

第 13 回  
助 成 研 究 報 告 会

日 時 : 2019年6月7日 (金) 13 : 00~17 : 00

場 所 : 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)  
5 階 山村雄一記念ライフホール



公益財団法人 発酵研究所



# プログラム

開会挨拶 公益財団法人発酵研究所理事長 (13:00~13:05)

事務局からの連絡 (13:05~13:10)

平成29年度大型研究助成<口頭発表> (13:10~14:50)

- O-1 糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明  
西澤 智康 (茨城大学農学部)  
座長: 左子 芳彦 (京都大学名誉教授)
- O-2 超高発酵菌体外多糖産生、新規乳酸菌の探索と次世代シンバイオティック機能性評価  
木村 郁夫 (東京農工大学大学院農学研究院)  
座長: 西山 真 (東京大学生物生産工学研究センター教授)
- O-3 魚類体表微生物叢の網羅的解析と感染予防効果の検討: 抗生物質を代替する養殖魚類表皮版プロバイオティクスの確立を目指して  
堀 克敏 (名古屋大学大学院工学研究科)  
座長: 西山 真 (東京大学生物生産工学研究センター教授)
- O-4 酸素発生型光合成により駆動する嫌気発酵プロセス  
得平 茂樹 (首都大学東京大学院理工学研究科)  
座長: 福田 雅夫 (中部大学応用生物学部教授)

休憩 (14:50~15:10)

平成25年度寄付講座助成<口頭発表> (15:10~15:55)

- O-5 腸内シンビオシスの分子機序解明とその高度応用展開  
栗原 新 (石川県立大学腸内細菌共生機構学寄付講座)  
座長: 永井 和夫 (東京工業大学名誉教授)

休憩・移動 (16:00~16:10)

平成29年度一般研究助成、平成28年度若手研究者助成\* (ポスター発表) (16:10~17:00)

- P-1 ナス科植物病原性アルタナリア属菌の分類及び特性評価  
染谷 信孝 (農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門)
- P-2 冬虫夏草がセミ共生真菌に進化した遺伝的基盤と生物機能の解明-寄生菌から共生菌への進化  
松浦 優 (琉球大学熱帯生物圏研究センター)
- P-3 土壌環境をモデルにした培養基による難培養放線菌の分離法の開発と微生物資源の獲得  
松本 厚子 (北里大学北里生命科学研究所)

- P-4 菌根を分離源とした菌根性きのこの遺伝資源拡充：分離源菌根の形態学的特徴の解明と分離手法の改良  
遠藤 直樹（鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター）
- P-5 地下深部油ガス田におけるメタン生成機構の解明ー共生培養法によるリグニン関連物質分解微生物の網羅的分離培養  
持丸 華子（産業技術総合研究所地圏資源環境研究部門）
- P-6 日本産*Alternaria*属菌群および*Cercospora*菌群の分類学的研究  
中島 千晴（三重大学大学院生物資源学研究科）
- P-7 昭和期に記載された稀産シクエストレート菌の実体解明と保全対策の再検討  
折原 貴道（神奈川県立生命の星・地球博物館学芸部）
- P-8 雪氷環境における好冷性微細藻類とその共生細菌同定、ゲノム解析及び代謝機構の解明  
寺島 美亜（北海道大学低温科学研究所）
- P-9 河川水の自由生活性アメーバ内の非結核性抗酸菌を分離して共生関係の実態を解明する  
西内由紀子（大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所）
- P-10 外来雑草エゾノギシギシを摂食するコガタリハムシの腸内シュウ酸分解細菌の共生機能の解明  
大坪和香子（東北大学大学院農学研究科）
- P-11 酸化還元電位制御下でのコロニー形成「固相電気培養装置：SPECIES」で拓く培養可能微生物圏のフロンティア  
木村善一郎（呉工業高等専門学校環境都市工学分野）
- P-12 藍建て発酵に関与するインジゴ還元酵素の機能と構造解析並びに染色への応用  
米田 一成（東海大学農学部）
- P-13 がん幹細胞選択的な細胞毒性を示す植物成分の微生物生産に向けた研究  
關 光（大阪大学大学院工学研究科）
- P-14 高変異性好熱菌を利用した耐熱化変異酵素のハイスループット創出  
鈴木 宏和（鳥取大学大学院工学研究科）
- P-15 クオラムセンシングフェロモンを介した腸内細菌とヒトのクロストーク  
岡田 正弘（東京大学大学院薬学系研究科、現 神奈川大学工学部）
- P-16 基質多様性を有するアデニル化酵素の探索とD-アミノ酸ジペプチド生産法の開発  
木野 邦器（早稲田大学理工学術院先進理工学部）
- P-17 メディエータレス酵素機能電極用素子を志向した直接電子移動型色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析  
里村 武範（福井大学学術研究院工学系部門）
- P-18 酵母におけるS-アデノシルメチオニンの生理機能に関する研究  
水沼 正樹（広島大学大学院統合生命科学研究科）
- P-19 細菌の休眠および覚醒の分子機構の解明  
山口 良弘（大阪市立大学複合先端研究機構）

- P-20 腸内細菌によるビフィズス菌のFim線毛のポリマー化誘導因子の探索とその機構解明  
西山 啓太 (北里大学薬学部、現 慶應義塾大学医学部)
- P-21 アルキルアルコールを配糖化する微生物由来の新規配糖化酵素反応の開発  
上田 誠 (小山工業高等専門学校物質工学科)
- P-22 「バイオ還元システム」利用拡大のための補酵素再生系グルコース脱水素酵素の進化工学的改変  
片岡 道彦 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)
- P-23 大腸菌エネルギー代謝における解糖系と好気TCA経路の使い分け・相互変換スイッチング機構の解明  
田中 寛 (東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所)
- P-24 微生物由来ピペリン代謝酵素に関する研究  
小林 達彦 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)
- P-25 PET分解酵素のstructure-based designによる高機能化と応用に関する研究  
織田 昌幸 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
- P-26 藻類のミルクング培養法による省エネ型バイオ燃料生産プロセスの開発  
大田 昌樹 (東北大学大学院工学研究科附属超臨界溶媒工学研究センター)
- P-27 1,3-ジオール骨格化合物の発酵生産に向けたプラットフォーム経路の構築：再生可能資源からのロケットプロペラント前駆体生産への挑戦  
片岡 尚也 (山口大学大学院創成科学研究科)
- P-28 電気化学的制御によるセルロースナノファイバーの高効率合成  
椎木 弘 (大阪府立大学大学院工学研究科)
- P-29 サンゴ共生藻における宿主非依存的な光合成産物の分泌に関わる環境応答シグナル経路  
丸山真一郎 (東北大学大学院生命科学研究科)
- P-30 嫌気環境での高効率キシロース発酵に向けた*Spathaspora*属酵母のキシロース代謝遺伝子群の機能解析  
笹野 佑 (大阪大学大学院工学研究科、現 崇城大学生物生命学部)
- P-31 嫌気的環境汚染物質分解菌の遺伝子導入・破壊系の開発  
野尻 秀昭 (東京大学生物生産工学研究センター)
- P-32 嫌気性バルキング原因菌の微生物機能情報の解明と高速メタン発酵リアクターのバルキングメカニズムの理解  
山田 剛史 (豊橋技術科学大学大学院工学研究科)
- P-33 鉄還元菌の多環芳香族炭化水素嫌気性分解代謝系の解明  
井上 謙吾 (宮崎大学農学部)
- P-34 陸生カニ消化管より得られた微生物コンソーシアのセルロース・リグニン分解機序の解明とメタン発酵前処理への応用  
馬場 保徳 (石川県立大学生物資源工学研究所)

P-35 子実体を形成しない祖先的きのこ類の未知系統探索と大規模系統推定から繙く木材腐朽性担子菌類の進化史

白水 貴\* (国立科学博物館植物研究部、現 三重大学大学院生物資源学研究科)

懇親会 (17:00~19:00)



## 要旨(大型研究助成)





## 糸状菌-内生細菌の微生物間相互作用現象の解明

西澤 智康 (茨城大学農学部)

### [背景・目的]

土壌に生息するクサレケカビ属の糸状菌 *Mortierella elongata* 分離株の菌糸細胞に内生する細菌を見出した。内生細菌のドラフトゲノム情報からシステイン輸送系が欠失していることを見出し、システイン要求性を満たすことで新属・新種の内生細菌 *Mycoavidus cysteinexigens* (B1-EB<sup>T</sup> 株) を分離培養することに成功した。これまでの研究で、ある種の糸状菌には細菌が内生し、その生態的特性によって異なる内生細菌を保有している可能性が示唆された。本研究では、糸状菌と細菌の共生体であるという新たな生物共生系の存在を示すモデル糸状菌-内生細菌コレクションの拡大と培養可能な有用内生細菌の探索を行い、内生細菌が糸状菌に付与する生態的特性を明らかにする。

