育に阻害的に働き、究極的には液体培養できないのはいかと考えられる。

また、*R. erythropolis* N9T-4 株は備蓄原油より単離した微生物であるため、低栄養生育時の CO₂ 要求性は原油という特殊な環境に存在していたことと関係あるのか、あるいは広く自然界に存在するのかという点にも疑問や興味が生じた。日本の微生物保存機関に保存されている *R. erythropolis* 株や他の *Rhodococcus* 属細菌が N9T-4 株と同様な生育を示したことから、超低栄養生育は *Rhodococcus* 属に共通の特徴であることを示唆している。また日本の様々な場所から採取した土壌サンプルから、最終的に CO₂ 要求性超低栄養性細菌として 3 株の *Streptomyces* 属細菌を単離した。No. 3 および 31 はそれぞれ奈良県および兵庫県の上野原由来の土壌より単離され、No. 56 は愛知県の田圃由来の土壌より単離された。さらに研究室保存 *Streptomyces* 属細菌 1 株が単離菌株と類似の生育を示した。これらの結果から、このような CO₂ 要求性を示す新しいタイプの低栄養性細菌は自然界に広く存在しており、放線菌の特徴であるとも言えるかもしれない。単離した菌株が培地の微量成分やわずかに溶解している有機物を利用している可能性はまだ排除できないが、最終候補株は CO₂ ガスを要求することは明白である。近年、Watsuji ら (24) により、共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* は培地へ CO₂ ガスまたは重炭酸イオンを添加した時のみ著しい単独生育ができることを見いだしており、これはカルボニックアンヒドラーゼの遺伝的欠陥 (欠損) が原因であると考えられている。また彼らは、CO₂ 依存性が微生物の難培養性の問題と関係しているとも示唆している。しかしながらこれらは高濃度の CO₂ を要求するものであり、本研究で土壌より単離した菌株や N9T-4 株の生育には大気中の CO₂ 濃度で十分であると考えられる。以上の点から、これら超低栄養性細菌は新規で効果的な CO₂ 固定システム

または CO₂ を単一炭素源として利用することを可能にする特異的な炭素代謝系を有していると考えられている。

第 2 章 *R. erythropolis* N9T-4 株の低栄養生育に

特異的に発現するタンパク質の解析

備蓄原油中より単離した *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は極端な低栄養生育を示し、その生育には CO₂ を要求することが分かった。また、微生物の既存炭酸固定経路における鍵酵素の活性は検出されないことから、新規で効率の良い炭酸固定経路もしくは特殊な CO₂ 代謝経路を有している可能性が示唆された。本章では、前章で検討した培養条件をもとにプロテオーム解析により低栄養生育条件で特徴的に発現するタンパク質を網羅的に解析した。その結果候補に挙げた 2 つの酵素タンパク質について詳細に検討し、遺伝子破壊株の性質などを含めて、N9T-4 株の低栄養生育時の代謝経路の解明（推定）を試みた。

実験材料および方法

二次元電気泳動 (2-DE)

N9T-4 株を生育させた 10~50 枚の BM プレートよりスパチュラを用いて菌体を回収し、0.85% KCl にて洗浄を行った。洗浄後の菌体に 5 M 尿素、1 M チオ尿素、1% 3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸、1% トリトン X-100 および 1 錠のプロテアーゼ阻害剤 (Complete Mini EDTA、ロシュ・ダイアゴノスティック社製) を含む 60 mM Tris-HCl (pH 8.8) を加え 1 章と同様にガラスビーズを用いて菌体を破碎、遠心分離後の上清を無細胞抽出液とし、等電点電気泳動に供した。無細胞抽出液 (0.1 mg) を pH レンジ 4-7 の agarGEL (10 cm、アトー社製) に供試し、300V 低電圧で 150 分間泳動後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル (10 × 10 cm) を用いた二次元目の解析を行った。泳動後のタンパク質はポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜にブロッティングし、クーマシーブリリアントブルー R-250 にて染色した。目的のスポットを膜より切り出し、プロテインシーケンサー (model 476A、アプライドバイオシステムズジャパン社製) により N 末端アミノ酸配列解析を行い、FASTA (<http://fasta.genome.jp>) により相同性検索を行った。

酵素活性の測定

無細胞抽出液の調製は1章と同様に行った。

1. ホルムアルデヒド除去活性 (ホルムアルデヒドディスムターゼ活性)

反応溶液組成は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 7.0)、0.8 mM ホルムアルデヒド に N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 100 μ l とした。反応開始はホルムアルデヒドの添加により行い、30°C で 60 分反応後のホルムアルデヒド残存量をホルムアルデヒド・テスト・ワコー (和光純薬工業社製) を用いて測定した。1 分間に 1 μ mol のホルムアルデヒドを減少させる酵素量と 1 unit として定義した。

2. NAD 依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ

NAD 依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼは NAD の還元量により決定した。反応溶液組成は 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、1 mM NAD、1 mM ホルムアルデヒド、および N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 1 ml とした。反応開始はホルムアルデヒドの添加により行い、経時的な NADH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μ mol の NADH を生成する酵素量と 1 unit として定義した。

3. 3-ヘキシロース-6-リン酸シンターゼ(HPS) およびホスホ-3-ヘシキロイソメラーゼ (PHI) 活性

HPS および PHI 活性はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)、組換え PHI または HPS を共役させ、NADP の還元量により決定した (25)。本測定法の原理を図 7 に示す。HPS の基質であるリブロース 5-リン酸 (RuBP) はホスホリブロイソメラーゼ (PRI)によりリボース 5-リン酸 (Ri5P)を異性化させることにより供給した。HPS 酵素反応の生成物である 3-ヘキシロース 6-リン酸 (HuMP) を過剰の PHI によりフルクトース 6-リン酸 (FMP) に変換し、さらにホスホグルコースイソメラーゼ (PGI)によりグルコース 6-リン酸 (GMP) に変換した後、これを NADP 依存性の GPDH により酸化し、結果として NADPH の生成量を測定した。この反応系において組換え PHI の代わりに組換え HPS を過剰に加えると PHI 活性の測定系となる。組換え HPS および PHI は岡山理科大学理学部の三井亮司博士より分与していただいた。

反応液組成は、50 mM KPB (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、5 mM Ri5P、2.5 mM NADP、5 unit PRI、5 unit GPDH (シグマアルドリッチジャパン社製)、5 unit PGI (シグマアルドリッチジャパン社製)、5 unit 組換え PHI、10 mM ホルムアルデヒドおよび N9T-4 株の無細胞抽出液を加え全量を 500 μ l とした。反応開始はホルムアルデヒドの添加により行い、経時的な NADPH の生成を 340 nm の吸光度で測定した。1 分間に 1 μ mol の NADPH を生成する酵素量と 1 unit として定義した。

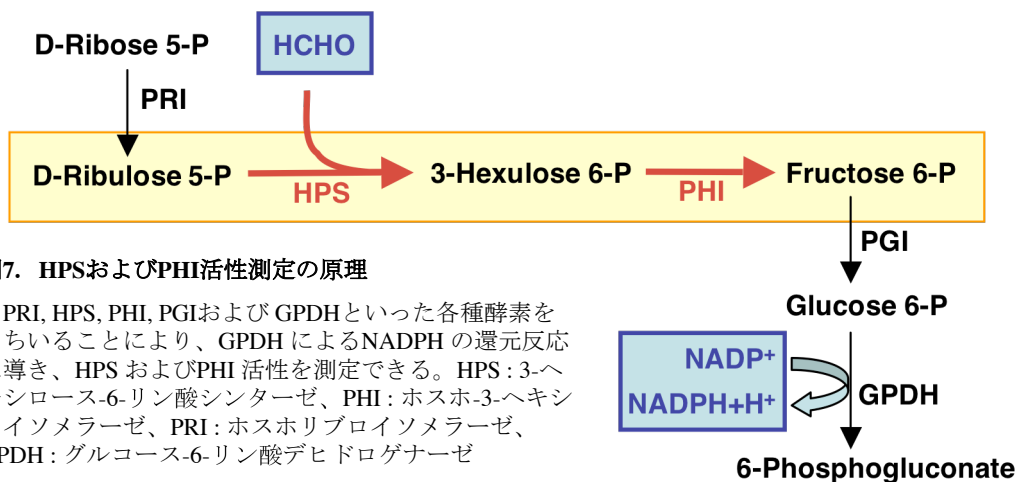


図7. HPSおよびPHI活性測定の方法

PRI, HPS, PHI, PGIおよびGPDHといった各種酵素をもちいることにより、GPDHによるNADPHの還元反応に導き、HPSおよびPHI活性を測定できる。HPS: 3-ヘキシロース-6-リン酸シンターゼ、PHI: ホスホ-3-ヘキシロイソメラーゼ、PRI: ホスホリブロイソメラーゼ、GPDH: グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ

CO₂ (ガス) 吹き込みによるホルムアルデヒド除去活性の誘導

ホルムアルデヒド活性を誘導するためのガスとしては、CO₂ 高含有ガス (CO₂ 20.3%、O₂ 19.8%、N₂ base、植野ガス社製)、CO₂ 非含有ガス (O₂ 19.8%、N₂ base、植野ガス社製) を使用した。また空気の吹き込みは、バキュームポンプ (Vpump-140、イワキ社製) により行った。

菌体懸濁液への気体の吹き込み方法を図 8-A に示す。5 ml の菌体懸濁液を 50-ml 容ファルコンチューブに入れ、吹き込み用および出口用ゴムチューブをつけたゴム栓で蓋をして、吹き込み用ゴムチューブからガスを吹き込んだ。また、CO₂ を除去した気体の吹き込み方法を図 8-B に示す。ガス吹き込み装置に CO₂ 吸着剤を詰め込んだカルシウムチューブ 2 本を連結させ、これをサンプルが入ったファルコンチューブと連結してガスを吹き込んだ。

