

NUMBER 28

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH  
COMMUNICATIONS**

**2014**

# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 28



2 0 1 4

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

*17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME*

*YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN*

# 公益財団法人発酵研究所

理事長	波多野和徳		
常務理事	中濱 一雄		
理事	木村 光 富田 房男 原島 俊 別府 輝彦	武田 光子 中瀬 崇 古川 謙介 本田 武司	
監事	田浦 清	藤井 智幸	
評議員	今田 哲 北本勝ひこ 竹内 昌男 土屋 英子 吉田 敏臣	魚住 武司 下田 親 谷 吉樹 松原 謙一	
顧問	坂野 勲		

## 目 次

発酵研究所の歴史 ～所長当時を回想して（1990～1995）～	長谷川 徹	1
第8回助成研究報告会の開催	横田 明	11
<b>■平成24年度大型研究助成</b>		
コロニー形成の遺伝学	正木 春彦	15
新しい発想による機能性糖化合物の微生物酵素合成とその応用の展開	山本 憲二	21
土壌メタゲノム・菌株ゲノム情報を活用した農耕地からの 亜酸化窒素ガス発生原因微生物の特定・分離と性状解析	妹尾 啓史	31
細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明	秋山 芳展	51
<b>■平成20年度寄付講座助成</b>		
新規微生物機能の探索を基盤とした環境保全技術の開発	島 純	69
酵母の環境ストレス耐性機構の解析と食品製造への応用 島 純, 田中晃一, 安藤晃規, 小川 順		73
有機酸ストレス耐性機構の解明と新規バイオ燃料生産プロセスの構築 島 純, 田中晃一, 安藤晃規, 小川 順		83
ノンコンベンショナル酵母の機能探索と油脂等の有用物質生産への応用 島 純, 田中晃一, 安藤晃規, 小川 順		95
有機栄養液栽培に寄与する微生物群の解析とその応用 安藤晃規, 田中晃一, 島 純, 小川 順		109
<b>■平成24年度一般研究助成</b>		
未分類 <i>Clostridiales</i> 目細菌群の分離同定及び生態学的役割に 関する研究	高野（白鳥）初美	121
地下深部油田に隔絶されていた系統的に新規な嫌気微生物群を 共生培養法で集積し生態学的解明を行う	持丸 華子	121
我が国の温泉地における好熱性アーキアの地理分布、系統学的多様性 および生理機能の解明	加藤 真悟	122
小笠原諸島固有菌類保全のための分類・生態学的研究-材生息菌を 対象として	服部 力	123
浅海および深海メタン湧出域に生息するメタン資化菌の単離、系統分類、 および生理生態学的研究	平山 仙子	124

環境 DNA や環境 RNA のメタゲノム解析による土壌原生生物の生態系の 解明と新規分類群の探索	福田 康弘	125
植物内生放線菌の分離、分類および生態解明	松本 厚子	125
花粉に付着する微生物の検出とその応用	潮 雅之	126
淡水環境での硫黄酸化細菌の多様性と生態に関する研究	小島 久弥	127
イグチ科シクエストレート菌未知系統の探索と分類、および 進化的・地理的起源の解明	折原 貴道	128
菌糸融合および疑似有性生殖を利用した麹菌有用株の新規育種法の開発	丸山 潤一	128
放線菌二次代謝生産を誘導する新規シグナル分子の化学構造と 分子多様性の解析	荒川 賢治	129
プロテアソーム様巨大複合体プロテアーゼを分泌する好熱菌の 応用に関する研究	渡部 邦彦	130
有用微生物に細胞内磁気微粒子の形成能を付与するための基盤研究	田岡 東	131
変性してもすぐにまき戻る「変性しない酵素」-好塩性酵素の大量生産と 産業的利用	徳永 正雄	131
分泌シグナルに基づく細胞表層タンパク質のターゲティング機構の解明	山本 博規	132
アラニン排出輸送体を利用した新たなアミノ酸発酵生産技術の 確立を目指した基盤研究	米山 裕	133
D-サイクロセリン生合成機構の解明と非天然型アミノ酸合成への応用	的場 康幸	134
バイオ素材産業の創成を目指したウロン酸酸化発酵微生物の選抜と 機能解析	阿野 嘉孝	134
バイオコンバージョンによる植物油脂からの果実様香ラクトン 生産について	金内 誠	135
放線菌のセシウム蓄積に関する研究	安齊洋次郎	136
ゲノム情報を基盤にした感染環境における細菌間共生現象の解析と応用	後藤 直正	137
ポリエステル分解性クチナーゼをモデルとした $\alpha/\beta$ ヒドロラーゼの 分子改変技術の開発	河合富佐子	137
粘液細菌の分離と生理活性物質の探索	木村 義雄	138
ナノバイオマーカーを利用したモデル腸内フローラのリアルタイム 機能解析	中村 修一	139
微生物のホルムアルデヒド代謝生理機能を利用した環境技術開発	由里本博也	140
新規ジペプチジルペプチダーゼと歯周病原性細菌のタンパク質分解・ 取り込み機構の解明	根本 孝幸	141