### [方 法]

土壌や植物根部から内生細菌を保有する菌類の分離を行い、Live/Dead 染色キットを用いて内生細菌を顕微鏡観察した。分離菌株は、糸状菌 ITS 領域で同定し、内生細菌は 16S rRNA 遺伝子領域で分子系統解析した。また、新たに分離された内生細菌をゲノム解読して *M. elongata* の内生細菌 *M. cysteinexigens* B1-EB<sup>T</sup> 株と比較ゲノム解析した。

### [結果・考察]

本研究では、計 305 菌株の *Mortierella* 属菌を分離し、そのうち 66 菌株に *Burkholderiaceae* 科に属する内生細菌を検出した。寄託済み 1 菌株を除く内生細菌保有 *Mortierella* 属菌株を新たにカルチャーコレクションに寄託した。検出された内生細菌の 16S rRNA 遺伝子領域に基づく分子系統解析から、内生細菌は、*Glomeribacter-Mycoavidus* クレードに位置し、3 つのサブクレードを形成することが明らかになった。森林土壌から分離した *M. parvispora* 株から *Mycoavidus* 属の新種内生細菌 B2-EB 株を分離培養し、完全ゲノム解読した。比較ゲノム解析から、B2-EB 株のゲノムは可動遺伝因子が少なく、システイン輸送系の欠失だけでなく有機質代謝や転写・RNA プロセッシング制御およびシグナル伝達などに関わる遺伝子が脱落していることが見出された。内生細菌 B2-EB 株のゲノム解析から環境適応能の低下が示唆され、宿主糸状菌への依存が高まったと推察した。

## 超高発酵菌体外多糖産生、新規乳酸菌の探索と次世代シンバイオティック機能性評価

木村 郁夫（東京農工大学大学院農学研究院）

### [背景・目的]

食と腸内環境に基づいた生活習慣病予防・治療戦略として、腸内細菌の宿主への有用効果の源を腸内細菌発酵産物、短鎖脂肪酸と捉え、その増幅による機能性発現を狙う。従来の食物繊維－プレバイオティックスの概念を一新し、菌体外多糖（Exopolysaccharide：EPS）－プレバイオティックスに着目することにより、新規 EPS 産生腸内細菌群の探索を行う。そして、単一菌によるプロバイオティックスとプレバイオティックスの両方の効果を併せ持つ次世代シンバイオティックスという新たな概念の定着と、新規機能性食品素材分野として世に普及させることを目指す。

### [方 法]

ヒト由来腸内細菌群から高効率 EPS 産生菌の単離・同定を行う。更に中規模培養によりそれらの菌株からそれぞれの EPS の精製を行い、精製した EPS をマウス経口投与により、短鎖脂肪酸産生量や、肥満誘導マウスへの投与における代謝機能改善作用について検討を行う。

### [結果・考察]

EPS 産生量を指標に 10 種以上のリード EPS 産生菌の選抜が出来た。うち、3 種以上に関して、EPS の精製を行い、マウスへの投与実験から腸管内での短鎖脂肪酸の高産生が確認できた。また、これら EPS の資化腸内細菌の同定も完了し、EPS 産生菌と EPS 資化菌のノトバイオオート実験から、高糖質食負荷による EPS 産生→短鎖脂肪酸産生→代謝機能改善作用の確認もできた。さらには、実際にマウス実験において、EPS 投与による代謝機能の改善効果も確認できたことから、現在、うち 1 種類に関してはヒト試験への移行の準備を進めている。本研究課題により、数種類のシード EPS 産生菌の抽出ができたので、今後、研究の規模をさらに拡大し、大規模培養の確立・臨床応用に向けて、更なる研究展開が必要である。

## 魚類体表微生物叢の網羅的解析と感染予防効果の検討： 抗生物質を代替する養殖魚類表皮版プロバイオティクスの確立を目指して

堀 克敏（名古屋大学大学院工学研究科）

### [背景・目的]

水産養殖の生産性の向上のために魚病対策の重要性が増している。本研究では適応範囲が広く簡便な魚病対策の新手法として「魚類表皮版プロバイオティクス」を掲げ、その実現可能性を探ることを目的とした。

### [方 法]

ゼブラフィッシュをモデル魚類とし、抗生物質の投与や、温度変化と傷によるストレスを与えた後、病原菌(*Yersinia ruckeri*)に6時間暴露し、感染が進行するか観察した。また、その際の細菌叢の変化を、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析によって調べた。

### [結果・考察]

病原菌をゼブラフィッシュの表皮から感染させるために飼育水温を 20℃に下げてストレスを与えた。その後、病原菌に一定時間暴露したが、へい死する個体は観察されなかった。次に感染経路として表皮に傷をつけ、各水温で病原菌に暴露した。その結果、低温と傷の両方のストレスを与えた後、病原菌に暴露した個体のみへい死した。へい死個体と生存個体の表皮細菌叢を比較したところ、へい死個体の表皮細菌叢は病原菌に占有されていることが明らかとなった。このことから、病原菌が表皮に付着し、感染したことが示唆された。病原菌の表皮占有と表皮細菌叢の関係を調べるため、20℃で抗生物質処理により表皮細菌叢を破壊した個体に病原菌を暴露した。これらの処理や病原菌の暴露により実験グループの魚はへい死しなかったが、表皮細菌叢は病原菌に占有されていた。この結果は、ゼブラフィッシュ表皮細菌叢が病原菌の表皮への付着を防いでいること、抗生物質処理同様に、魚に与えたストレスにより表皮細菌叢が影響を受けることを示唆していた。次に *Y. ruckeri* に自然感染することが知られているニジマスとゼブラフィッシュの表皮細菌叢を比較したところ、ゼブラフィッシュ表皮細菌叢ではシュードモナス属、アシネトバクター属およびスフィンゴバクテリウム目の細菌が主であったのに対し、ニジマスではオキサロバクター科、スフィンゴモナス目、デイノコッカス属に代表される細菌群が主であり、表皮細菌叢の構成が大きく異なっていた。

## 酸素発生型光合成により駆動する嫌気発酵プロセス

得平 茂樹 (首都大学東京大学院理工学研究科)

### [背景・目的]

酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアを利用した CO<sub>2</sub> からの有用物質生産は、化石燃料に依存しない持続可能な社会システムの構築に大きく貢献すると期待されている。これまでに新たな代謝経路を導入することで、様々な有用物質を生産するシアノバクテリアが作り出されてきた。しかし、導入した酵素が光合成の副産物として生成される酸素により失活してしまい、期待通りの生産性を示さないことが多い。光合成と切り離すことができない酸素による生産阻害を受けない新たな物質生産系の開発が求められている。

### [方法]

光合成を行う栄養細胞が数百個一列につながる多細胞性シアノバクテリア *Anabaena* は、ヘテロシストと呼ばれる分化細胞をおよそ 10 細胞ごとに一個の割合で形成する。ヘテロシストは窒素固定に特殊化した細胞であり、酸素に極めて弱い窒素固定酵素ニトロゲナーゼを酸素から保護するために、細胞内環境が嫌氣的に維持されている。本研究では、ヘテロシストを物質生産細胞として利用することで、光合成を行いながら同時に嫌気発酵により有用物質を生産することができるシアノバクテリアを創り出す。

### [結果・考察]

ブタノールはエタノールよりも優れたバイオ燃料として期待されている。ブタノールは *Clostridium acetobutylicum* などの嫌気性細菌により合成され、その合成には複数の酸素感受性酵素が含まれる。我々はヘテロシスト特異的なプロモーターを利用して、*C. acetobutylicum* のブタノール合成経路を構成する 7 個の遺伝子をヘテロシストにおいて発現する株を構築した。そしてその株を用いて、光合成条件下でブタノールを生産させることに成功した。本研究により、ヘテロシストを物質生産細胞として利用することで、酸素発生型光合成と嫌気発酵という相反する反応を同時に行わせることができることが示された。ヘテロシストによる物質生産においては、シアノバクテリアではこれまで利用することができなかった酸素感受性酵素を利用した物質生産が可能となり、シアノバクテリアによる CO<sub>2</sub> からの有用物質生産の可能性が飛躍的に広がると期待できる。



## 要旨(寄付講座助成)



## 腸内シンビオシスの分子機序解明とその高度応用展開

栗原 新 (石川県立大学腸内細菌共生機構学寄付講座)