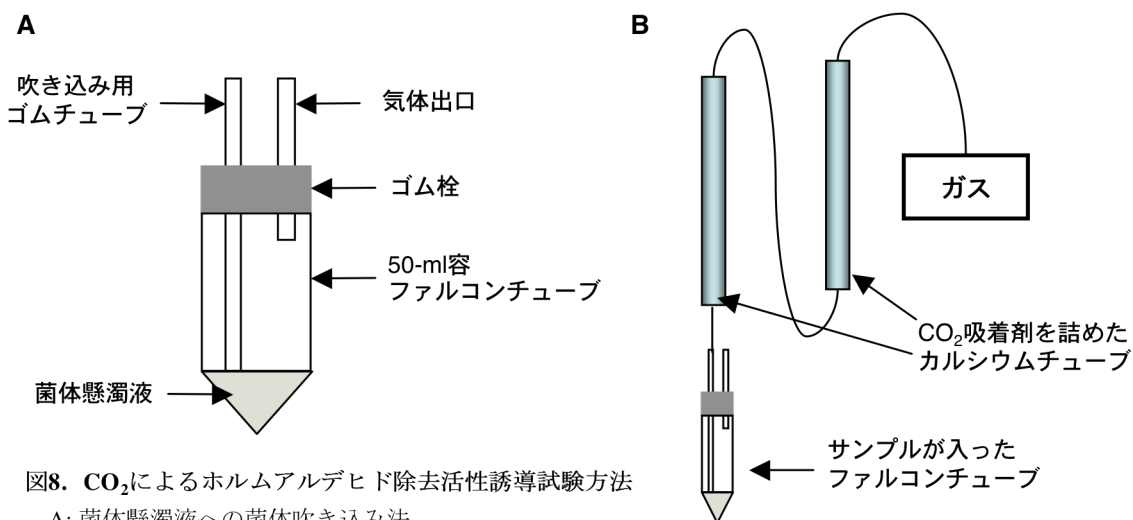


図8. CO₂によるホルムアルデヒド除去活性誘導試験方法

- A: 菌体懸濁液への菌体吹き込み法
- B: CO₂を除去した気体の作製方法

ホルムアルデヒド除去活性を有するタンパク質の同定

ホルムアルデヒド除去活性に関わるタンパク質の部分精製を Resource Q カラムクロマトグラフィーを用いて行った。フィルタ (0.45 μm 、PVDF Hydrophilic、ミリポア社製) に通した N9T-4 株の無細胞抽出液を Resource Q カラム (1 ml、GE ヘルスケア社製) に供し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄後、0-0.5M KCl グラジエントをかけて溶出した。活性画分を限外ろ過 (セントリコン-10、ミリポア社製、排除分子量 10,000) により濃縮し、SDS-PAGE (10%、10 \times 10 cm ゲル) に供した。上記に示したように泳動後のタンパク質は PVDF 膜にブロットイングし、アミノ酸シーケンサー (model 476A、アプライドバイオシステムズ社製) により N 末端アミノ酸配列を決定した。

遺伝子破壊用カセットの作製

遺伝子破壊用カセットは三段階 PCR 法により、N9T-4 株のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) 遺伝子 (*ald*) のほぼ中央の位置にカナマイシン耐性 (*Km^r*) 遺伝子 (*kan*) を組み込むことにより作製した (26)。

kan 断片の増幅は、50 ng Tn5 transposon (Epicentre 社製) を鋳型ににし、PCR により行った。*ald* の 5' 上流域および 3' 下流域断片の増幅は、50 ng N9T-4 株ゲノム DNA を鋳型ににし、PCR により行った。またメタノール: *N,N'*-ジメチル-4 ニトロソアニリン (NDMA) オキシドレダクターゼ (*MNO*) 遺伝子 (*mno*) 破壊用カセットは *ald* 破壊用カセットと同様に作製した。

本実験に用いたプライマーの配列は以下の通りである。

KAN2-20F 5'-CAA CCA TCA TTC GAT GAA TTG TGT C-3'

(*kan* の 5' 末端 (+20 から))

KAN2-1150R 5'-GTT GAT GAG AGC TTT GTT GTA GGT G-3'

(*kan* の 3' 末端 (+1150 から))

5'-AL 5'-CAA TGA CCG TGT ACG CCC-3' (*ald* の 5' 末端 (-2 から))

5'-ALD3' 5'-GAC ACA ATT CAT CGA TGA TGG TTG GAC GCG TAC TGC ATG
ATC AGG-3' (*ald* 遺伝子領域 (741 から 761 番目) + *kan* の 5' 末端とのキ
メラプライマー)

3'-ALD5' 5'-CAC CTA CAA CAA AGC TCT CAT CAA CGC AGA ACC TTA TCC
CCG TCA-3' (*ald* 遺伝子領域 (762 から 781 番目) + *kan* の 3' 末端とのキ
メラプライマー)

3'-ALD 5'-TCA GAA GAA GCC CTG AGC C-3' (*ald* の 3' 末端から)

5'-MNO 5'-GAT GGC TAT CGA GCT CAA C-3' (*mno* の 5' 末端 (-1 から))

5'-MNO3' 5'-GAC ACA ATT CAT CGA TGA TGG TTG AGA CAC GAA AGG CTC
ACT GC -3' (*mno* 遺伝子領域 (639 から 658 番目) + *kan* の 5' 末端とのキ

メラプライマー)

3'-MNO5' 5'-CAC CTA CAA CAA AGC TCT CAT CAA CCG TCT CGA TTT CGC
GCC TTC-3' (*mno* 遺伝子領域 (659 から 678 番目) + *kan* の 3'末端とのキ
メラプライマー)

3'-MNO 5'-CTA GAA GTA CGA CTT GTT GAT-3' (*mno* の 3'末端から)

上記の PCR 反応は全て、95°C で 3 分間熱処理後、95°C 1 分→60°C 1 分→72°C 1 分
を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 3 分間処理した。上記の反応により得られた 3 つ
の断片 (各 133 ng/ml) を用いて Fusion PCR を行った。プライマーセットは *ald* および
mno の構造遺伝子領域を増幅するプライマーを使用した。PCR 反応は、95°C で 2 分
間熱処理後、95°C 20 秒→55°C 30 秒→ (0.1°C/秒で温度上昇) →68°C 2 分を 30 サイクル
行い、最後に 72°C で 3 分間処理した。

N9T-4 株の形質転換法

N9T-4 株を 5 ml の 3% トリプティックソイブロス (TSB) で一晩前培養し、0.5% グ
リシンを含む 3% TSB 5 ml に OD₆₆₀ が 0.02 になるように植菌し本培養を行った。OD₆₆₀
0.9 まで培養後、30 分間氷冷した。1,800 × g、4°C で 15 分間遠心分離し、氷冷した
HS 緩衝液 (252 mM スクロースを含む 7 mM HEPES、pH 7.0) で菌体を 2 回洗浄した。
HS 緩衝液で OD₆₆₀ 15 に合わせ、これを N9T-4 株コンピテントセルとした。

N9T-4 株コンピテントセル 40 μl に 1 μl の各遺伝子破壊用カセット (100 ng) を添
加し、キュベット (1 mm gap、バイオ・ラッド社製) に移し、エレクトロポレーション
(電界強度 1.6 kV、抵抗値 129 Ω、静電容量 50 μF) を行った。得られた形質転換
体を 10 mM MgCl₂、0.5% *n*-テトラデカンおよび 0.1% トゥイーン 80 を含む HS 緩衝
液懸濁し、30°C で 12 時間好気・振とう培養を行った。その後、200 μg/ml カナマイシ
ンを含む LB 寒天培地に塗布し、シャーレの蓋に 2 ml *n*-テトラデカンを含ませたろ紙
を置き 30°C で数日間培養した。遺伝子の破壊は PCR により確認した。

RuMP 経路に関与する遺伝子のクローニング

hps および *phi* の増幅は以下に示すプライマーを用いて PCR により行った。

HPS-f 5'-ATG ACG AAG CTG CAG GTT GC-3' (HPS 遺伝子領域 5 末端)

HPS-r 5'-TCA GTG CTT CCT TGA GTG CC-3' (HPS 遺伝子領域 3 末端)

PHI-f 5'-ATG ACC ATC ACC GTC GAG CA-3' (PHI 遺伝子領域 5 末端)

PHI-r 5'-TCA GCC GAT GTT GGC GTG-3' (PHI 遺伝子領域 3 末端)

HPS-F75 5'-GTA CGT CGA CAT CAT CGA AC-3' (HPS 遺伝子領域の 75 番目)

PHI-F265 5'-GAT CTG CTG ATT GCC GTC TC-3' (PHI 遺伝子領域 265 番目)

PHI-R539 5'-TGG TCT TCA TTG CTC CAC AG-3' (PHI 遺伝子領域 539 番目)

PHI-F64	5'-GAG AAC GAG CGC CTA CTC AA-3' (PHI 遺伝子領域 64 番目)
PHI-R367	5'-CCG TAG TCA CAG CGA GCA C-3' (PHI 遺伝子領域 367 番目)
HPS-F74	5'-CGT ACG TCG ACA TCA TCG AA-3' (HPS 遺伝子領域 74 番目)
HPS-R459	5'-GTC GAG GAG GGT CTG AAT GG-3' (HPS 遺伝子領域 459 番目)
PHI-F184mix	5'-ATG GCC GCS ATG CGV CTG AT-3' (PHI 遺伝子領域 184 番目・混合プライマー)
HPS-R572mix	5'-TAG ATK GCG CCA CCG GCG A-3' (HPS 遺伝子領域 572 番目・混合プライマー)
PHI-F184deg	5'-ATG GCN GCN ATG CGN CTN ATG-3' (PHI 遺伝子領域 184 番目・混合プライマー)
HPS-R426deg	5'-BGC YTG YTC RTC NAG NCC-3' (HPS 遺伝子領域 426 番目・混合プライマー)
HPS-R93nes	5'-YTC DAT DAT RTC NAC RTA CGG-5' (HPS 遺伝子領域 93 番目・混合プライマー)
PHI-ConFdeg	5'-TTC GCE ATG CGI CTS ATG CAC-3' (PHI 遺伝子の保存領域)
HPS-ConRdeg	5'-RTC SAG SGT CTT SAG GTC TGC-3' (HPS 遺伝子の保存領域)

上記の PCR 反応は全て、95°C で 3 分間熱処理後、95°C 1 分→55°C 1 分→72°C 1 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 3 分間処理した。

結果

1 二次元電気泳動によるプロテオーム解析

CO₂制限下で発現が誘導されるタンパク質の解析

N9T-4株の低栄養生育に関与するタンパク質を解析するために、炭素源無添加BM培地（低栄養生育）および*n*-テトラデカン添加培地（従属栄養生育）で生育させたN9T-4株の菌体を用い、2-DEによりタンパク質の発現パターンの差を解析した。得られた二次元電気泳動像の比較を図9に、低栄養生育条件および従属栄養生育条件で特異的に発現するタンパク質を表4に示す。その結果、6つのタンパク質が低栄養生育条件下で強く誘導され、そのうちの4つが分子シャペロンに相同性を示した。45 kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列は*Rhodococcus* sp. NI86/21のThcE (27) と相同性が高く、55 kDaのタンパク質は1アミノ酸を除き*Rhodococcus*属のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) (28) と一致した。N9T-4株の炭酸固定経路の解明が第一の目的であったため、以後上記2つの酵素タンパク質と思われるものについて検討を進めることにした。

