HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Proteomics on environmental response of Pseudomonas putida F1 in soil [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	森本, 一
Citation	北海道大学. 博士(環境科学) 乙第6908号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/55572
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Hajime_Morimoto_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏　名　　森本　一

審査委員　主査　　准教授　　笠原　康裕
　　副査　　教　授　　福井　学
　　副査　　教　授　　森川　正章
　　副査　　教　授　　岡部　聡（大学院工学研究院）

学 位 論 文 題 名

Proteomics on environmental response of *Pseudomonas putida* F1 in soil
（土壌における*Pseudomonas putida* F1の環境応答に関するプロテオーム解析）

近年、メタプロテオミクスにより、環境における微生物群集の遺伝子発現レベルにおける機能解析が行われてきているが、現状のメタプロテオミクスにおいて、複雑な複合系の中で特定個体の個生態を理解することは困難である。また、土壌環境で微生物がどのような遺伝子を発現し生存しているのかを研究した例は極めて少ない。申請者は、土壌環境における特定の微生物に着目し、プロテオーム解析から（１）土壌中に生息する細菌の代謝・生理状態を知ること、（２）遺伝子の発現動態を知ることで細菌を取り巻く微小環境を推測することを目的として、土壌内における細菌の環境応答について研究を行った。

第１章では、液体培地で培養した土壌細菌*Pseudomonas putida* F1株の芳香族炭化水素分解に関与するタンパク質群をプロテオーム解析により明らかにした。F1株は芳香族炭化水素を分解でき、トルエン、エチルベンゼン、ベンゼンの分解に関与するタンパク質を決定するために、これら芳香族炭化水素を唯一の炭素源として添加した液体培地で培養したF1株から細胞内タンパク質について、1-D SDS-PAGEとLC-MS/MSを用いて同定した。ゲノムワイドで定量的な解析法を確立するために、ラベルフリーなemPAIに基づいた半定量的なプロテオーム解析アプローチを用いた。各種培養系においてF1株のトルエン、エチルベンゼン、ベンゼンの分解に関与するトルエン分解経路(tod)、エチルベンゼンの分解の2-methylcitrate cycle、ベンゼン分解のβ-ketoadipate pathwayに関与する全ての酵素タンパク質を同定した。さらに、todオペロンの発現を制御する二成分制御系やtodオペロンの下流に位置するsolvent efflux pumpsも同定した。これより、ゲノムワイドで半定量法による解析法の確立と、F1株の芳香族炭化水素分解関与遺伝子を全て明らかにした。

第２章では、土壌内において、F1株の芳香族炭化水素の添加に対する応答を解析した。実際の土壌環境におけるF1株の芳香族炭化水素に対する応答を解析し、実験室内で得られた知見が実際の環境において反映されているのかを明らかにすることを試みた。土壌環境中におけるF1株の芳香族炭化水素分解関与タンパク質の発現変化を解析するため、グルコースを添加した園芸用土壌にF1株を接種し3日間の培養を行った後、その培養土壌に芳香族炭化水素（トルエン、エチルベンゼン、ベンゼン）をそれぞれ添加し、培養を継続した。土壌培養し

たF1株から密度勾配遠心分離法（ニコデンツ）を用いて土壌から細胞を分画した後、その細胞分画からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法 (2-DE) および一次元電気泳動法 (1-D SDS-PAGE) による分離と質量分析計 (nanoLC-MS/MS) および Mascot検索を用いたタンパク質同定を行った。2-DE/LC-MS/MS解析は、トルエン、ベンゼン、エチルベンゼンを添加した土壌で培養したF1株から、それら芳香族炭化水素の分解に主要な22タンパク質のうち、12のタンパク質を検出できた。エチルベンゼンを添加した土壌の1-D SDS-PAGE/LC-MS/MS解析では、約1260のF1株タンパク質を同定した。エチルベンゼン分解に関与する全ての主要酵素タンパク質、トランスポーターおよびセンサータンパク質は、液体培養と同様に高発現した。これより、F1株の土壌環境中における芳香族炭化水素の分解様式は、実験室内で得られた結果と同様であることを示した。従って、F1株の芳香族化合物の分解は、実験室内で得られた知見を実際の環境で反映していることを明らかにした。解析アプローチは、土壌内でのF1株の環境変化に対する応答をタンパク質レベルで解析できたことから、土壌に生息する微生物の理解に貢献できる可能性を示した。

土壌内におけるF1株の芳香族分解関連タンパク質発現を全て検出できたことを踏まえ、第３章では複雑な土壌環境でのF1株の環境応答として土壌環境でのみ特異的に発現する遺伝子の解析に着目した。加えてこれまで明らかにされた細菌のゲノム解析において多くの機能未知遺伝子が存在するが、これらの機能未知遺伝子の中には、細菌が生来生息する環境で発現・機能する遺伝子が存在すると考えた。申請者は、F1株の土壌培養系と液体培養系に対して、比較プロテオーム解析を行い、土壌環境特異的な発現タンパク質の検出および解析を行った。F1株は、0.5%グルコース添加土壌（大豆畑、コーン畑、森林）に接種し、3日間、30℃で培養した。土壌内のF1株からのタンパク質抽出は、密度勾配遠心分離法とSDS-フェノール法を用いて行った。抽出タンパク質はSDS-PAGE後、同定した。プロテオーム解析により、大豆、コーンおよび森林土壌において、それぞれ1364、1273、816タンパク質を同定した。比較解析より、土壌特異的に発現する2つの遺伝子および1オペロンを特定した。それらには、一酸化窒素ジオキシゲナーゼ遺伝子が含まれていた。一方のオペロンは、二成分制御遺伝子を含む7つの遺伝子で構成された機能未知のオペロンであった。このオペロンの相同性解析より、プロテオバクテリア門にのみ保存されていた。また、オペロンの発現因子について、土壌の生物学的・物理的・化学的側面から検討を行った結果、土壌成分がその発現に関与していることが推測された。

以上の研究より、土壌内でF1株の芳香族炭化水素に対する応答をタンパク質レベルで検出することができ、また、土壌という環境要因によるF1株の土壌特異的発現タンパク質を特定することができた。確立した研究手法より、土壌に生息する細菌の発現タンパク質を詳細に解析することができ、試験管内での生理状態とは異なった環境現場での生理学的・遺伝学的な環境応答を理解することが可能となった。他の微生物種についてのそれぞれの生息環境における個生態学やライフスタイルの理解を深めることが期待される。

審査委員一同は，これらの成果を高く評価し，また研究者として誠実かつ熱心であり，大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ，申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。