### [背景・目的]

本寄附講座は、宿主または腸内細菌が産生する低分子化合物で、分類学上の界を越えてお互いの生理機能に影響を与える因子を「シンビオジェニック因子」と定義し、この定義にあてはまる化合物を軸として宿主と腸内細菌の共生関係を明らかにすることを目的として設立された。本講演では、腸内細菌からヒトへと受け渡されるシンビオジェニック因子であるポリアミンおよびその候補物質であるフェネチルアミン、ヒトから腸内細菌に受け渡されるシンビオジェニック因子であるヒト母乳オリゴ糖、新規なシンビオジェニック因子の同定やそれを介した共生機構を解明するのに有用な培養装置の開発についての研究成果を報告する。

### [結果・考察]

#### 1. ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養系の開発

ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち入手可能な 45 種について作成の容易な GAM 培地を用いて 32 種が生育可能であることを示し、これらの菌種を 96 穴マイクロプレート上で一斉に培養可能なハイスループット培養系を開発した。

#### 2. フェネチルアミン

前項のハイスループット培養系における培養上清を解析したところ、GAM 培地で培養可能なヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種のうち 5 菌種が細胞外に著量のフェネチルアミンを産生することを見出した。これらの菌種の中から *Enterococcus faecalis* について遺伝子破壊株および遺伝子相補株を作成し、フェネチルアミン産生が芳香族アミノ酸脱炭酸酵素をコードする *aadc* に依存することを示した。次に、*E. faecalis* の *aadc* 破壊株、*aadc* 相補株を定着させたマウスでは、大腸組織中のセロトニン量に有意な差が認められた。末梢セロトニンは骨形成や蠕動運動を制御することから、これらの生理機能を腸内細菌の酵素が制御している可能性が考えられた。

#### 3. ポリアミン

ポリアミンは、動脈硬化等の心血管系疾患の予防作用や炎症抑制やオートファジー誘導を介した寿命延伸作用が明らかになったことから、近年注目が集まっている物質であり、腸内常在菌からヒトへ受け渡されるシンビオジェニック因子である。前述のヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種を GAM 培地で培養し、ポリアミン産生能について解析を行ったところ、ゲノム情報を用いた *in silico* のアノテーション結果と矛盾する解析結果が得られ

たことから、ヒト腸内常在菌叢最優勢種にはポリアミンの未知合成・輸送系が多く存在することが示唆された。また、*E. faecalis* と大腸菌を混合して培養することで、腸内ポリアミンが複数の腸内細菌の代謝経路を経由して生合成され、その生合成経路はビフィズス菌等が産生する酸により作動することを明らかとした。

#### 4. ヒト母乳オリゴ糖

乳児期の腸内細菌叢は成長後も宿主の健康に影響を及ぼすことが明らかとなってきている。母乳栄養児の腸管ではビフィズス菌が優勢な細菌叢が形成されるが、この機構にはビフィズス菌が有するヒト母乳オリゴ糖利用経路（ヒト母乳オリゴ糖代謝関連遺伝子）が重要な役割を果たしていることを、乳児糞便の遺伝子解析やオリゴ糖解析によって明らかとした。また、*B. bifidum* や一部の *B. longum* が有する細胞表層グリコシダーゼによって菌体外で分解された母乳オリゴ糖分解物が、他のビフィズス菌種の生育を促進するという、「菌種間クロスフィーディング機構」を明らかとした。さらに、複数のヒト母乳オリゴ糖トランスポーターを新たに同定し、これらのヒト母乳オリゴ糖取込み能がホモログ（バリエーション）間で異なること、その違いには特定の数アミノ酸残基が関与していることを明らかにした。取込み能が高いバリエーションは母乳栄養児の腸内で多く存在していたことから、トランスポーターのヒト母乳オリゴ糖への適応進化がビフィズスフローラ形成の鍵となっていることが強く示唆された。

#### 5. ヒト母乳オリゴ糖ラクト-N-テトラオースの酵素合成法の開発

ラクト-N-テトラオースは、ヒト母乳オリゴ糖の中で最も含有量の高いコア構造であり、これまでに単離された乳児型ビフィズス菌のすべての株が資化可能である。本オリゴ糖を調製乳へ添加することを最終目標として、その酵素合成法の開発に取り組んだ。その結果、ガラクト-N-ビオース / ラクト-N-ビオースホスホリラーゼの活性ポケットに欠失挿入アミノ酸置換を導入することで、ラクト-N-トリオースとガラクトース 1-リン酸からラクト-N-テトラオースの合成が可能となった。なおこの際、反応平衡を制御することで、添加したラクト-N-トリオース全量を変換させることが出来た。

#### 6. 嫌気性腸内細菌と培養細胞の共培養システムの開発

腸管内において、腸内常在菌は嫌気的環境で生育する一方で、宿主の上皮細胞には血流を介して酸素が供給されている。このような腸内環境を模した培養装置の開発に取り組んだ結果、単層化した腸管上皮細胞株と偏性嫌気性細菌を共培養することに成功した。興味深いことに、上皮細胞の頂端膜側においては、上皮細胞がない条件で培養した場合に比べて、腸内細菌の著しい増殖促進が観察された。本装置は、腸内細菌と宿主の共生を *in vitro* で解析可能とするのみならず、食品素材や医薬品の腸内動態を解析する上で有用なツールとなる可能性が示唆された。





## 要旨(一般研究助成)



## ナス科植物病原性アルタナリア属菌の分類および特性評価

染谷 信孝（農業・食品産業技術総合研究機構野菜花き研究部門）

ジャガイモの重要病害は疫病、次いで *Alternaria solani* による夏疫病があげられる。現在、疫病抵抗性品種の育成は進められているが、夏疫病抵抗性品種育成は進んでいない。そのため、疫病抵抗性品種が普及して殺菌剤使用を低減した場合、夏疫病被害が増大する可能性がある。本課題では、ジャガイモ夏疫病発生圃場および周辺のナス科植物における夏疫病様病徴から病原糸状菌を単離、同定することを試みた。

ジャガイモ、ミニトマト、ハリナスビ、イヌホオズキ、テリミノイヌホオズキ、ケイヌホオズキの病葉から、各 50 菌株、計 300 株を分離した結果、約 3 分の 2 が *Alternaria* 属菌であり、ITS 領域配列から大きく二つにクラスタ分けされた。一方は小型分生子、もう一方は大型分生子を形成することが特徴であった。病原性の強い大型分生子形成クラスタ菌株について代表株の GAPDH、Alt1a、TEF1 および RPB2 配列を決定した結果、ジャガイモおよびハリナスビ分離株が同一クレードに位置した。また、ジャガイモ 88 品種の夏疫病抵抗性を調査した結果、夏疫病に対して抵抗性が低い疫病抵抗性品種が確認された。

冬虫夏草がセミ共生真菌に進化した遺伝的基盤と生物機能の解明  
— 寄生菌から共生菌への進化

松浦 優（琉球大学熱帯生物圏研究センター）

昆虫の多くは共生微生物を体内に保持することによってさまざまな代謝機能を獲得しており、セミ類も例外ではない。先行研究によると、セミ類は必須アミノ酸を合成するサルシアとホジキニアという 2 種の共生細菌に依存し、貧栄養な植物導管液に適応している。ところが、ホジキニアのゲノムは長い共生の結果、極度に断片化していつ途絶えてもおかしくないと言われており、宿主の存続も非常に危うい。そこで本研究ではセミの共生系の進化の謎に迫るため、まず日本産セミ 24 種の共生微生物の感染やゲノムを網羅的に調査した。結果、サルシアは全種に維持され、その代謝機能は高度に保存されていたが、ホジキニアは 15 種のセミに存在しなかった。ところが、これらのセミの体内を詳細に観察すると大量の酵母状の真菌を発見した。厳密な系統解析の結果、未知の真菌はセミ寄生性の冬虫夏草セミタケ類に由来する新種の共生真菌であることが判明し、セミ科全体でホジキニアは共生真菌と 3 回以上置き換わったと推定された。最後に、単離培養した共生真菌株とセミタケ類のゲノム比較解析による代謝機能・病原性の喪失にふれ、冬虫夏草が共生真菌へと進化した遺伝的背景を考察したい。

## 土壤環境をモデルとした培養基による難培養放線菌の分離法の開発と微生物資源の獲得

松本 厚子（北里大学北里生命科学研究所）

土壤から定法により優占種放線菌 22 株を分離し、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析から全て *Streptomyces* sp. と同定した。一方、用いた土壤をメタゲノム解析し細菌叢を調査した結果、放線菌 (*Actinomycetales* 目) の中に占める *Streptomyces* 属の割合は 5% ほどに過ぎないことがわかった。そこで、分離できていない難培養放線菌の分離を目的に、優占種放線菌との共培養による難培養放線菌の分離法の開発を試みた。