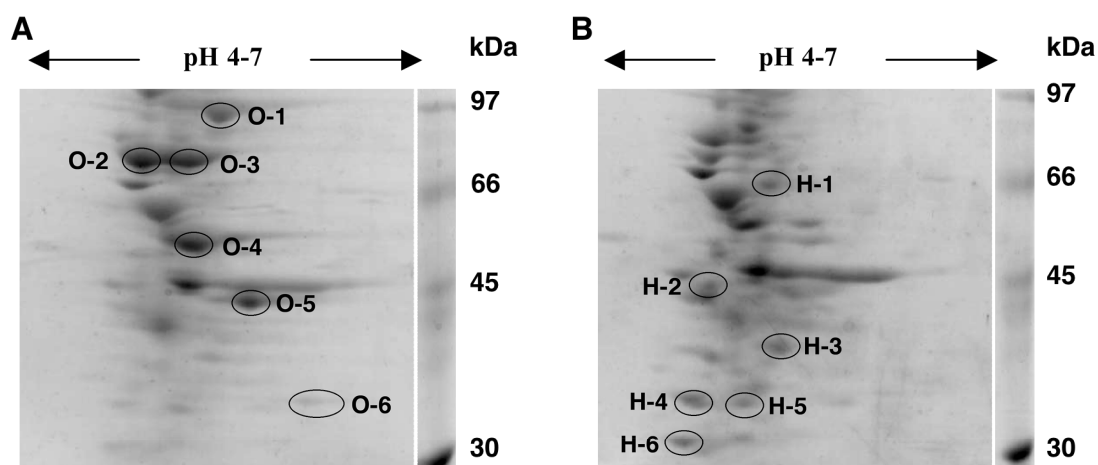


図9. 低栄養性生育および従属栄養生育させたN9T-4株無細胞抽出液の二次元電気泳動図

炭素源無添加のBMプレート (A) およびテトラデカンを添加したBMプレート (CO₂制限下) (B) で培養した菌体のタンパク質100 μgを二次元電気泳動により分離した。各培養条件で発現が高かったタンパク質を丸印で囲んだ。スポット番号は表4と対応している。

表4. 二次元電気泳動により同定したタンパク質

各条件で特異的に発現するタンパク質のスポット番号	MM1 ^a (kDa)	N-末端配列	タンパク質名	MM2 ^d (kDa)	Accession no. ^e
低栄養性生育条件					
O-1	97	MDTGSLTEKSEALQEAON MDIGKFTEKSQQALAEAQN	シャペロンClpB	97.2	YP_706636
O-2	70	ATAVGIDLGTNNX ARAVGIDLGTNNX	シャペロンDnaK (HPS70)	67.3	P80692
O-3	70	ATAVGIDLGTNNX ARAVGIDLGTNNX	シャペロンDnaK (HPS70)	37.3	P80692
O-4	55	TVYARPGTADAIMSFQSRYP TVYARPGTADAIMSFQSRYP	ALDH	55.2	AAZ14956
O-5	45	AIELNQIWFPIWEP AIELNQIWFPIKEF	MNO	46.5	AAB80771
O-6	35	ARDYYELGVP-RAARDDI ARDYYEVGVSRSASQDEI	シャペロンDnaJ3	33.4	Q0S1V6
従属栄養性生育条件					
H-1	60	AKITAFDEEARRQLERGLNA AKTIAYDEEARRGLERGLNA	シャペロンGroEL	56.6	YP_702111
H-2	40	MDLFEYQAKELFAEHXV MDLFEYQAKELFAKHEV	スクシニルCoAシンテターゼ β-サブユニット	40.8	YP_880328
H-3	36	TVRVGVNGFGRIGRNFRAV TVRVGINGFGRIGRNFRAV	グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)	35.9	YP_707099
H-4	33	AEVLVVEHAEGALKKVVTE AEVLVVEHAEGALKKVSTE	電子伝達系フラボプロテイン α-サブユニット	32.0	YP_706396
H-5	33	ANYTAADVVKRLRELTGSGMM ANYTAADVVKRLRELTGSGMM	伸長因子EF1B	29.3	YP_706510
H-6	30	TNIVVLIKQVPDTWSERKLTG TNIVVLIKQVPDTWSERKLTG	電子伝達系フラボプロテイン β-サブユニット	28.0	YP_706395

a: 実験データより得られた分子量、b: アミノ酸シーケンサーにより決定したN末端アミノ酸配列
c: 相同性検索 (FASTA) により同定したタンパク質名、d: データベースのアミノ酸配列より推定した分子量
e: GenBank Accession no.

誘導タンパク質をコードする遺伝子のクローニング

上記の2つの酸化還元酵素に対応する遺伝子はゲノムが明らかとなっている *Rhodococcus* sp. RHA1 株のゲノム上にも存在していた。そこで、RHA1 株のゲノム情報をもとにこれらのタンパク質をコードしている遺伝子を増幅するためのプライマーセットを作製し、N9T-4 株のゲノムを鋳型に 45 kDa および 55 kDa のタンパク質それぞれに対応する 1,275 bp および 1,524 bp の DNA 断片を PCR により増幅した。増幅した DNA 断片より類推したアミノ酸配列を BLAST 検索によりアライメントを行ったところ、45 kDa のタンパク質はグラム陽性メタノール資化性細菌(メチロトローフ) *Amycolatopsis methanolica* および *Mycobacterium gastri* MB19 由来のメタノール:*N,N'*-ジメチル-4 ニトロソアニリン (NDMA) オキシドレダクターゼ (MNO) (29) や *Rhodococcus* sp. NI86/21 の ThcE (27) と相同性を示した。一方 55 kDa のタンパク質は *R. erythropolis* UPV-1 株由来の脂肪族アルデヒドに対して基質特異性の広い ALDH(相同性 99.6%) (28) および *Rhodococcus* sp. NI86/21 株の ThcA (相同性 99%) (30) と高い相同性を示した。UPV-1 株の ALDH はホルムアルデヒドにも作用するユニークな

ALDH である。

2 *R. erythropolis* N9T-4 株のホルムアルデヒド除去活性

N9T-4 株のホルムアルデヒド除去活性

前項で述べた通り、メタノールに作用する MNO およびホルムアルデヒドに作用する ALDH が特異的に発現していることより、N9T-4 株の低栄養生育とメタノール代謝との関連が示唆された。しかしながら、本菌はメタノールを単一炭素源・エネルギー源として資化することができず、上記酵素の存在と矛盾するが、近年、非メチロトロフィックな細菌やアーキアにもホルムアルデヒド代謝系が見いだされていることから、本菌のホルムアルデヒド除去能に着目し、検討を行った。

低栄養および従属栄養条件下で生育させた N9T-4 株の無細胞抽出液を調製し、ホルムアルデヒド除去活性を測定した。その結果、N9T-4 株は強力なホルムアルデヒド除去活性をもつことが分かった (図 10-A)。従属栄養条件下のホルムアルデヒド除去活性は 0.10 units/mg・protein であったのに対し、低栄養生育条件下の活性はその約 3 倍 (0.31 units/mg・protein) であった。また経時的な各種濃度ホルムアルデヒド除去について検討したところ、30 mM ホルムアルデヒドは約 300 分、60 mM ホルムアルデヒドは約 400 分でほぼ消去し、100 mM の高濃度でも活性は失われなかった (図 10-B)。

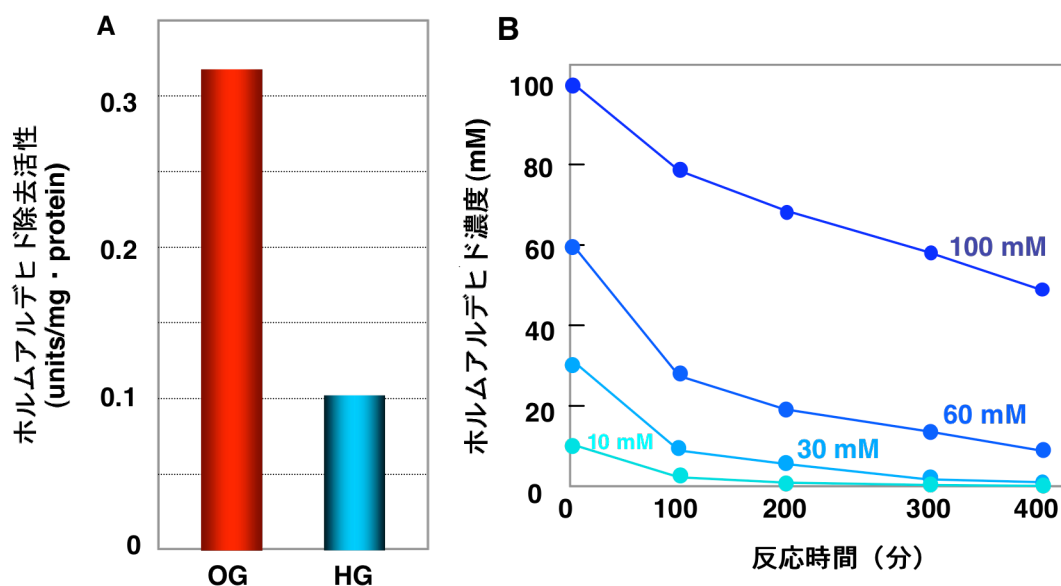


図10. N9T-4株の無細胞抽出液が示すホルムアルデヒド除去活性

A: N9T-4株におけるホルムアルデヒド除去活性 (OG:低栄養性生育条件、HG:従属栄養条件)

B: 低栄養性生育条件下で生育させたN9T-4株による高濃度ホルムアルデヒドの除去
無細胞抽出液を含む反応系 (タンパク質 0.17 mg/反応液 500 μ l)にホルムアルデヒド
(10, 30, 60, 100 mM)を添加し、経時的にホルムアルデヒド量を測定した。

CO₂によるホルムアルデヒド除去活性の誘導

N9T-4株における低栄養生育とホルムアルデヒド除去活性が直接関与しているかを調べるために、CO₂によりホルムアルデヒド除去活性が誘導されるか検討した。プレート培地での培養は菌体を大量に調製することが困難であるため、栄養源の豊富な液体培地 (LB 培地および 2×LB 培地) を用いて N9T-4 株の菌体を大量に調製することを試みた。その結果、N9T-4 株は 2×LB 培地で培養すると、培養 44 時間で定常期に達し(OD₆₆₀ 10.2)、ホルムアルデヒド除去活性の誘導は見られなかった。そこで 2×LB 液体培地で対数増殖期中期まで生育させた N9T-4 株の菌体に、CO₂ 高含有ガスを一定時間 (45、90、180 分間) 吹き込んだ後、ホルムアルデヒド除去活性の誘導を試みた (図 11-A)。その結果、ホルムアルデヒド活性は全く誘導されなかった。この実験方法では 2×LB 液体培地中に CO₂ を吹き込んでいるため、栄養分によって低栄養生育代謝系が抑制され、ホルムアルデヒド除去活性が誘導されなかった可能性が考えられた。