RESEARCH COMMUNICATIONS

イネ科植物に共生する糸状菌の抗菌性物質生合成遺伝子の単離と 植物病害防除への利用 .....	竹本 大吾	141
腸内細菌マイクロバイオームの遺伝子間相互作用ネットワークの 比較解析 .....	奥田修二郎	142
腸炎ビブリオの下痢誘導機構の解明 .....	児玉 年央	143
 ■平成23, 24年度若手研究者助成		
極域を支配する <i>Polaribacter</i> 属細菌の系統分類と生態に関する研究 .....	吉澤 晋	145
幅広い糸状菌からの休眠型二次代謝産物遺伝子クラスターの網羅的活性化 および化合物生産を実現する基盤整備 .....	中沢 威人	145

## 発酵研究所の歴史 ～所長当時を回想して(1990～1995)～

長谷川 徹



長谷川 徹 (1990～1995年)

### はじめに

2013年6月7日、公益財団法人発酵研究所第7回助成研究報告会が豊中市・千里ライフサイエンスセンターで開催された。その際、常務理事の中濱一雄氏から財団法人発酵研究所所長当時の歴史について執筆の依頼があった。

私は、1987年4月に武田薬品工業株式会社から文部省所管の財団法人発酵研究所へ出向した。当時飯島貞二所長のもとで、1990年3月まで遺伝資源の保存事業に関わる業務全般にわたって幅広く習得する機会が得られた。その後、1990年4月、飯島所長後任の所長という大任を引き受けることになった。

5年間の所長在任中、遺伝資源の保存事業は知的生産のインフラストラクチャーであり、戦略的センスが要求されることから、事業全般にわたってさらなる改革と学会・業界との連携を国際的視野に立って推進した。また、所長は状況のイノベーターであって、その自覚が財団の盛衰に大きく左右するであろうとの認識のもとに、財団の発展に努力を傾注した。

1995年1月の阪神・淡路大震災のあと、同年3月に発酵研究所を退所し、広島大学へ赴任することになった。以来今日まで18年が経過し、発酵研究所当時の記憶が断片的で、しかも全般に希薄になっていることから、正直なところ執筆の依頼があったことに戸惑いを隠せなかった。しかし、たっでの依頼であったので引き受けることにした。

歴史を記述するには記憶が大切であり、“ずれ”が無く正確性が要求されるが、当初から困難が予想された。従って、当時の年次報告書と事業報告書とを頼りに出来るだけ記憶との“ずれ”を修正しつつ所長当時を回想した。結果として、全般に大まかな内容の記述に成らざるを得なかったことをお許し願いたい。

### 歴史を概観

財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka, 略称 IFO) の設立時からの経緯については、すでに長谷川武治元所長<sup>1)</sup> および飯島貞二前所長<sup>2)</sup> によって詳細に記述されているのでここではその主要な経緯を簡潔に纏めてみた。

---

長谷川 徹, HASEGAWA Toru, Ph. D.

1936年生まれ、1987年～1995年 発酵研究所に在職、元発酵研究所所長・常務理事、元広島大学教授、元園田学園女子大学教授

1944年日本政府から、武田薬品工業株式会社に対して、菌類の収集、保存、頒布と航空燃料、医薬品、食糧の開発・生産を目的とした研究機関設置の要請があり、東京帝国大学農学部教授坂口謹一郎博士の勧めのもとに、六代目社長武田長兵衛氏自らが理事長となり、同年12月に内閣技術院所管の財団法人航空醗酵研究所（中澤亮治所長）が設立された。しかしほどなく終戦をむかえ、1945年11月、名称を財団法人醗酵研究所に改め存続することになった。翌年4月、佐藤喜吉所長の下に、武田薬品工業株式会社の資金援助による財団法人として出発した。その後、1960年6月に醗酵研究所の応用研究部門の一部が武田薬品工業株式会社に移管されたのに伴って、翌年5月名称も財団法人発酵研究所に改められた。その結果、微生物株の収集・保存・分譲業務に特化した文部省所管の財団法人として活動することになった。