先に分離した優占種 22 株を水寒天に加え固化し下層培地を作製した。その上にメンブレンフィルター (Ø 0.45 µm) を置き、底面に穴を開けたガラスシャーレを重ねた。これを培養基として分離培地と土壤希釈液を入れ、27°C で培養し、放線菌 51 株 (*Streptomyces* 属 20 種、希少放線菌 3 属 5 種) を分離した。同時に下層に水寒天のみを加えて 30 株 (*Streptomyces* 属 19 種、希少放線菌 1 属 2 種) を分離し比較したところ、*Streptomyces* 属 13 種、希少放線菌 3 属 5 種が優占種株との共培養でのみ分離されていることがわかった。さらに、共培養分離株 KV-967 は *Jiangella* 属と近縁であるものの 16S rRNA 遺伝子の相同性が低く、新規放線菌と考えられることから、現在、分類研究を進めている。

## 菌根を分離源とした菌根性きのこの遺伝資源拡充： 分離源菌根の形態学的特徴の解明と分離手法の改良

遠藤 直樹（鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター）

菌根性きのこ種は腐生性種と比べて子実体からの分離培養が困難である。本研究では菌根分離法により本菌群の菌株拡充を試みた。また、菌根を利用するため、種同定の基準となる菌根の形態情報を集積した。菌根性きのこ 18 属 49 種 61 試料で菌根分離を行った結果、19 菌株 (7 属 18 種) を確立できた。いずれの菌株も、目的とする種であることが rDNA ITS 領域の PCR-RFLP 分析および塩基配列解析で示された。また、菌根分離と組織分離の両方を行なった 10 属 18 種のうち、キハツダケは菌根分離でのみ培養できた。一方、これら 18 種には組織分離でのみ培養できた試料が 3 属 3 種、いずれの方法でも培養できた試料が 3 属 6 種、培養できなかった試料が 6 属 8 種あった。菌根形態を調査した結果、*Amanita* 属は節や種によって菌鞘構造が異なったのに対し、*Hydnum* 属は属内で菌根形態が共通する傾向にあった。*Tricholoma* 属も同様の傾向を示したが、全体の色調や根外菌糸体の頻度、菌糸のクランプ結合の有無に種間で差異があった。以上より、菌根分離法は従来の子実体分離と併用することで菌根性きのこ種の菌株拡充に寄与できると考えられた。

## 地下深部油ガス田におけるメタン生成機構の解明 —共生培養法によるリグニン関連物質分解微生物の網羅的分離培養

持丸 華子 (産業技術総合研究所地圏資源環境研究部門)

世界の天然ガス資源に含まれるメタンの約 20% は微生物により生産されたと推定されている。堆積物中で有機物は巨大な分子量を持つ難分解性の物質に変化していると考えられ、メタンの根源有機物やそれを分解する微生物については明らかではない。本研究では、地下深部油ガス田におけるメタン生成機構を解明することを目的とし、国内の様々な油ガス田から地層水を用い、リグニン関連物質であるメトキシ芳香族化合物を分解する微生物を網羅的に分離・同定し、その生態を解明した。

環境中における物質の流れを再現するため、試験管に水素利用または酢酸利用メタン生成菌を共生菌として基質と共にあらかじめ添加し、油ガス田試料の希釈培養を行い、集積された細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。採取地や培養温度などが異なる複数の試料で、既知種との相同性が 90% 以下の細菌が 40-100% の存在率で検出された。この中で既知種とそれぞれ 88-90% 離れた新規微生物は 5 種類以上確認され、メトキシ芳香族化合物は新規微生物によりメタン生成菌との強固な共生で分解され、メタンへと変換されているという生態を明らかにした。

## 日本産 *Alternaria* 属菌群および *Cercospora* 菌群の分類学的研究

中島 千晴 (三重大学大学院生物資源学研究科)

*Alternaria* 属菌は主に腐生菌として環境中に広く普遍的に存在するが、植物に対して病原性を有する植物病原菌となる系統も存在する。また、植物病原菌種は同一種内で宿主植物に対して特異的毒素 (HST) 産生能を有する系統と、欠く系統が存在する等、多様性に富む。実用上、これらを類別することは重要であるが、形態的特徴に乏しく、日本産種に関する包括的な研究はない。そこで、形態と分子系統、接種試験による宿主範囲を統合した種概念を検討した。また、植物病原菌である *Cercospora* 属とその関連属菌はやはり多様性に富み、分子系統関係も明らかになりつつある。しかし、従来用いられてきた多遺伝子座の組み合わせによる分子系統解析では、種レベルの分解能が不十分である。そこで、東アジア産の *Pseudocercospora* 種の数多くの基準標本とそこから得られた基準標本由来株を用い、新たなバーコード領域の提案を行った。また、これらの種分化が、宿主植物の分化と密接に関連することが示唆された。

## 昭和期に記載された稀産シクエストレート菌の実体解明と保全対策の再検討

折原 貴道 (神奈川県立 生命の星・地球博物館学芸部)

トリュフ類やショウロのように、子実体（きのこ）が外皮に覆われたまま成熟し、自力での孢子散布ができないシクエストレート菌（地下生菌）は、担子菌類や子囊菌類の多岐にわたる系統から平行進化してきたことが知られている。国内のシクエストレート菌の基礎的研究は近年急速に進展しているが、昭和期に散発的に記載された種については、実体が不明なままであるものが多い。本研究では、これら過去に記載された「幻」の菌の実体解明に向けて、過去の記録産地での野外調査やハーバリウムにおける標本調査を実施し、分類学的再検討を行うとともに、一部については分子系統学的検討も行った。その結果、長年所在不明であった、国内絶滅種とされているスナタマゴタケ *Chlorophyllum agaricoides* の国内唯一の標本の再発見や、同じく絶滅種とされるハハシマアコウショウロ *Circulocolumella hahashimansis* の実体解明に繋がる形態学的新知見、今井三子博士（1900-1976）記載の多数の地下生菌標本の再発見、オオショウロの実体解明、さらに、これまで「ニカワショウロ」として認知されていた菌が実は未知系統の菌であったことなど、これまで見過ごされてきた多数の菌の基礎的知見の集積に繋がった。

## 雪氷環境における好冷性微細藻類の共生細菌 *Hymenobacter nivis* のゲノム解析及び代謝機構の解明

寺島 美亜 (北海道大学低温科学研究所)

氷河や高山雪原では雪解けが進む春、雪の表面をピンクに染める赤雪現象が起こる。この現象は藻類増殖によるものであり、低温、強光、高紫外線、低栄養などのストレス下においても藻類が生育している。赤雪には微細藻類のほか、細菌も検出されており、藻類が生産した有機物を消費していると思われる。南極の赤雪からは真核緑藻と一緒に従属栄養性細菌の *Hymenobacter nivis* が特異的に検出されている。本研究では、赤雪に優占している *H. nivis* が南極赤雪の厳しい環境へ適応するメカニズムを解明するため、ゲノム解析、プロテオーム解析及び培養実験を行った。その結果、光に反応するタンパク質（プロテオロドプシン、クリプトクロム等）の遺伝子がゲノム上に含まれていることが明らかになった。さらに、光と暗環境下とで本菌の増殖を比較をすると、光環境下の方が速かった。また、*H. nivis* のプロテオームを解析したところ、光反応のタンパク質が発現されていることがわかった。このうした光反応タンパク質により、*H. nivis* は光を認識し、利用することが可能であり、南極赤雪の低温・強光環境に適応し、優占していると考えられる。

## 河川水の自由生活性アメーバ内の非結核性抗酸菌を分離して 共生関係の実態を解明する

西内 由紀子 (大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所)

肺非結核性抗酸菌感染症は世界中特に日本で増加している。この事実と環境から感染することから、抗酸菌が環境中で生存域を拡大している事を示唆している。生存域の拡大には、浮遊菌やバイオフィーム形成以外に自由生活性アメーバ内共生の寄与が考えられる。本研究では河川表層水中の浮遊菌とアメーバ内の抗酸菌について、培養、抗酸菌現存量、および菌叢を解析して共生関係の実態を調べた。淀川、猪名川、石川から夏と冬に表層水を採取して、アメーバ試料 (0.8 μm フィルター上残存) および浮遊菌試料 (0.8 μm フィルターを通過し 0.2 μm フィルター上残存) を得た。培養によって浮遊菌試料から *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*、*M. intracellulare*、*M. colombiense* など 24 種の抗酸菌を検出した。採水箇所や季節性による偏りはなかった。アメーバ試料からは、*Naegleria koreanum*、*Naegleria neojejuensis*、*Stenamoeba limacine*、*Vermamoeba vermiformis* を分離した。アメーバ内に抗酸性染色陽性菌が認められた。定量 PCR 法により両試料中の抗酸菌数は検出限界以下から  $3.8 \times 10^5$  コピー / 試料であった。河川表層水において抗酸菌は浮遊するだけでなくアメーバとも相互作用して生存していることが推察された。現在実施している菌叢解析結果を合わせて報告したい。