そこで N9T-4 株を 2×LB 液体培地で生育させた後、培地を BM 液体培地にて置換し、その後 CO₂ 高含有ガスを一定時間(45、90、180 分間) 吹き込み、ホルムアルデヒド活性を測定した (図 11-B)。その結果、CO₂ 高含有ガスによってホルムアルデヒド除去活性が誘導されたが、コントロールとして用いた CO₂ 非含有ガスによってもホルムアルデヒド除去活性が誘導された。購入した CO₂ 非含有ガスは、酸素 20%と窒素 80%を混合したガスであり、CO₂ を全く含まない保証はなく、また混合する際に微量に CO₂ が混入した可能性も考えられる。そこで気体を吹き込むゴムチューブに CO₂ 吸着剤を詰めたカルシウムチューブを 2 本連結させ、CO₂ を含まない気体を吹き込む装置を作製した。この装置を用いて、上記実験と同様にそのままの空気 (大気) と CO₂ を除去した空気を吹き込むことにより、ホルムアルデヒド除去活性の誘導を試みた (図 11-C)。その結果、CO₂ を除去した空気を吹き込んだ条件では全くホルムアルデヒド除去活性が検出されなかったことから、CO₂ によりホルムアルデヒド除去活性が誘導されることが示された。

ホルムアルデヒド除去活性を有するタンパク質の同定

ホルムアルデヒド除去に関与する酵素を同定するために、低栄養生育条件下で生育させた N9T-4 株の無細胞抽出液を Resource Q カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。その結果、フラクション No. 30 および No. 31 に顕著なホルムアルデヒド除去活性を示すピークが得られた。また、それとは別に NAD 依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素活性のピークがフラクション No. 33 および No. 34 に見られた (図 12)。

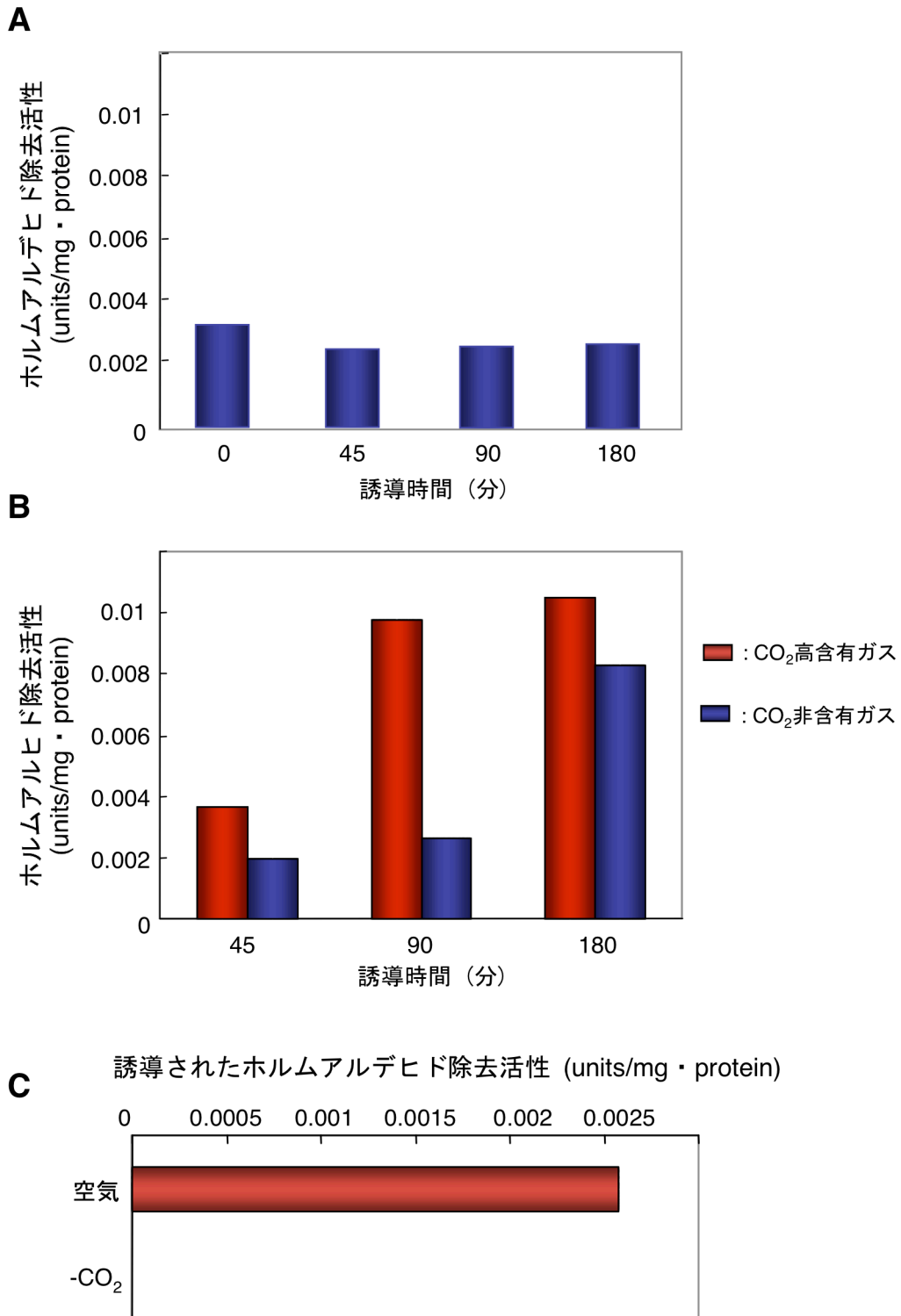


図11. CO₂によるホルムアルデヒド活性の誘導

A: 2× LB液体培地で生育させた菌体に直接 CO₂高含有ガスを吹き込み誘導した結果

B: 2× LB液体培地で生育させ後、BM液体培地で洗浄・置換してからガスを吹き込んで誘導した結果 (コントロール (吹き込み前) を引いた値)

C: 空気とCO₂を除去した空気 (-CO₂) を吹き込み、90分間酵素を誘導した結果 (吹き込み前の値を引いた値)

ホルムアルデヒド除去活性およびNAD依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素活性があるそれぞれのフラクションをフィルタにて濃縮し、SDS-PAGEに供した結果、ホルムアルデヒド除去活性およびNAD依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素活性と対応するタンパク質のバンドを検出できた。これらのタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析したところ、補酵素を必要としないホルムアルデヒド除去活性を示したタンパク質はMNO、NAD依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素活性を示すタンパク質はALDHであることが判明し、上記のプロテオーム解析で同定された酵素タンパク質と完全に一致した。

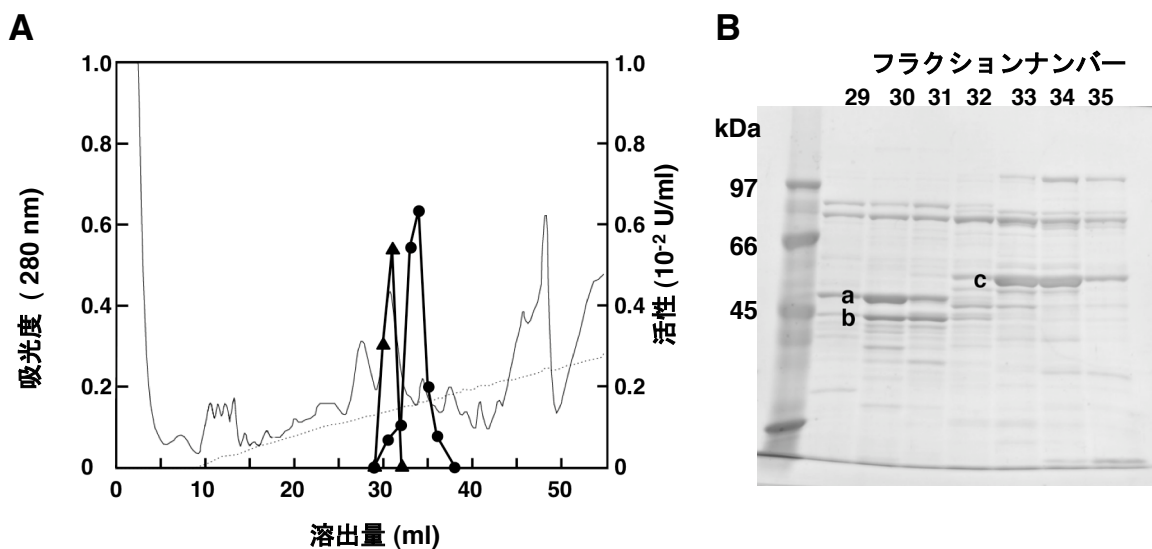


図12. ホルムアルデヒド除去活性を担うタンパク質の同定

A: BMプレートで低栄養条件下にて培養させたN9T-4株の無細胞抽出液をResource Qカラムクロマトグラフィーにより分画し、各画分の補酵素非依存ホルムアルデヒドディスムターゼ活性およびNAD依存性ALDH活性を測定した。

(黒丸: ALDH活性、黒三角: MNO活性、実線: 280 nmでのタンパク質濃度)

B: 図Aの濃縮画分のSDS-PAGE。バンドbおよびcのN末端アミノ酸配列は2-DEで検出された45および55 kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列と一致した。バンドaのN末端アミノ酸配列はSTTGTRKTAELQDDDTNであり、*Rhodococcus* sp. RHA1株のイソクエン酸脱離酵素と相同性が高かった。

MNOはNDMAを電子受容体としてメタノールを酸化する酵素であるが、なぜホルムアルデヒド除去に関与するのかという疑問が生じる。そこでホルムアルデヒド除去に伴う反応生成物を確認したところ、ホルムアルデヒドの減少に従い、当モルのメタノールおよびギ酸が生成した(図13)。したがって、N9T-4株のホルムアルデヒド除去活性はMNOによるホルムアルデヒドディスムターゼ活性に由来することが示唆された。