1961年長谷川武治博士が所長に就任し、1975年まで在任した。その後、1976年飯島貞二博士が所長に就任、1984年には動物細胞株の収集、保存、頒布と研究業務が加わった。飯島所長は1990年3月に退任し、同年4月、長谷川徹主席研究員が所長を引き継ぐことになった。所長在任期間は、1995年3月までの5年間であった。

なお、1994年は発酵研究所設立50周年の記念すべき年であった。

## 事 業

1990～1995年の所長当時、微生物株および動物細胞株の収集、保存、頒布を行うとともに、微生物株および動物細胞株の基礎的研究を目的とした文部省所管の試験研究法人として活動した。また研究成果等の刊行にも力を注いだ。微生物株・動物細胞株（ハードウェア）とそれらの記録や来歴（ソフトウェア）が揃っていて初めて価値ある資源になることをふまえ、研究環境と人を養成する体制を整え、より一層有効な保存機関になることを目標にした。なお、当研究所は最先端の科学を満喫する部署ではないが、文字通り遺伝資源の“持続的な保存・維持”の科学であると同時に、それを有効に利用してもらうための方策を確立する“円滑な取り扱い・管理”の科学でもある。

1989年に所内のグループ制がスタートし、ラインによる管理と研究グループ間の研究協力体制が軌道に乗ったことをふまえ、「保存法の改善」、「遺伝子研究」、「IFO 情報ネットワーク」の3つのワーキンググループをスタートさせた。また、所員全員が日頃から保存担当の意識を持つよう指導するとともに、保存業務の効率化と各グループ間の共通業務の集中化と円滑な処理に努めた。結果として、所内での協力体制が具体的な成果となって現れた。さらに外部との共同研究ならびに外部への技術協力も積極的に進めうる素地が出来、多くの実績が得られるに至った。とりわけ所長在任中の後半は、自身にとって事業全般にわたって最も充実した期間となった。

### 1) 微生物株、動物細胞株の収集・保存・頒布および寄託

当財団の保存菌株数は、1994年末で微生物株は15,092株となり、一方、動物細胞は420株であった。微生物の分類、同定のための基準ならびに参考株として、あるいは各種研究のための微生物株と動物細胞株とを合わせ、年間総分譲株数の最大は、1992年に9,278株を数えた。因みに1994年は8,708株であった。

当財団では、学術論文に公表された有用菌株、新規菌種の基準株、特別に興味ある性質を有する菌株などが内外から寄託され、保存し、分譲を行った。また同時に、バクテリオファージの収集・保存・分譲も行った。一方、動物細胞株については、新規細胞株を開発するとともに、株化された有用細胞株を収集・保存ならびにそれらの細胞学的研究・調査を行い、微生物汚染のないことを確認し分譲を行った。なお、微生物株の分譲手数料については、1994年に、予てからの手数料を改定し、大学、教育機関、公立試験研究機関は一株につき4,000円＋消費税、その他の試験研究機関は一株につき8,000円＋消費税、高等学校教材用は一株につき1,000円とした。<sup>3)</sup> 一方、動物細胞株の手数料は、上記微生物株と同様、大学、教育機関、公共試験研究機関は一株につき4,000円、その他は一株につき8,000円とした。<sup>4)</sup>



当時、微生物を使用する特許を出願する際、その微生物株を公共の微生物保存機関に寄託する制度が実施され、当財団はヨーロッパ特許庁ならびにその他への特許出願に関する微生物株の寄託機関として承認されていた。

保存菌株の災害時対策として、1983年10月、武田薬品工業株式会社光工場において、菌株の重複管理を開始したが、その後7年が経過したため、その間に増加した菌株の1セットを1990年9月に追加補充した。

## 2) International *Streptomyces* Project (ISP) 放線菌標準株の保存管理と品質管理

1962年、米国の E.B.Shirling 博士と D.Gottlieb 博士が主導で18カ国34機関の研究者によって、約450株の放線菌の性質をISPのマニュアルに準拠して検討された。当時日本放線菌研究会は国際的に認められていたことから、世界の放線菌研究の1拠点としてISP菌株の保存・分譲を分担することになった。従って、検討済ISP菌株の凍結乾燥した参考標準株のセットが、米国(ATCC)、ソ連(RIA)、オランダ(CBS)、日本(日本放線菌研究会)に1セットずつ配分された。放線菌研究会に配布された菌株は、ISPの方法に従い、岡見吉郎先生と同研究会のメンバーらによって復元・調製された。しかし、当時放線菌研究会はISP菌株の保存管理が出来る状態でなかったことから、同研究会の中沢鴻一先生が担当し、長谷川武治所長の協力によりISP菌株を発酵研究所(IFO)で保存管理することになった。その後、1971年にISP菌株の品質管理を放線菌研究会が主導で行うISP菌株チェック委員会が発足し、発酵研究所の全面的なサポートのもとにスタートすることになった。保存機関における菌株の品質管理のあり方の一つとして注目に値することであった。