## 外来雑草エゾノギシギシを摂食するコガタルリハムシの 腸内シュウ酸分解細菌の共生機能の解明

大坪 和香子 (東北大学大学院農学研究科)

日本の在来昆虫コガタルリハムシは、成虫・幼虫共に外来雑草であるエゾノギシギシを旺盛に摂食するが、エゾノギシギシに高濃度で含まれるシュウ酸はコガタルリハムシ体内に蓄積しておらず、腸内細菌のシュウ酸分解への関与が示唆されている。そこで本研究では、コガタルリハムシの腸内細菌の構造とシュウ酸分解能および共生機能を明らかにすることを目的とし、採集地の異なるハムシ幼虫腸管の菌叢解析およびシュウ酸含有培地を用いた単離実験を行った。その結果、コガタルリハムシの腸内細菌叢は、採集した環境(野外または飼育条件)に大きく依存しており、環境中から獲得した細菌が腸内細菌叢を構成していることが示唆された。また、腸内細菌叢において優勢的であった細菌属は、シュウ酸を含む培地を用いた単離クローン解析でも優勢であり、シュウ酸存在下において高い増殖性が見られたことから、シュウ酸への耐性、シュウ酸分解能および腸管への共生に関連性があることが示唆された。コガタルリハムシ腸内細菌叢における優勢属を代表する単離菌株のゲノム解析の結果から、各菌株がシュウ酸脱炭酸酵素に代表されるシュウ酸分解に必要な遺伝子を保有していることが知られた。

## 酸化還元電位制御下でのコロニー形成「固相電気培養装置：SPECIES」で拓く培養可能微生物圏のフロンティア

木村 善一郎（呉工業高等専門学校環境都市工学分野）

電子資化性細菌は様々な物質生産系を構成し得る有用な細菌群であるが特異的培養法が未確立である。筆者は自身の独自技術である固相電気培養装置（Solid-Phase Electrochemical Colonization and Isolation Equipment System；SPECIES）が当該細菌群の分離装置として使用できると着想し、その検証に取り組んだ。SPECIES は導電性固体培地を用いた電気培養装置である。本研究では電圧の印加の有無による培養後コロニー菌叢は次世代シーケンサにより解析・比較した。

結果として SPECIES 装置内に形成された菌叢は植種源と明確に異なることが判明した。電極印加による大きな影響として、培地上に形成されるコロニーの多様性が高まり、電圧印加系においては、0.5% 超の検出頻度となった属が 20 超存在したのに対し、非印加系では 11 属にとどまった。また印加系から得られたコロニーには種レベルで新規と考えられる株が複数含まれていた。またコロニー菌叢の優占種は、電子資化性細菌であることが示唆されている *Thermoanaerobacter* 属だった。従って本研究により SPECIES の持つ電子資化性細菌培養装置及び菌体細胞可培養化装置という性質が解明された。今後、本装置の有する新規微生物培養及び電子資化性細菌特異分離というそれぞれの技術的方向性に合致する装置運用条件を検討する必要がある。

## 藍建て発酵に関するインジゴ還元酵素の機能と構造解析並びに染色への応用

米田 一成（東海大学農学部）

藍染めは日本の伝統的な染色技法であり、藍の葉を堆肥状にしたすくもを発酵還元することにより繊維を染色する方法である。すくもに含まれるインジゴは水に不溶であるためそのまま繊維を染めることはできない。そこで、藍建て発酵の工程では常温性の好アルカリ性菌由来のインジゴ還元酵素によってインジゴが還元されることにより、水溶性のロイコインジゴに変化する。この酵素反応によりすくものインジゴは水に溶け、繊維を染色することが可能となる。本研究では藍染めのインジゴ還元反応に関与するインジゴ還元酵素の機能解析を行った。*Bacillus smithii* 由来インジゴ還元酵素はコバルト親和性カラムで精製を行い、嫌気条件下においてインジゴカルミンの還元活性（30 U/mg）を有していることを明らかにした。本酵素の最適 pH は 7、最適温度は 70℃以上であり、pH 5～11 の広い範囲で安定であり、100℃でも失活しない高度耐熱性の新規なインジゴ還元酵素であることを明らかにした。インジゴ還元酵素を使用して綿布の染色を行ったところ、還元剤の有無による染色の差を確認することができた。また、1.9 Å 分解能で結晶構造解析に成功した。



## がん幹細胞選択的な細胞毒性を示す植物成分の微生物生産に向けた研究

關 光 (大阪大学大学院工学研究科)

Guaianolide Sesquiterpene Lactones (GSLs) は、5 員環-7 員環-ラクトン環が縮合した基本構造をもつ植物セスキテルペノイドの一群である。幾つかの GSL は急性骨髄性白血病幹細胞に選択的な細胞毒性を有することが報告されている。本研究では、組換え酵母における GSLs 合成経路の再構築をめざした。シャムジンコウ由来  $\delta$ -guaiene 合成酵素、レタス由来 CYP71AV3、*Artemisia annua* 由来アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1) およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH1) 遺伝子を酵母に導入し GSLs の前駆体となりうる  $\delta$ -guaianoic acid を *de novo* 合成した。次に、 $\delta$ -guaianoic acid の 6 位あるいは 8 位を水酸化し分子内脱水縮合によるラクトン環形成を誘導しうる酵素の候補として、シナジンコウから 6 種の CYP71 ファミリー P450 を選抜し酵素機能を解析した。そのうち 3 種が  $\delta$ -guaiene に対する酸化活性を示したが、目的とするラクトン環形成誘導活性については検出されなかった。従って、さらなる候補酵素遺伝子の探索が必要である。

## 高変異性好熱菌を利用した耐熱化変異酵素のハイスループット創出

鈴木 宏和 (鳥取大学大学院工学研究科)

実用的な耐熱化変異 (安定化) 酵素を得るには、その遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築し、耐熱化変異に成功した遺伝子を選別する手法が古くから用いられる。耐熱化変異酵素創出のハイスループット化を目的とし、本研究では耐熱化変異酵素遺伝子を好熱菌中で簡単に選別する 2 つの新手法を検証した。1 つ目は、好熱菌中で熱変性タンパク質が蓄積した際に発現が変動する遺伝子をレポーターングする方法で、そのような遺伝子をトランスクリプトーム解析により見出した。それら遺伝子のプロモーター領域下流にレポーター遺伝子を挿入し、細胞内で産生される酵素の安定性とレポーター発現量の相関性を評価したところ、1 つのプロモーターについて相関が見られた。他プロモーター候補と合わせて、現在より詳細な検証を続けている。2 つ目の手法は、熱変性タンパク質の蓄積が好熱菌の生育を阻害することを仮定した方法である。細胞内で産生される酵素の安定性と増殖速度の関連性を評価したところ、倍加時間に差異はなかったが、増殖開始時間 (準備期) において差異が見られた。いずれの手法も、酵素活性に依存することなく耐熱化変異酵素を選別できる可能性がある。

## クオラムセンシングフェロモンを介した腸内細菌とヒトのクロストーク

岡田 正弘 (東京大学大学院薬学系研究科、現 神奈川大学工学部)

我々は翻訳後修飾によりトリプトファン残基がイソプレニル化 (ファルネシル化またはゲラニル化) されたオリゴペプチド型クオラムセンシングフェロモンを初めて発見した。今のところ、枯草菌 (近縁種の納豆菌を含む) 7 菌株においてのみ、その存在が確認されているが、他にもトリプトファン残基のイソプレニル化酵素のホモログが存在していると考えられた。そこで、腸内細菌を含む様々な細菌においても、翻訳後修飾によりトリプトファン残基がイソプレニル化された修飾ペプチドフェロモンが分泌されていることを明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、種々の門に属する細菌由来のタンパク質が、実際にトリプトファン残基をファルネシル化できることを明らかにし、生産細菌の培養液からトリプトファン残基がファルネシル化された修飾ペプチドを検出することができた。続いて、生産細菌において修飾ペプチドフェロモンが果たす生物活性を明らかにするために、遺伝子発現解析を行った。また、腸内細菌の宿主であるヒトにおいても修飾ペプチドがなんらかの作用を示すことを明らかにするために、ヒトの神経細胞を用いた活性試験を検討しているところである。

## 基質多様性を有するアデニル化酵素の探索と D-アミノ酸ジペプチド生産法の開発

木野 邦器 (早稲田大学理工学術院先進理工学部)