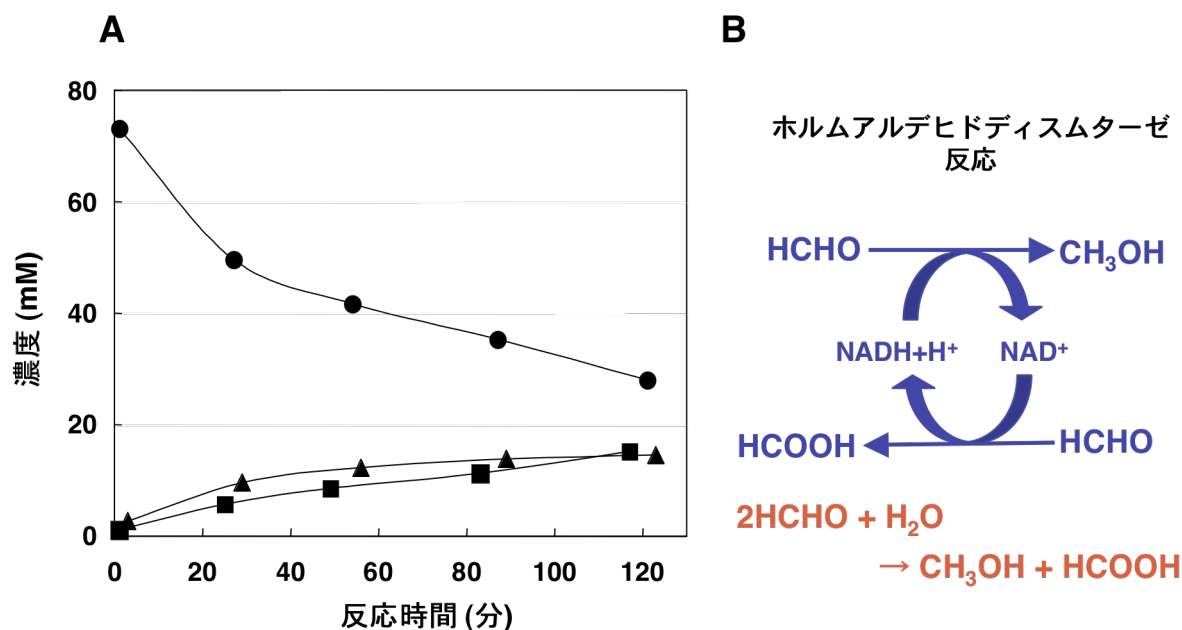


図13. MNOのホルムアルデヒドディスムターゼ反応

A: 部分生成MNOのホルムアルデヒドディスムターゼ反応

図12のフラクション31を50 mMリン酸バッファー中で70 mMホルムアルデヒドと反応させ、反応液中のホルムアルデヒド、メタノール、ギ酸量を経時的に測定した。ホルムアルデヒドは上記の比色法、メタノールはガスクロマトグラフィー、ギ酸は酵素法により測定した。

●: ホルムアルデヒド濃度、■: メタノール濃度、▲: ギ酸濃度

B: ホルムアルデヒドディスムターゼの反応式

N9T-4株におけるALDHおよびMNO活性の誘導

ホルムアルデヒド除去に関与することが明らかになった2つのタンパク質、ALDHおよびMNOの培養条件による活性発現の差を検討した(表5)。その結果、低栄養条件下で最も高くなり、それぞれLB培地の活性に比べ約54倍、59倍であった。またBM培地でもグルコースを添加すると1/3程度に活性が低下した(データ示さず)。これらの結果からALDHおよびMNO活性は低栄養条件で誘導され、栄養源により制御を受けることが明らかとなった。さらにホルムアルデヒドの添加効果を確認したところ、MNO活性はホルムアルデヒドにより誘導されるが、興味深いことにALDH活性はホルムアルデヒドにより誘導されないということが明らかとなった(表5)。

表5. N9T-4株無細胞抽出液のALDHおよびMNO活性^a

培地	比活性($\times 10^2$ U/mg)	
	ALDH	MNO
LB	2.05	0.524
LB + ホルムアルデヒド	1.81	1.84
BM	109.8	31.0
BM + <i>n</i> -テトラデカン	31.9	10.0

^a: N9T-4株は1 mMホルムアルデヒド無添加または添加LB培地にて30°C、2日間培養し、またテトラデカン無添加または添加BMプレートにて30°C、5日間培養した。

3 鍵酵素遺伝子破壊株の取得と性質

ALDH 遺伝子破壊株の取得

上記のように N9T-4 株の低栄養生育に ALDH と MNO が関与していることが示唆された。そこで、ALDH および MNO が低栄養生育に必須であるかを検討するために、まず ALDH 遺伝子の破壊を試みた。

ALDH 遺伝子構造領域 (1,524 bp) のほぼ中央の位置 (+761) に、1,131 bp の Km^r 遺伝子を挿入し、ALDH 遺伝子破壊用カセットを作製し、エレクトロポレーション法により N9T-4 株に導入した。得られた Km^r 変異株 420 株について PCR により ALDH 遺伝子断片を増幅した結果、4 株で 2.7 kb の断片が得られ、ALDH 遺伝子内に Km^r 遺伝子が組み込まれ ALDH 遺伝子が破壊されていることが確認できた。

得られた ALDH 破壊株について各種培地での生育を確認したところ、ALDH 遺伝子破壊株は炭素源無添加の BM 培地では生育を示さず、*n*-テトラデカンの添加により生育を示した (図 14)。

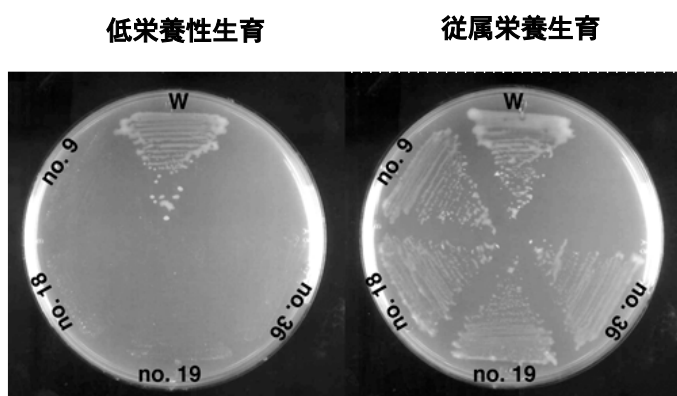


図14. N9T-4株野生株および ALDH遺伝子破壊株の生育

N9T-4株野生株および ALDH遺伝子破壊株をBMプレートに植菌し、低栄養生育条件または従属栄養条件下で30℃、3日間培養した。従属栄養条件ではプレートの蓋に*n*-テトラデカンを含ませたろ紙を置いた。W: 野生株、nos: ALDH遺伝子破壊株

この結果から、ALDH は N9T-4 株の低栄養生育において必須であることが示唆された。また、N9T-4 株はグルコースを炭素源として生育する時にも CO_2 を必要とすることがこれまでの結果から明らかになっているが、ALDH 遺伝子破壊株はグルコースを炭素源とした培地では野生株と同程度の生育を示したことから、ALDH はグルコースでの生育には関与しておらず、グルコース生育時の CO_2 要求性は低栄養生育時の CO_2 要求性とは異なることが示唆された。また、第 1 章で生育を検討した *Rhodococcus* 属細菌のタイプカルチャー 11 株の各ゲノムを鋳型に PCR により ALDH および MNO に対応するオルソログ遺伝子の探索を行ったところ、全ての株で両遺伝子が増幅された (データ示さず)。

MNO 遺伝子破壊株の作製

ALDH 遺伝子破壊株作製時と同様に、MNO 遺伝子構造領域 (1,275 bp) のほぼ中央の位置 (+658) に 1,131 bp の Km^r 遺伝子を挿入し、エレクトロポレーション法により MNO 遺伝子破壊用カセットを N9T-4 株に導入した。得られた Km^r 株の中から約 1,000 株について PCR により MNO 遺伝子断片を増幅した結果、全ての Km^r 株の MNO 遺伝子座に Km^r 遺伝子は挿入されていないことが明らかとなり、 Km^r 遺伝子が非相同組み換えを起こしていることが示唆された。一般的に *Rhodococcus* 属細菌は非相同組み換えが非常に起こりやすいことが知られている。

4 炭酸水素塩による ALDH および MNO の誘導

振とうによる ALDH および MNO 活性の誘導

上記の結果から、ホルムアルデヒド除去活性は CO_2 により誘導され、ホルムアルデヒド除去活性を担う酵素は ALDH および MNO の 2 種であることが明らかとなった。酵素活性の CO_2 誘導性についてさらに詳細な検討を行うために、 CO_2 吹き込み実験の簡便化を試みた。2×LB 液体培地で N9T-4 株を対数増殖期中期まで生育させ、BM 液体培地で菌体を洗浄後、5 ml BM 液体培地に懸濁した菌体 (OD_{660} 5) を試験管に分注し 30°C で振とう培養した。培養後の菌体を回収し、ALDH および MNO 活性を測定した。その結果、振とうにより経時的に ALDH および MNO 活性は上昇した (図 15)。また両酵素活性の誘導には時間差が見られ、ALDH 活性は MNO 活性より早く誘導される傾向にあった。

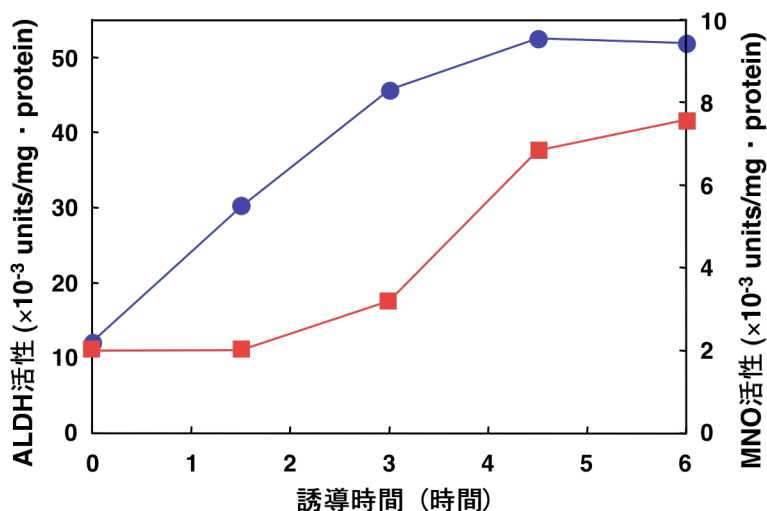


図15. 振とうによるN9T-4株のALDHおよびMNO活性の誘導

2×LB液体培地で対数増殖期中期まで培養しBM液体培地で洗浄後、菌体懸濁液 ($OD_{660}=5$) 5 mlを試験管に入れ、30°Cにて振とう培養を行い、ALDHおよびMNO活性を経時的に測定した。