1990～1995年、ISP菌株チェック委員会によるISP菌株の品質管理は、1971年以来途切れることなく続いており、IFOから分譲するL-乾燥標品の性質のチェックが行われた。二三の菌株でのマイナーな問題点を除き品質が十分に管理されていると結論された。また、その後のチェックの効率化のため、集積されたデータを光ディスク(TOSFILE)に入力し、保管することになった。

1991年、従来からISP菌株の品質管理で指定され、使用されていたDifco Laboratories社製ISP培地の生産が中止される旨の情報が販売元の三光純薬株式会社からもたらされた。そこで、和光純薬工業株式会社(代表者:金澤廣継氏)、日本製薬株式会社(代表者:西浦壽一氏)、財団法人発酵研究所(代表者:長谷川徹)の三者が急遽協議し、日本版ISP培地の作製に取りかかることになった(1992年)。代替培地として作製した8種類の試作品とDifcoの製品との比較を、発酵研究所で約4年間にわたって繰り返し行った結果、1996年3月までに8種類の試作品が全てDifcoの製品と遜色無く、ISP菌株チェック委員会によって成績良好と評価された。同年DifcoのISP培地に替わる8種類の培地(ダイゴ)が日本放線菌学会認定の培地として和光純薬工業から発売され今日に至っている。

なお、ISP菌株チェック委員会は、2002年にIFOの保存菌株が独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(NBRC)に移管されたのを受けてその役割を終了した。<sup>5)</sup>

## 3) 基礎研究

微生物の自然界における分布と生態を調査するとともに、各種の微生物の分離、同定、分類学的研究・調査を行いコレクションの充実を図った。さらに微生物の化学分類学的・系統分類学的データに基づく分類基準の検討、有効な保存方法の検討と改良、および保存中の変異の防止などの検討も行った。さらにまた、バクテリオファージの生理学的研究・調査も行った。一方、動物細胞株研究部門では新規動物細胞株の開発、また株化された有用細胞株の収集、保存ならびにそれらの細胞学的研究・調査とともに、遺伝マーカー株の収集・保存ならびにそれらの品質管理にも力を注いだ。なお、特命事項として、保存培養株の情報ネットワークの構築にむけ基礎的検討を開始した。

1991年、文部省科学研究費総合研究A「微生物の16S rRNAのデータベースの拡充とコンピューター同定システムの作製」(代表者:山里一英教授)に参加した。

#### 4) 研究成果の発表および国際学会・会議への参加

1990年、各微生物株ならびに動物細胞株の研究担当者による口頭・ポスター発表(含 海外)と論文発表はそれぞれ37報と19報であったが、1994年末には、それぞれ42報と40報にのぼった。即ち、所内での研究協力体制が具体的成果となって現れた結果と考えられる。国際学会・会議への参加は、1990~1994年度末までに30件あり、特に、国際微生物会議(IUMS)の各種サテライトシンポジウム(大阪)で発表と討論を行い、さらに専門委員会の運営をサポートするとともに、Kral コレクション<sup>6)</sup>のミーティングおよび放線菌のサテライトシンポジウムをそれぞれ後援した。

#### 5) 海外での研究協力および技術協力

1990~1995年、最も頻繁に密度濃く交流し、技術協力を行った海外の研究機関は、台湾食品工業発展研究所(新竹, 台湾)であった。1989年、当時主席研究員であった長谷川徹が初めて当研究所を訪れ、放線菌の化学分類に関する技術協力と生理活性物質を産生する希少放線菌に関する講演を行ったことがそのきっかけであった。その後、1990年に坂野 勲副所長が、1992年には今井 紘主任研究員と竹内昌男主席研究員が、さらに1993年には横田 明主任研究員がそれぞれ同研究所を訪れ、各専門分野の技術協力と講演を行った。その他、1992年、韓国・遺伝工学研究所の要請によりテジョン(韓国)で開催された「UNESCO Regional Training Workshop」で長谷川徹所長が技術協力と講演を行った。1991年オランダで、1992年には米国と英国でそれぞれ開催された「ISO/TC198 国際会議」に今井 紘主任研究員が技術委員会委員として出席した。また1993年、国際協力事業団の要請により、ブラジル・アンドレトゼーロ熱帯技術研究財団において、中桐 昭研究員がカルチャーコレクションに関する研究協力を行った。さらに、1994年、財団法人東亜科学技術協力会の要請により日台交流事業の一環として台湾で行われた「カルチャーコレクション検討会」へ講師として横田 明主任研究員を派遣した。