D-アミノ酸を含有するジペプチドには L-アミノ酸で構成されるジペプチドとは異なる生理機能や物理化学的特性が期待できる。そこで、非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメイン (A ドメイン) による基質アミノ酸の活性化と一方の基質アミノ酸のアミノ基による求核置換とを組み合わせる我々が開発した新規ジペプチド合成法を踏まえて、遊離 D-アミノ酸からの D-アミノ酸ジペプチド合成を可能とする A ドメインを探索した。その結果、tyrocidine synthetase に加えて bacitracin synthetase の A ドメインが L-アミノ酸だけでなく D-アミノ酸も基質とすることを新たに見出した。この 2 種類の A ドメインを利用するだけで、D-D-、D-L-、L-D-体といった多様な組み合わせの D-アミノ酸含有ジペプチドを 40 種類以上合成することができた。A ドメインを高発現させた組換え大腸菌を用いた菌体反応では、10 mM の D-Trp から最大 4.67 mM の D-Trp-D-Pro の合成に成功した。D-アミノ酸を認識する A ドメインを見出したことで、多様な D-アミノ酸含有ジペプチドの効率的合成が可能となった。

## メディエータレス酵素機能電極用素子を志向した直接電子移動型色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析

里村 武範 (福井大学学術研究院工学系部門)

色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) は、人工の酸化還元色素を電子受容体とし各種生体成分の酸化反応を触媒する一群の酵素である。本酵素は、人工酸化還元色素をメディエータとすることで基質の電子を電極へ導入することが可能である。近年、この Dye-DH の中にメディエータを必要とせず酵素-電極間で直接電子授受が可能な直接電子移動 (DET) 型 Dye-DH が報告された。DET 型 Dye-DH は、酵素-電極間で直接電子の授受を行うことが可能であるため、高出力なバイオ電池や高感度の検出可能なバイオセンサ用酵素機能電極用素子としての利用が期待できる。しかしながら、DET 型 Dye-DH は、これまで常温性細菌由来酵素の報告例しか無く、酵素自体も不安定であるため酵素機能電極用素子としての利用は困難である。そこで、本研究では、これまで報告例がない安定性の高い DET 型 Dye-DH を超好熱菌から探索し、酵素の機能解析を進め酵素機能電極用素子としての機能開発を行うことを目的として研究を行った。複数の超好熱菌から DET 型 Dye-DH 候補探索した結果、DET 型 Dye-DH を見出すことに成功した。

## 酵母における S-アデノシルメチオニンの生理機能に関する研究

水沼 正樹 (広島大学大学院統合生命科学研究科)

S-アデノシルメチオニン (SAM) は、あらゆる生物において、DNA やたんぱく質など生体分子のメチル化反応のメチル基供与体として、細胞機能の調節に必須の役割を果たしている。我々は、出芽酵母で SAM を高蓄積する変異株を取得した (*SSG1* と命名)。*SSG1* は *YHR032W* 遺伝子における変異であった。データベース検索の結果、実験室酵母 Yhr032W タンパク質は実用酵母 (清酒酵母など) と比較して 36 個アミノ酸が短かった。驚いたことに、Ssg1 は実用酵母のものと同じとなり、36 個アミノ酸が付加された先祖帰りしたような変異株であった。*YHR032W* は薬剤排出トランスポーター MATE ファミリーと相同性を有したことから、*SSG1* は SAM 濃度調節に関わることが予想された。まず、Ssg1 の機能を調べるため、その局在を調べた。実験室酵母 Yhr032W は明確な局在が観察されなかったが、Ssg1 (実用酵母型) は液胞膜に局在した。さらに、*SSG1* 変異株は SAM を液胞に高蓄積し、高温などのストレスに耐性を示した。さらに、*SSG1* 変異株におけるマイクロアレイ、メタボローム解析も実施したので、本結果も紹介する。

## 細菌の休眠および覚醒の制御機構の解明

山口 良弘 (大阪市立大学複合先端研究機構)

細菌集団には増殖をしない休眠状態の細菌が存在し、定常期やバイオフィーム内のおよそ1%を占めると考えられている。休眠状態の細菌は薬剤などの様々なストレスに強い耐性を示すため、食中毒や感染症などの原因となっている。大腸菌では HipA-HipB toxin antitoxin (TA) system が休眠誘導に重要であると報告されたが、他の因子の関与も示唆されている。我々は、HipA toxin と相同性を持つ YjjJ を同定した。そこで、HipB-HipA に加えて YjjJ が休眠に関与すると推測し、YjjJ toxin の機能解析および YjjJ、HipA による休眠および増殖再開機構を解明することを目的とした。

YjjJ は DNA 結合タンパク質であり、DNA 結合が YjjJ による生育阻害に重要であった。YjjJ の DNA 結合配列を探索した結果、2つのコンセンサス配列を得た。また、YjjJ はこれらの配列を含む dsDNA、dsRNA および ssRNA と結合することを確認した。次に、欠損株を用いて YjjJ の生理的役割を解析した。その結果、*yjjJhipA* の二重欠損はアンピシリンに対する感受性を増加させたが、*yjjJ* および *hipA* 遺伝子の単独欠損は薬剤耐性に影響しなかった。よって、休眠を介した薬剤耐性には、*yjjJ* および *hipA* 両遺伝子が重要であることが示された。

## 腸内細菌によるビフィズス菌の Fim 線毛のポリマー化誘導因子の探索とその機構解明

西山 啓太 (北里大学薬学部、現 慶應義塾大学医学部)

ビフィズス菌は、ヒトの消化管下部に生息し、宿主腸内環境の恒常性維持と密接にかかわることが知られている。本研究課題では、ビフィズス菌の腸内定着における分子機構を解明すべく、*Bifidobacterium longum* の Fim 線毛の腸粘膜への付着因子としての役割を解析した。透析膜に封入した *B. longum* をヒト便培養液中で培養すると、菌体表層に Fim 線毛がポリマー体を形成する現象を見出した。すなわち、腸内細菌由来の代謝産物が *B. longum* の Fim 線毛の誘導シグナルであると仮説を立てた。我々は、糞便培養液から、*B. longum* の線毛のポリマー化を誘導する物質 (物質 A) の精製・構造決定に成功した。また、物質 A は転写レベルで線毛の発現を上方制御した。さらに、物質 A による線毛のポリマー化は *B. longum* の培養細胞への接着を促進した。以上より、腸内細菌が産生した特定の物質により Fim 線毛の形成が誘導され、*B. longum* の接着を有利にする興味深い共生関係を見出すことができた。

## アルキルアルコールを配糖化する微生物由来の新規配糖化酵素反応の開発

上田 誠 (小山工業高等専門学校物質工学科)

糖転移反応による配糖体の合成は、化合物の安定性向上や物性改善に有用である。我々は土壌細菌の  $\alpha$ -グルコシダーゼを用い、アルキルアルコール配糖化酵素の探索と配糖体合成を検討している。ここではテルペンアルコールを基質とし、ネロールおよび 3 級アルコールのリナロールの配糖化について報告する。

土壌分離細菌 *Agrobacterium* sp. M-12 株の培養及び反応条件を最適化後、洗浄菌体とネロール 1 g/L, マルトース 100 g/L を含む反応液中 (20 mM リン酸緩衝液) でネロール配糖体の合成を行った。40 °C で 72 時間反応を行った結果、1.8 g/L の配糖体が蓄積した (モル収率 87.6 %)。

配糖化活性を持つ酵素遺伝子を取得すべく、*Ensifer adhaerens* NBRC100388<sup>T</sup> から  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子 (GH family 13) をクローニングし、大腸菌に形質転換した。得られた活性株から酵素を精製し基質特異性等を検討した。グルコシダーゼによる配糖化は 3 級アルコールには困難とされていたが、本酵素はビールの芳香主成分であるリナロールに対し配糖化活性を持つことを確認した。

## 「バイオ還元システム」利用拡大のための補酵素再生系グルコース脱水素酵素の進化工学的改変

片岡 道彦 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

グルコース脱水素酵素 (GDH) はグルコースを酸化する酵素であり、この際  $\text{NAD(P)}^+$  を電子受容体として  $\text{NAD(P)H}$  を生成する。この反応を様々な  $\text{NAD(P)H}$  依存性の酸化還元酵素と組み合わせることにより、効率的な還元システムが構築されている。そのため GDH は補酵素再生系の酵素として非常に優れており、多くの化合物の実生産プロセスへの応用が期待されている。一方、種々の酸化還元酵素が存在し、その基質/生成物の物性も含めて最適反応条件は様々であるため、還元システムの汎用性を高めるためには幅広い条件下で高い活性を示す GDH の創出が必要となる。

*Bacillus megaterium* 由来 GDH は、 $\text{NAD}^+$  と  $\text{NADP}^+$  の両方が利用可能であり、反応性に優れた酵素であるが、酸性領域において酵素活性が著しく低下することが確認されている。そこで本研究では、GDH の物質生産における補酵素再生系としての汎用性の向上を目的とし、酸性条件における反応性をはじめとした諸性質が向上・改善されるような GDH の創出を試みた。ランダム変異による K179 変異 GDH の取得および 4 量体界面構成アミノ酸残基変異 GDH の作成と諸性質の検討について報告する。