● : ALDH活性, ■ : MNO活性

ALDH 破壊株での両酵素活性の誘導

ALDH 破壊株での両酵素活性の誘導を検討した。上記と同様に N9T-4 株および ALDH 破壊株 (no. 9) を振とう培養後、ALDH および MNO 活性を測定した。その結果、ALDH 破壊株では ALDH だけでなく MNO 活性も誘導されなかった (図 16-A)。また、SDS-PAGE により両酵素の発現を確認したところ、N9T-4 株では ALDH および MNO の経時的な増加が確認できたが、ALDH 破壊株では両酵素ともに誘導が見られなかった (図 16-B)。

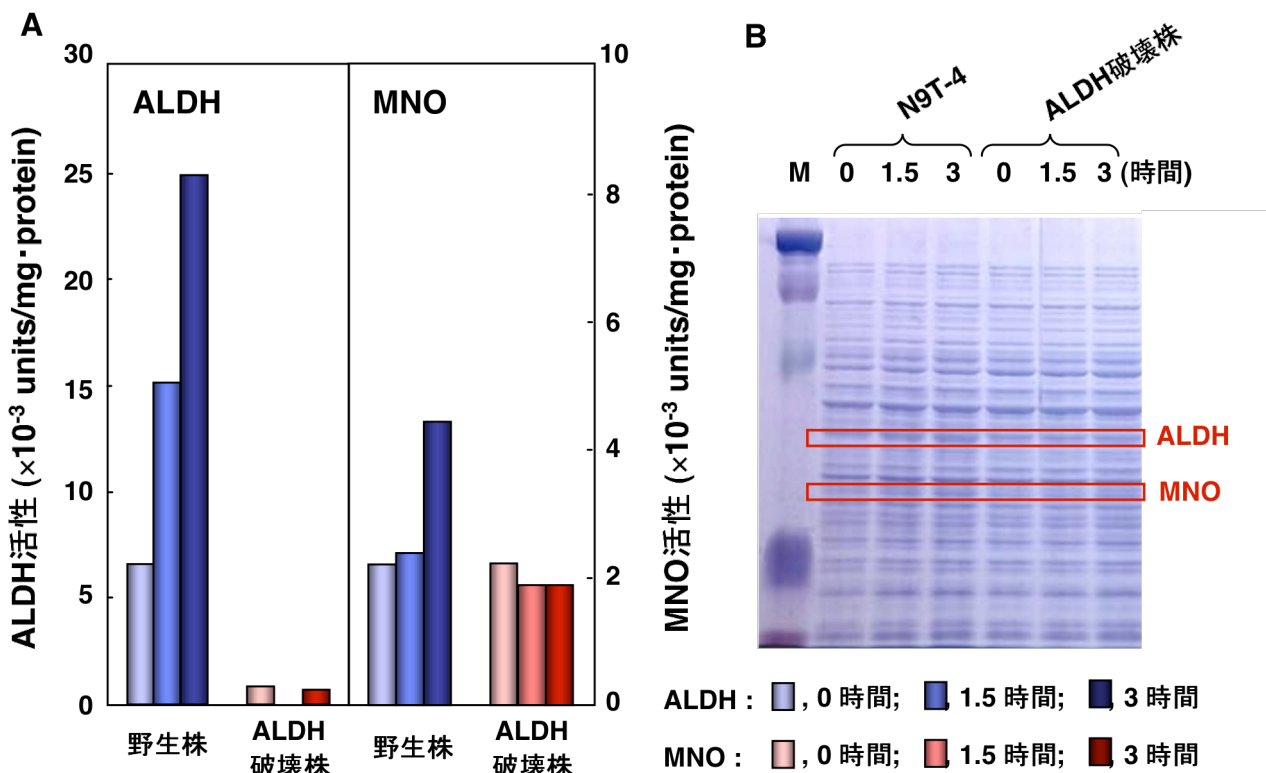


図16. 振とうによる野生株およびALDH遺伝子破壊株におけるALDHおよびMNO活性の誘導

A: ALDHおよびMNO活性経時的な変化

2×LB液体培地で対数増殖期まで培養しBM液体培地で洗浄後、菌体懸濁液 (OD₆₆₀=5) 5 ml を試験管に入れ、30℃にて振とう培養を行い、ALDHおよびMNO活性を経時的 (0、1.5、3 時間) 測定した。

B: SDS-PAGEによるALDHおよびMNOの確認

Aの活性測定に用いた無細胞抽出液 (10 μg) をSDS-PAGEに供した。

炭酸水素塩による両酵素活性の誘導

振とうにより両酵素活性が誘導されることが明らかになったため、両酵素が CO₂ により誘導されているのかを詳細に検討した。振とう時の BM 液体培地に NaHCO₃ を添加し、両酵素活性を測定した。その結果、炭酸水素塩の添加により両酵素活性は低下した (表 6)。培地への炭酸水素塩の添加により培地 pH が著しく上昇したために活性が低下したと考えられた。そこで、リン酸濃度を 10 倍にした BM 液体培地 (10×

BM) を用いて検討した。その結果、0.02% NaHCO₃の添加によりコントロール (炭酸水素塩の添加なし) と比較して両酵素活性の上昇が認められた (表 6)。

表6. 各種培地でのALDHおよびMNO活性^a

培地	ALDH比活性 (×10 ⁻³ units/mg · protein)			MNO比活性 (×10 ⁻³ units/mg · protein)		
	0	3	4.5	0	3	4.5 (hour)
BM	12.1	45.7	52.2	1.99	3.2	6.84
BM + 0.02% NaHCO ₃		40.7	48.3		2.08	6.61
10×BM	14.1		38.2	1.24		5.01
10×BM + 0.02% NaHCO ₃			47.2 ↑			6.19 ↑

^a: 2× LB液体培地で対数増殖期中期まで培養しBM液体培地で洗浄後、菌体懸濁液 (OD₆₆₀=5) 5 mlを試験管に入れ、30°Cにて振とう培養を行い、ALDHおよびMNO活性を経時的に測定した。

5 ホルムアルデヒド同化経路の解析

N9T-4 株における HPS および PHI の検索

以上のように、ホルムアルデヒド酸化に関わる2つの酵素は低栄養条件下で誘導されることが分かったが、これらのことからN9T-4株の細胞内でホルムアルデヒドが生成し、低栄養生育にはホルムアルデヒド固定が関与していることが示唆された。

Rhodococcus sp. RHA1株におけるゲノム解析の結果、メチロトローフ細菌の特徴的なホルムアルデヒド固定経路の一つであるRuMP経路の鍵酵素 (HPS および PHI) のホモログがオペロンを形成し存在していることが分かった (図 17) (31)。

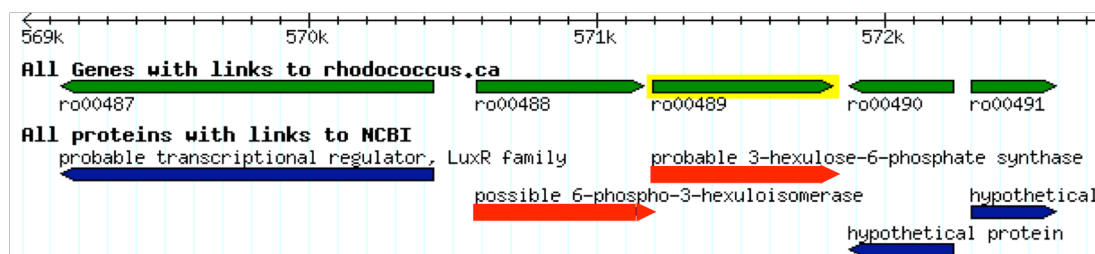


図17. *Rhodococcus*属RHA1株におけるリブローズモノリン酸 (RuMP) 経路関連遺伝子の周辺領域

Rhodococcus sp. RHA1株におけるphi-hps (RuMP) オペロンを示す。*Rhodococcus* Genome Project (<http://www.rhodococcus.ca/index.jsp>)を利用してゲノム解析を行った。緑の矢印はRHA1株のゲノムプロジェクトで同定されたORFを示し、hpsはro00489、phiはro00488と符番されている。青の矢印はそれぞれの遺伝子領域についてアノテーションされた結果を示す。

そこで、まず RHA1 株のゲノム配列をもとに各種プライマーを作製し、PCR により *hps* および *phi* の増幅を試みたが、目的の DNA 断片を得ることはできなかった。次に RHA1 株、*R. opacus*、*M. gastri* において DNA レベルで保存されている領域を基に設計したプライマー (*phi*F184mix→*hps*R572mix)、アミノ酸レベルで保存されている領域を基に設計した縮重プライマー (*phi*184deg→*hps*R426deg、*hps*R93nes)、さらにこれまでにその機能が報告されている種々の生物の *hps* および *phi* を参考にして設計したプライマー (*Phi*ConF_deg、*Hps*ConR_deg) を用いて様々な条件で PCR を行った。しかしながら、本実験の範囲では *hps* および *phi* 遺伝子を増幅することはできなかった。

そこで、N9T-4 株の無細部抽出液における HPS および PHI 活性の検出を試みた。その結果、低栄養生育特異的に HPS および PHI 活性（それぞれ、3.18 および 1.35 mU/mg•protein）を検出することができた。これらの結果から、N9T-4 株はホルムアルデヒド異化経路に加え RuPM 経路によるホルムアルデヒド同化経路も有しており、いずれも低栄養生育とリンクしていることが示唆された。

考察

N9T-4株の低栄養性生育時に2つのタンパク質(45 kDaおよび55 kDa)が強く誘導され、それぞれMNO、ホルムアルデヒドに作用するALDHと言ったメタノール代謝関連酵素と高い相同性を示した(ただし、ALDHの方はメチロトロフにみられる一般的なホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼとは相同性は示さない)。メタノールなどCO₂以外のC₁化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育可能なメチロトロフ細菌において、メタノールはメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)によりホルムアルデヒドに酸化される(32)。このホルムアルデヒドがメタノール代謝の分岐点であり、ホルムアルデヒドからギ酸を経てCO₂にまで酸化される異化経路とホルムアルデヒドがリブローズモノリン酸経路(RuMP経路)またはセリン経路により細胞構成成分として固定される同化経路に別れる(図18)(33)。