## 大腸菌エネルギー代謝における解糖系と好気 TCA 経路の使い分け・相互変換スイッチング機構の解明

田中 寛 (東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所)

大腸菌を限定量のグルコースとカザミノ酸を含む最小培地で培養すると、グルコースからアミノ酸へ、そして酢酸へと主な炭素源が順次切り替わっていくが、我々はその遷移機構の解析を進めている (Shimada & Tanaka, AEM 2016)。従来、この一連の代謝状態の遷移は cAMP/CRP 系を中心とした遺伝子発現調節により説明されてきた。しかし最近私達は、アセチル CoA から酢酸へのオーバーフロー代謝経路 (Pta 及び AckA) が、cAMP 経路とは独立にグルコース枯渇後の代謝変換に重要な役割を果たすことを見出し、その機構解明を目的として研究を進めている。本研究では、プロテオーム解析の結果を発端として、オーバーフロー代謝欠損が細胞内のピルビン酸濃度を上昇させ、PdhR を介したピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 発現の脱抑制を引き起こしていること。さらに、間接的に 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (OGDH) の活性を抑制し、これにより代謝遷移が阻害されていることを明らかにした。グルコース利用時のオーバーフロー代謝の意義はプロテオーム維持に関わるコスト最適化からの説明がなされているが、本研究の結果はオーバーフロー代謝の新しい役割を提案するものと考えられる。

## 微生物由来ピペリン代謝酵素に関する研究

小林 達彦 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

コショウの辛味成分はピペリンというアルカロイドである。ピペリンがどのように代謝 (分解) されるのかを酵素レベルで解明した研究はない。

ピペリンを単一窒素源として利用する No.14 株のピペリン分解活性は培養上清に見られたため、クロマトグラフィー操作で培養上清からピペリン分解酵素の精製を行った。また、ピペリン酸とともに生じるであろうもう一つの反応産物をピペリジンと同定した。

精製酵素のアミノ酸配列の情報をもとに No.14 株から本酵素遺伝子を同定した。大腸菌および放線菌を宿主として異種発現を試みたが、本酵素の発現および活性は菌体内、培養上清ともに検出されなかった。

本研究で同定したピペリン代謝の初発反応を担う酵素はピペリンの 3 級アミド結合を加水分解する酵素であった。3 級アミド結合は窒素原子に水素が付加していないアミド結合であり、プロリンのアミノ末端がペプチド結合を形成する場合にも見られる。プロリンのアミノ末端に見られる 3 級アミド結合は Xaa-Pro アミノペプチダーゼにより加水分解されることが報告されているが、我々が発見した酵素は本アミノペプチダーゼとはアミノ酸配列の相同性がない酵素であった。

## PET 分解酵素の structure-based design による高機能化と応用に関する研究

織田 昌幸 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

*Saccharomonospora viridis* AHK190 由来クチナーゼ (Cut190) は、polyethylene terephthalate (PET) を分解することから、structure-based design による同酵素の高機能化を目指し、各種変異体を作製して、その構造、機能、物性に関する研究を行った。高活性型変異体 S226P/R228S (Cut190\*) の基質結合様式を明らかにすべく、不活性型変異体 Cut190\*S176A と  $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Zn}^{2+}$ 、及び monoethyl succinate または monoethyl adipate との各複合体の結晶構造解析を行った。その結果、触媒反応前後と考えられる立体構造が高分解能で得られ、分子動力学計算結果とあわせて、金属イオンにより制御される触媒反応機構を明らかにした (Numoto *et al.* *Biochemistry* 57, 5289, 2018)。さらに活性と熱安定性を高めた Cut190 変異体を作製し、個々の金属イオン結合部位の役割を解明した (Oda *et al.* *Appl. Microbiol. Biotech.* 102, 10067, 2018)。また  $\text{Ca}^{2+}$  結合に伴う安定化の熱力学的機構や (Inaba *et al.* *J. Therm. Anal. Calorim.* 135, 2655, 2019)、各金属イオンの結合力と安定性や活性に及ぼす影響を評価し (Senga *et al.* *J. Biochem.* in press)、いずれも論文発表した。

## 藻類のミルクング培養法による省エネ型バイオ燃料生産プロセスの開発

大田 昌樹 (東北大学大学院工学研究科附属超臨界溶媒工学研究センター)

地球環境問題の一つである二酸化炭素問題の対策として光合成の利用は不可避と考えられるが、その主たるバイオマス関連技術には課題が山積しており発展途上であることは否めない。このような中、申請者はこれまで藻類バイオマスが有する種々の優れた特徴に着眼し、関連する技術が抱える課題の解決に向けての基礎研究を産官の協力を得て約 12 年間続けてきた。その中で最近、藻類が細胞外に分泌するオイルを、あたかも牛などの動物から搾乳するかのように連続的に分離生産する「ミルクング培養法」の着想を得て、これを工学技術にすべく基礎研究を進めている。本研究では、このミルクング培養法による省エネ型の高速バイオ燃料生産システムの確立を目指し、緑藻 *Botryococcus braunii* からの炭化水素の連続式湿式抽出法の開発を検討した。

## 1,3-ジオール骨格化合物の発酵生産に向けたプラットフォーム経路の構築：再生可能資源からのロケットプロペラント前駆体生産への挑戦

片岡 尚也（山口大学大学院創成科学研究科）

低炭素社会実現のため、化石資源から産出される化成品を再生可能資源から生産するバイオファイナリー研究が世界中で展開されている。本研究分野の発展のためには、いかにして生産対象を“非天然化合物”にまで拡大するか、が課題である。我々はこれまでに、非天然化合物である1,3-ブタンジオールを生産しうる合成代謝経路を報告した。本研究では、本経路を基盤に改変を施すことで、新たに化学構造の異なる3種の“非天然”1,3-ジオール類の生産に成功したので報告する。

1,3-ブタンジオール合成代謝経路は、*Ralstonia eutropha* 由来 PhaAB、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld 及び内在性アルコール脱水素酵素で構成されていた。本経路に、(i) PhaAの幅広いアシル CoA への活性が報告されている *R. eutropha* 由来 BktB への変換、(ii) 有機酸の CoA 誘導體への活性化を触媒する *Megasphaera elsdenii* 由来 Pct の付加、を施した。改変経路を保有する大腸菌は、グルコース及びプロピオン酸、イソ酪酸又はグリコール酸混合物から1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール、1,2,4-ブタントリオールを生産した。

## 電気化学的制御によるセルロースナノファイバーの高効率合成

椎木 弘（大阪府立大学大学院工学研究科）

バイオリファイナリーの観点から、セルロースナノファイバーを用いた新しい材料の開発が注目されている。セルロースナノファイバーは、植物や微生物などのバイオマスから取得され、軽量でありながら高い機械強度や耐熱性など優れた特性を有する。しかしながら、植物由来のナノファイバーは加工性に乏しく、成形の際、機械的粉碎による微細化を要するため、本来の優れた特性とのトレードオフとなる。一方、酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*) はグルコースを摂取して酵素複合体からセルロースを排出し、ボトムアップ的にナノファイバー構造体を形成する。したがって、培地形状に則した構造体の取得が可能であり、ナノファイバーの特性を損なうことなく活用できる点で優位である。本研究では、酢酸菌の代謝系を電気化学的に解釈し、電位制御によるセルロースナノファイバーの高効率合成を目的とした。また、金属ナノ構造体との複合化について検討し、新しいセルロースナノファイバーの応用について探索した。



## サンゴ共生藻における宿主非依存的な光合成産物の分泌に関わる環境応答シグナル経路

丸山 真一郎（東北大学大学院生命科学研究科）

単細胞渦鞭毛藻である褐虫藻（Symbiodiniaceae 科）は、造礁サンゴ等の刺胞動物に細胞内共生し、貧栄養の熱帯海域において重要な生態系を構築する。この微細藻類と宿主動物との共生系は温暖化などの環境変動に脆弱であり、「サンゴの白化」で知られる共生崩壊現象が問題となっているが、微細藻類と宿主とのコミュニケーションの分子の実体など、不明な点が多い。本研究では、我々が独自に開発した、共生状態を人工的に模することで本来宿主へ供給されるはずのグルコース分泌を単独培養で誘導できる「共生ミミック培養系」を用いて、分泌を促すシグナル経路を同定することを目的に、遺伝子発現および生理学的解析を行った。その結果、共生ミミック状態の褐虫藻では、光化学系遺伝子群の発現上昇と、酸素発生量に基づく光合成活性の低下が見られた上、炭酸輸送や糖輸送に関わる遺伝子発現も顕著に変動していた。これらのことから、中性海水から宿主酸性食胞への極度の環境変動に晒された共生褐虫藻細胞では、光化学系と炭酸固定系のアンバランスによるストレスが生じ、その応答として、グルコースの細胞外排出を含む糖代謝の大規模な改変が起こることが考えられる。