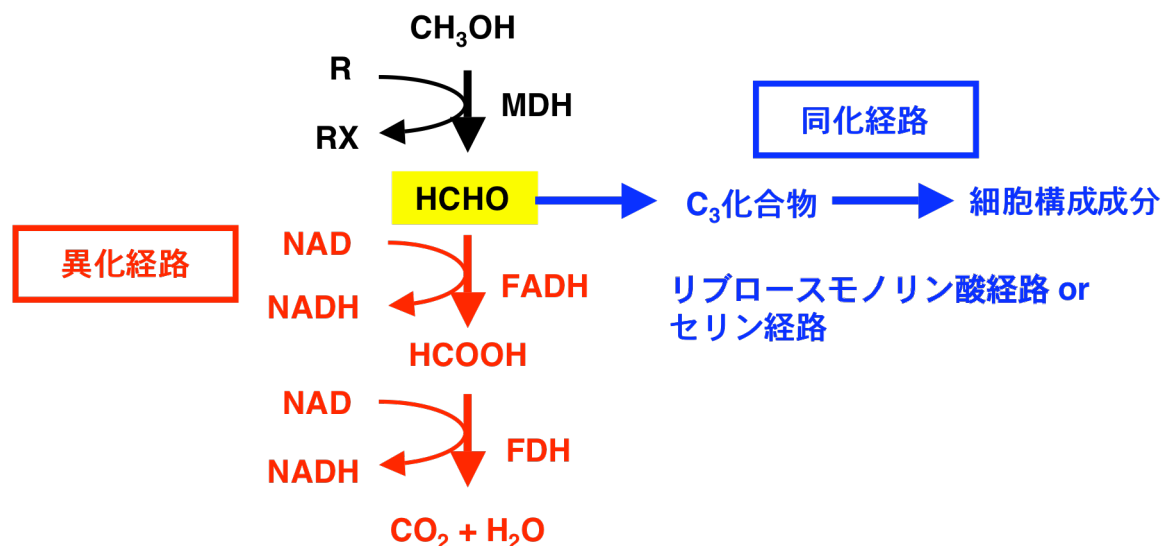


図18. メチロトロフ細菌における一般的なメタノール代謝

MDH: メタノールデヒドロゲナーゼ、FADH: ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、FDH: ギ酸デヒドロゲナーゼ
メタノールがMDHにより酸化されて生じるホルムアルデヒドが異化経路と同化経路の分岐点となる。
異化経路ではNAD依存性FADHによりギ酸に酸化され、さらにNAD依存性FDHによりCO₂と水にまで酸化される。
この2段階で生じる電子(NADH)とメタノールの酸化で得られる電子がメタノール代謝のエネルギー源となる。
一方、ホルムアルデヒド同化経路ではRuMP経路とセリン経路が知られており、この経路を介してホルムアルデヒドは細胞構成成分へと導かれる。

したがってN9T-4株にも上記のようにメタノール代謝系の存在が示唆されたが、メタノールを単一炭素源・エネルギー源として資化することはできない。しかしながら近年、非メチロトロフィックな細菌やアーキアにもホルムアルデヒド固定系が見いだされており(34、35)、様々な反応によって生じるホルムアルデヒドの毒性回避のために働くという考えもある(34)。またメタノール資化性菌においては、毒性の高いホルムアルデヒドを除去する卓越した様々な系の存在が知られている(33)。実際に本

研究によって N9T-4 株は強力なホルムアルデヒド除去活性を持ち、この活性を担う酵素タンパク質が上記 2 つの酵素であることも明らかにした。また、MNO のホルムアルデヒドに対する作用はホルムアルデヒドからメタノールへの還元と言った脱水素酵素の単なる逆反応ではなく、ホルムアルデヒドからメタノールとギ酸へと不均化される、いわゆるディスムターゼ反応であることが分かったが、実は MNO のディスムターゼ反応は古くから知られている (32)。グラム陽性メチロトローフ細菌の MNO は 1 サブユニットにつき 1 分子の NADP(H) を非共有結合で強固に結合しており、この NADP(H) がディスムターゼ反応に寄与することが分かっている (36)。本来遊離型補酵素として機能する NADP が酵素に結合していることは興味深い、他にはグラム陽性メチロトローフの *A. methanolica* や *R. erythropolis* DSM1069 のアルコール:NDMA オキシドレダクターゼはタンパク質内に非共有結合 NAD(H) を有しており、脂肪族アルコールに対し広い基質特異性を示すがメタノールには活性がない (37、38)。*Bacillus methanolicus* C1 の NAD 依存性メタノール脱水素酵素もまた非共有結合 NAD(H) を含有しており (36、39)、アクチベータータンパク質が還元された NADH コファクターの酸化を促進する (40)。しかしながら MNO を除いてこれらのニコチノタンパク質はホルムアルデヒドディスムターゼ活性を示さず、また N9T-4 株の 45 kDa のタンパク質との相同性も明らかに低かった。

MNO、ALDH 両酵素活性とも CO₂ (炭酸水素塩) により誘導され、ALDH 遺伝子破壊株は低栄養性を示さなくなったことは N9T-4 株の CO₂ 依存的低栄養生育を裏付けるものであるが、興味深いのは両酵素ともホルムアルデヒドに作用する酵素であるにも関わらず、MNO 活性は培地中のホルムアルデヒドによって誘導されるが、ALDH 活性は誘導されないことである。また、遺伝子発現については今後詳細な検討が必要であるが、酵素活性としては ALDH が誘導された後に MNO が誘導されるようであった。さらに ALDH 遺伝子破壊株においては、どのような培養条件においても ALDH ばかりでなく MNO 活性も検出することはできなかった。これらの結果から、N9T-4 株は低栄養生育時に細胞内にホルムアルデヒドを生成することが予想され、このホルムアルデヒドの生成に ALDH が関与し、生成したホルムアルデヒドの分解に MNO が関与することが考えられる。このように N9T-4 株においては、低栄養生育特異的、CO₂ 依存的にホルムアルデヒド酸化系が働くことが明らかとなった。

一方、ホルムアルデヒドの固定系を見ると、*hps* および *phi* 遺伝子が *Rhodococcus* sp. RHA1 株のゲノム中に存在していることから、*R. erythropolis* N9T-4 株においても RuMP 経路が機能していることが示唆された。実際に低栄養生育させた N9T-4 株から HPS および PHI 活性を検出でき、これらのことから低栄養生育時に生成されたホルムアルデヒドが RuMP 経路により固定されていることが示唆される。近年の様々な微生物のゲノムプロジェクトにより、*hps* および *phi* 遺伝子のオルソログが真性細菌やア

アーキアのゲノム中に広く分布していることが明らかになっている(41)。RuMP 経路の生理学的役割の一つはホルムアルデヒドの解毒であることが知られている。*Bacillus subtilis* はホルムアルデヒドを含む培地で培養した時のみ HPS および PHI を生成し、酵素反応を通してホルムアルデヒドを解毒する (34)。バニリン分解細菌 *Burkholderia cepacia* TM1 株の場合では、バニリンの *protocatechuic acid* への水酸化時にメトキシル基からホルムアルデヒドが遊離し、HPS および PHI が生成したホルムアルデヒドの解毒および同化に関与している (42)。近年、アーキアにおけるホルムアルデヒド固定経路の新規な生理的役割として逆回りの RuMP 経路が提唱されている。アーキアの RuMP 経路は不完全なペントースリン酸経路を補うために、HPS および PHI によるホルムアルデヒド固定の逆反応を経由したフルクトース 6-リン酸からのリブロース 5-リン酸の合成に関与している (35、43)。*R. erythropolis* N9T-4 株において、RuMP 経路による低栄養性生育時のホルムアルデヒド固定は RuMP 経路の生理的役割の解明の一端を担うものと考えられる。

以上の研究結果とこれまでの知見より、N9T-4 株の低栄養性生育における CO₂ 要求メカニズムを以下のように推定した (図 19)。

- (1) ALDH が関与している可能性がある未知の反応により、CO₂ からホルムアルデヒドが生成する。
- (2) ホルムアルデヒドは MNO の不均化反応により、毒性の低いメタノール、ギ酸へと一時的に変換される。
- (3) MNO の逆反応により、必要に応じてメタノールとギ酸からホルムアルデヒドが生成し、RuMP 経路により同化される。

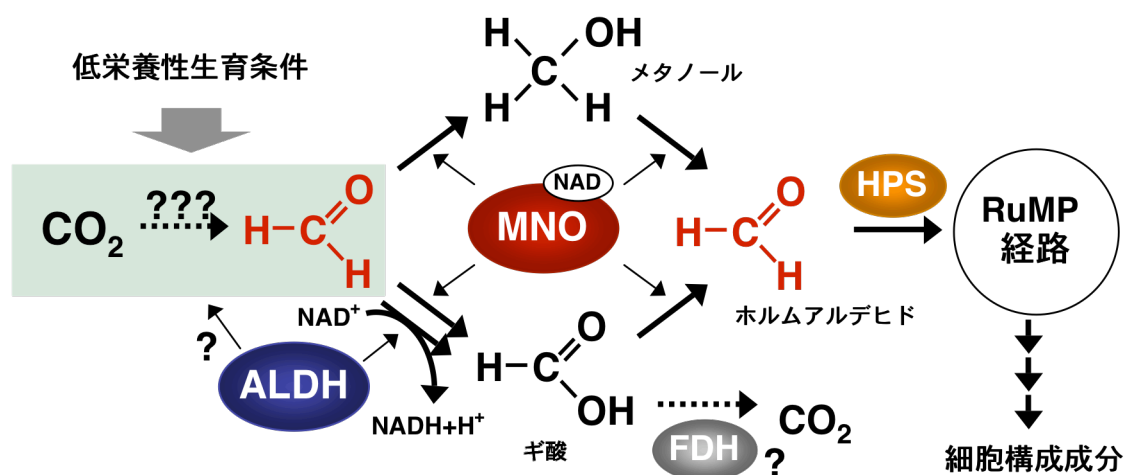


図19. 本研究の結果から推察されるN9T-4株のCO₂要求メカニズム

- (1) ALDHが関与している可能性がある未知の反応により、CO₂からHCHOが生成する。
 - (2) HCHOはMNOの不均化反応により、毒性の低いメタノール、ギ酸へと一時的に変換される。
 - (3) MNOの逆反応により、必要に応じてメタノールとギ酸からHCHOが生成し、RuMP経路により同化される。
- ALDH: アルデヒドデヒドロゲナーゼ、MNO: メタノール:NDMAオキシドレダクターゼ、
FDH: ギ酸デヒドロゲナーゼ、HPS: 3-ヘキシロース-6-リン酸シンターゼ

まとめと今後の課題

本研究では、低栄養性細菌についてこれまでとは異なる方法で単離・解析を進めた。本論文で中心となった *R. erythropolis* N9T-4 株を単離後しばらくは培養における特徴を把握することが困難であり、本菌の生育に合わせた実験系を構築しなければならなかったため苦労を要した。しかしながら、その結果これまでの微生物学の範疇にはない培養方法を構築することができ、今までに単離できなかった（見逃されていた）微生物の存在に気がついたと思っている。

第1章では備蓄原油からの低栄養性細菌のスクリーニングを行い、炭素源無添加の BM プレートで良好に生育する N9T-4 株を単離した。本菌は完全無機塩からなる BM シリカゲルプレートにおいても良好に生育し、これまでに報告のないユニークな CO₂ 要求性を示すことが明らかとなった。培養環境から CO₂ を除いて培養する方法はおそらく初めての試みであり、そのようなスクリーニング系を用いて N9T-4 株と同様な超低栄養生育を示す微生物は自然界に広く存在することも示すことができた。

第2章では N9T-4 株が低栄養性生育を示す時に強く誘導される2種の酵素(ALDH および MNO)を同定し、N9T-4 株の低栄養生育はメタノール代謝とリンクしている可能性を示した。酵素学的検討および遺伝学的解析により ALDH は低栄養生育に必須であることを明らかにし、ALDH および MNO は CO₂ によって誘導されることが示唆された。また N9T-4 株において低栄養生育時にホルムアルデヒドを固定する酵素活性を検出することもできた。

以上の結果から、N9T-4 株の低栄養生育における CO₂ の要求メカニズムを以下のように推定した。

1. ALDH が関与している可能性がある未知の反応により CO₂ からホルムアルデヒドが生じる。
2. ホルムアルデヒドは MNO の不均化反応により、毒性の低いメタノール、ギ酸へと一時的に変換される。
3. MNO の逆反応により、必要に応じてメタノールとギ酸からホルムアルデヒドが生成し、RuMP 経路により同化される。

上記推定経路の確証を得るためにはやはり CO₂ 依存的なホルムアルデヒドの検出が必要である。本研究の最後に炭酸水素塩を用いた ALDH および MNO の誘導系は、今後代謝産物のラベル実験を行うために構築したものであり、これが今後の課題となる。

環境中の CO₂ の削減は現代社会の至上命題のように報道され、各方面で様々な研究や取り組みがなされている。本研究はその命題に少しでも寄与するために、というよりはむしろ「微生物らしく」様々な炭化水素化合物の微生物変換反応に CO₂ を有効利用するための研究になると期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学バイオサイエンス研究科細胞機能学講座の高木 博史教授に深い感謝の意を表します。また、本研究の全般にわたって終始親切な御指導を賜りました本学バイオサイエンス研究科細胞機能学講座の吉田 信行助教に厚く御礼申し上げます。日頃より様々なご助言をくださいました本学バイオサイエンス研究科細胞機能学講座の桂樹 徹准教授、小野寺 慶子助教、大津 巖生助教にお礼申し上げます。

微生物の研究に携わる動機とその後の多大な御指導、御高配を賜りました京都学園大学バイオ環境学部微生物開発学研究室の谷 吉樹教授に深甚の感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、活性測定のための精製酵素 (HPS および PHI) を恵与してくださいました岡山理科大学理学部生物化学科応用微生物学研究室の三井 亮司講師、MS 解析にあたりご助力をいただきました本学バイオサイエンス研究科の塚本 潤子教務職員に厚く御礼申し上げます。

そして、本研究に際し、多大な助力と協力をいただきました増井 梓氏、吉野 有美氏、江上 裕史氏、および細胞機能学講座の皆様にお礼申し上げます。

最後に、これまで心身ともに支え続けてくれた両親に心から感謝の意を表します。

参考文献

1. **Kuznetsov, S. I. , G. A. Dubinina, G. A., and Lapteva, N. A.** 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**:377-387.
2. 服部 勉ほか:低濃度栄養条件下の微生物, 微生物の生態6, 微生物生態研究会編, 学会出版センター, p55-72.
3. 茂野 俊也ほか:低栄養性微生物の検索方法. 公開特許公報. (特開平 10-276764)
4. **Haas, C. N.** 1996. Accessing the risk posed by oocysts in drinking water. *J. American Water Works Assoc.* **88**:131-136.
5. 石油公団委託平成 11 年度備蓄原油の品質管理技術に関する調査・研究報告書、2000 年 3 月.
6. 石油公団委託平成 12 年度備蓄原油の品質管理技術に関する調査・研究報告書、200 年 3 月.
7. 石油公団委託平成 13 年度備蓄原油の品質管理技術に関する調査・研究報告書、2002 年 3 月.
8. **Yoshida, N. Yagi, K. Sato, D. Watanabe, N. Kuroishi, T. Nishimoto, K. Yanagida, A. Katsuragi, T. Kanagawa, T. Kurane, R., and Tani, Y.** 2005. Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:143-149.
9. 渡部 典子. 2001. Molecular analysis of bacterial community in Stored crude oils by 16S rRNA gene cloning. 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科修士論文.
10. **Funk, H. B. and Krulwoch, T. A.** 1964. Preparation of clear silica gels that can be streaked. *J. Bacteriol.* **88**:1200-1201.

11. **Atomi, H.** 2002. Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:497-505.
12. **Evans, M.C., Buchanan, B. B., and Arnon, D. I.** 1966. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **55**:928-934.
13. **Ishii, M., Chuakrut, S., Arai, H., and Igarashi, Y.** 2004. Occurrence, biochemistry and possible biotechnological application of the 3-hydroxypropionate cycle. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**:605-610.
14. **Wood, H. G., Ragsdale, S. W. and Pezacka, E.** 1986. The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **39**:345-362.
15. **Herter, S., Farfsing, J., Gad'On, N., Rieder, C., Eisenreich, W., Bacher, A., and Fuchs, G.,** 2001. Autotrophic CO₂ fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle. *J. Bacteriol.* **83**:4305-4316.
16. **Kraut, M., Hugendieck, I., Herwil, S., and Meyer, L. O.** 1989. Homology and distribution of CO dehydrogenase structural genes in carboxydophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* **152**:335-341.
17. **Ulrike, P., Andreas, P. R., Stefan, J., Markus, S. C., Hans-Peter, K., and Wagner, M.** 2000, Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368-5382.
18. **Hügler, M., Huber, H., Stetter, K. O., and Fuchs, G.** 2003. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota) *Arch. Microbiol.* **179**:160–173.
19. **Jahn, U., Huber, H., Eisenreich, W., Hügler, M., and Fuchs, G.** 2007. Insights into the autotrophic CO₂ fixation pathway of the archaeon *Ignicoccus hospitalis*: comprehensive analysis of the central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* **189**:4108-4119.

20. **Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W., and Fuchs, G.** 2007. A 3-Hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science* **318**:1782-1786.
21. **Meyer, C.** 1982. Chemical and spectral properties of carbon monoxide: methylene blue oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **257**:1333-1341.
22. **Zavarzin, G. A., and Nozhevnikova, A. N.** 1977. Aerobic carboxydobacteria. *Microb. Ecol.* **3**:305-326.
23. **Park, S. W., Song, T., Kim, S. Y., Kim, E., Oh, J. I., Eom, C. Y., Kim, Y. M.** 2007. Carbon monoxide dehydrogenase in mycobacteria possesses a nitric oxide dehydrogenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**:449-453.
24. **Watsuji, T. O., Kato, T., Ueda, K., and Beppu, T.** 2006. CO₂ supply induces the growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a syntrophic bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:753-756.
25. **Arfman, N., de Vries, K. J., Moezelaar, H. R., Attwood, M. M, Robinson, G. K., van Geel, M., and Dijkhuizen, L.** 1992. Environmental regulation of alcohol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains. *Arch. Microbiol.* **157**:272-278.
26. **Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H., and Tanaka, Y.** 2002. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Nucleic Acids Res.* **30**:E2.
27. **Nagy, I., Verheijen, S., De Schrijver, A., Van Damme, J., Proost, P., Schoofs, G., Vanderleyden, J., and De Mot, R.** 1995. Characterization of the *Rhodococcus* sp. NI86/21 gene encoding alcohol: *N,N'*-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase inducible by atrazine and thiocarbamate herbicides. *Arch. Microbiol.* **163**:439-446.
28. **Jaureguibeitia, A., Saá, L., Llama, M. J., and Serra, J. L.** 2007. Purification, characterization and cloning of aldehyde dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:1073-1086.

29. **Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., Van Ophem, P. W., Hektor, H. K., Dijkhuizen, L., and Duine, J. A.** 1993. Formaldehyde dismutase activities in gram-positive bacteria oxidizing methanol. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1979-1985.
30. **Nagy, I., Schoofs, G., Compennolle, F., Proost, P., Vanderleyden, J., and de Mot, R.** 1995. Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**:676-687.
31. **McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhr, M., Fernandez, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Eltis, L. D.** 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15582-15587.
32. **Rokem, J. S. and Goldberg, I.** 1991. Oxidation pathway in methylotrophs. *Biotechnology.* **18**:111-126.
33. 由里本 博也, 加藤 暢夫, 阪井 康能. 2005. 酵母, 細菌, アーキアの C1 化合物代謝. *バイオサイエンスとインダストリー* **63**:773-776.
34. **Yasueda, H., Kawahara, Y., and Sugimoto, S.** 1999. *Bacillus subtilis* *yckG* and *yckF* encode two key enzymes of the ribrose monophosphate pathway used by methylotrophs, and *yckH* is required for their expression. *J. Bacteriol.* **181**:7154-7160.
35. **Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y.** 2006. The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **188**:4698-4704.

36. **Bystrykh, L. V., Vonck, J., van Bruggen, E. F., van Beeumen, J., Samyn, B., Govorukhina, N. I., Arfman, N., Duine, J. A., and Dijkhuizen, L.** 1993. Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol: *N,N'*-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19. *J. Bacteriol.* **175**:1814-1822.
37. **Van Ophem, P. W., Van Beeumen, J., and Duine, J. A.** 1993. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica*. *J. Bacteriol.* **175**:1814-1822.
38. **Schenkels, P. and Duine, J. A.** 2000. Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of a broad spectrum of alcohols and the interconversion of alcohols and aldehydes. *Microbiology* **146**:775-785.
39. **de Vries, G. E., Arfman, N., Terpstra, P., and Dijkhuizen, L.** 1992. Cloning, expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* C1 methanol dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* **174**:5346-5353.
40. **Arfman, N., Hektor, H. J., Bystrykh, L. V., Govorukhina, N. I., Dijkhuizen, L., and Frank, J.** 1997. Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *Eur. J. Biochem.* **244**:426-433.
41. **Kato, N., Yurimoto, H., and Thauer, R. K.** 2006. The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:10-21.
42. **Mitsui, R., Kusano, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., and Tanaka, M.** 2003. Formaldehyde fixation contributes to detoxification for growth of a nonmethylotroph, *Burkholderia cepacia* TM1, on vanillic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6128-6132.

43. **Soderberg, T.** 2005. Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* **1**:347-352.