## 嫌気環境での高効率キシロース発酵に向けた *Spathaspora* 属酵母のキシロース代謝遺伝子群の機能解析

笹野 佑（大阪大学大学院工学研究科、現 崇城大学生物生命学部）

近年単離された子囊菌酵母 *Spathaspora passalidarum* は、嫌気条件においてもキシロースを効率的に発酵することが出来る。本酵母は真菌類にみられるキシロース代謝経路の酵素遺伝子（*XYL1* と *XYL2*）がそれぞれ 2 コピーずつゲノム上に存在するユニークな特徴があるが、それぞれの遺伝子の役割は分かっていない。そこで、本酵母の 4 つの *XYL* 遺伝子それぞれの破壊株を構築した。破壊株の作製法は我々が以前に独自に開発した方法を用いた。それらの破壊株をグルコースまたはキシロース単一培地で、好気と嫌気の両条件において生育を測定した。その結果、好气的条件下においても嫌气的条件下においても *XYL1.2* と *XYL2.1* 遺伝子破壊株の生育は野生株よりも弱いことが分かった。さらに、キシロース培地での *XYL* 遺伝子の転写量を測定したところ、どの遺伝子もキシロースに応答して転写が増加した。特に、*XYL1.1* は好気条件で約 27 倍、*XYL1.2* は嫌気条件で約 65 倍転写量が増加した。このことから、好気条件では *XYL1.1* が、嫌気条件では *XYL1.2* がキシロース代謝に主要な役割を果たしていることが示唆された。

## 嫌気的環境汚染物質分解菌の遺伝子導入・破壊系の開発

野尻 秀昭（東京大学生物生産工学研究センター）

本研究では、無酸素条件下でも発光する蛍光タンパク質 evoglow を用いて、組換え嫌気性菌を、培養を介さずにフローサイトメーター（FCM）で分取する系の開発を行った。まず、evoglow 蛍光が FCM での分取に有効かを検証するため、evoglow 発現大腸菌の蛍光強度を FCM で測定した。その結果、*Pseudomonas* 属由来のもので細胞分取が可能であり、SDS-PAGE 解析から分取可能か否かは発現量に依存することも示された。すなわち、高発現すれば evoglow を FCM での組換え細胞の分取に利用できることが示された。次に偏性嫌気性菌での評価のため、*Geobacter* 属で高発現するプロモーター下に evoglow 遺伝子を連結した遺伝子カセットを保持する *G. sulfurreducens* PCA 株を作成した。現在、FCM 解析を行っている。また、FCM をビニールで覆い窒素ガス置換することで酸素濃度を低下させ、効果を評価した。6% 程度まで酸素濃度を下げた条件で分取を行った場合、*Geobacter* 属細菌の生細胞数は 2～5 倍上昇し有効性が示された。現在、より酸素濃度を低下させる方法確立を行っている。

## 嫌気性バルキング原因菌の微生物機能情報の解明と 高速メタン発酵リアクターのバルキングメカニズムの理解

山田 剛史（豊橋技術科学大学大学院工学研究科）

本研究では、食品系有機性廃水を処理する中温 Expanded granular sludge bed (EGSB) リアクターで発生した嫌気性バルキングのメカニズムを明らかにするため、16S rRNA 遺伝子アンプリコンデータを用いた統計解析、嫌気性バルキング原因菌の EGSB グラニュール汚泥における空間分布解析、およびその情報から推定された利用可能な基質を用いた嫌気性バルキング原因菌の分離・培養を試みた。スピアマンの順位相関係数を用いた統計解析は、メタノサエタ属アーキア（1種）およびアナエロリネア綱細菌（2種）の糸状性微生物（嫌気性バルキング原因菌）の異常増殖が、同一の要因（運転状況や廃水性状の変化）によって発生したことを示していた。健全なグラニュール汚泥の切片に対して、上述の嫌気性バルキング原因菌に特異的な DNA プローブを用いた蛍光染色を行ったところ、アナエロリネア綱細菌とメタノサエタ属アーキアはそれぞれ異なる空間的分布を示した。次に、汚泥表面に存在する未知の難培養性アナエロリネア綱細菌の分離・培養を試みた。アナエロリネア綱細菌が耐性を有する抗生物質を用いて標的微生物以外の微生物増殖を阻害させながら希釈培養やロールチューブを行った結果、新規のアナエロリネア綱細菌が優占する集積培養系の構築に成功した。

## 鉄還元菌の多環芳香族炭化水素嫌気性分解代謝系の解明

井上 謙吾 (宮崎大学農学部)

多環芳香族化合物フェナントレン、ピレンの好気的な微生物分解については多くの知見が蓄積している一方で、嫌気性分解については研究例は少なく、代謝経路は未解明である。そこで、嫌気性のフェナントレン、ピレン分解菌を取得するため、嫌気条件下で不溶性の酸化鉄(Ⅲ)を唯一の電子受容体、フェナントレン、あるいはピレンを唯一の電子供与体となる培地を用い、河川底泥などを接種して集積培養を行った。4回以上の植継ぎを経た集積培養液をフェナントレン、あるいは、ピレンを含む寒天培地(基質の不溶性を利用した白濁した培地)に接種し、クリアゾーンを形成したコロニーから2株のフェナントレン分解菌、4株のピレン分解菌を取得した。16S rRNA 配列による系統学的解析を行ったところ、分離した6株はいずれも *Clostridium* 属、あるいは *Sporomusa* 属に分類されることが明らかになった。フェナントレン分解菌のうちの1株は、鉄(Ⅲ)を唯一の電子受容体として生育が可能であり、市販の栄養培地(嫌気条件下)でも旺盛に増殖した。ピレン分解菌1株は pH 10 以上のアルカリ性条件でも生育可能であった。

## 陸生カニ消化管より得られた微生物コンソーシアのセルロース・リグニン分解機序の解明とメタン発酵前処理への応用

馬場 保徳 (石川県立大学生物資源工学研究所)

セルロースおよびリグニンは、地球上に最も多く存在する天然高分子であり、難分解性である。とくに、嫌気下では分解され難く、これらを含む紙類や野菜残さの可溶化(前処理)が、メタン発酵の課題として残されている。そこで私たちは、メタン発酵前処理への応用を旨として、落ち葉・木片を食べるアカテガニの消化管から、紙を解繊する微生物群集を得た。しかし、得られた微生物群集は植え継ぎとともに紙の分解能を失ったため、培養条件検討の一助とするため、接種源であるカニ消化管内容物の微生物群集構造を解析するとともに、宿主(カニ)由来酵素がリグノセルロース分解に寄与している可能性を考え、宿主の RNA-seq を実施した。その結果、カニ消化管内では、宿主自身の酵素と好気性 Fungi によりリグノセルロースの分解がおき、Bacteria はその分解物を利用していることが示唆された。また、この菌叢解析の情報に基づき、本研究で検出されたリグノセルロース分解 Fungi を実際に分離することにも成功した。今後は、本研究で得られた集積培養および分離株を、メタン発酵前処理に利用し、リグノセルロースからのメタン発酵効率化を目指す。



**要旨(若手研究者助成)**



## 環境 DNA メタバーコーディングにより可視化された祖先的な木材腐朽性きのこ類の多様性と見えない未知系統

白水 貴 (国立科学博物館植物研究部、現 三重大学大学院生物資源学研究科)

真菌類は陸上生態系において生物間相互作用や物質循環の要となる生物群である。しかし、150 万種とも 1000 万種ともいわれる多様性のほとんどが未知の状態にあり、この情報不足が進化生態学的研究の障壁となっている。真菌類の多様性探索は、子実体採集、分離培養、環境 DNA 解析と、技術の進歩とともに発展してきた。これらの方法にはそれぞれ一長一短があり、研究目的に合った方法を選択する必要がある。しかし、方法の比較や効率的併用についてはほとんど検討されていない。本研究では、祖先的な木材腐朽性きのこ類であるアカキクラゲ類の包括的な多様性探索を目的とし、子実体採集、分離培養 (改変 Dilution to Extinction 法)、環境 DNA 解析 (DNA メタバーコーディング) を併用した調査を行った。その結果、子実体採集と分離培養でそれぞれ 10 OTU を検出した。これに対し、環境 DNA 解析は 27 OTU を検出し、最も包括的かつ多様な系統を得ることができた。また、子実体で検出されない未知系統が複数存在することが示された。得られた結果に基づき、効率的な多様性探索および記載分類と環境 DNA 解析間の情報量格差について考察する。

*memo* 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.



*memo* 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

*memo* 

Handwriting practice area consisting of 20 horizontal dashed lines.