#### 6) 国内外からの来訪者および研修生

1990~1995年、国内外から研究者を含む多数の来訪者があり、講演および当研究施設を見学された。また、同時に当財団の事業あるいは遺伝資源に関わる研究にとって有益な情報をもたらされた。いささか主観的ではあるが、多数の来訪者の中から印象に残った講演をされた方々は以下の通りである。

- ① Dr.R.J. Bandoni, University of British Columbia, Canada
- ② Dr.D. Smith, CAB International Mycological Institute, U.K.
- ③ Dr.A.S.F. Griffiths, University of British Columbia, Canada
- ④ Dr.R.E. Stevenson, American Type Culture Collection, U.S.A.
- ⑤ Dr.L.K. Nakamura, National Center for Agricultural Utilization Research, U.S.A.
- ⑥ Dr.P. Blanz, University of Bayern, Germany.
- ⑦ Dr. K. Toyoshima, Osaka University, Japan.
- ⑧ Dr.T.K. Tan, National University of Singapore, Singapore.
- ⑨ Dr.P. Hoffmann, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, FRG.
- ⑩ Dr.P. Jackman, AFRC Intitute of Food Research, Norwich, U.K.

一方、国内外からの研修生の受け入れ要請に応じて、5年間で37名の研修生を受け入れ、菌株の同定・取り扱い法、動物細胞の培養・取り扱い法およびその汚染検査などの指導、実習をおこなった。

#### 7) 情報管理

1990年、管理部門では NEC PC9800 による公益法人会計処理ソフトを導入し会計処理の機械化がスタートした。さらに、コンピューターの機能アップを計るため、IBM23 に次いで新機種 IBM36 を導入し、保存株の寄託・分譲に関わる書類作成、保存株情報の完備、内外との情報の交換、カタログの出版等に対し、IFO における中枢のコンピューターと位置づけ、より一層の活用を開始した。

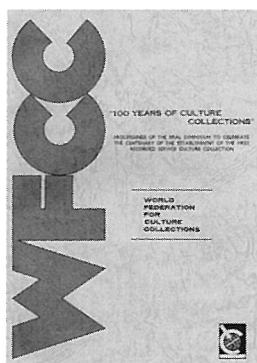
結果として、微生物株および動物細胞株の受け入れ、分譲、手数料の請求業務がスピードアップし、受け入れと分譲業務の増加に対応できた。また CD-ROM へのデータの転送が迅速になった。その後さらに記憶容量の増加と処理の高速化へと進展し、IBMAS400 を中心に、研究室の各コンピューターを結ぶネットワークが構築されるに至った。

以上の全般的な情報管理およびシステム開発については飯島前所長が主導で行った。また各種情報の入力・維持・管理は主に管理部門の佐藤邦子氏の献身によるものであり心から感謝の意を表する。<sup>7)</sup>

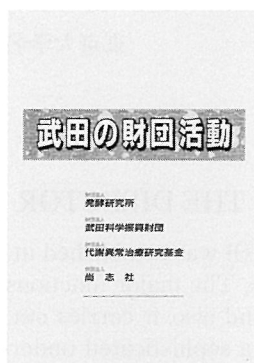
## 8) 出版事業

所長在任期間中に刊行された出版物を時系列的に列記すると以下の通りである。

- ① Sly L.I., T. Iijima and B. Kirsop. 1990. 100 Years of Culture Collections. Published by IFO.
- ② IFO Res. Commun. 15, 1991.
- ③ TAKEDA 社内報タケダ 1991. 武田の財団活動 財団法人発酵研究所 105: 4.
- ④ LIST OF CULTURES, MICROORGANISMS, 9th ed. 1992.
- ⑤ LIST OF CULTURES, ANIMAL CELL LINES, 3rd ed. 1992.
- ⑥ Institute for Fermentation, Osaka (English Leaflet) 1992.
- ⑦ IFO Res. Commun. 16, 1993.
- ⑧ 財団法人発酵研究所 (和文リーフレット) 1993. 東京大学名誉教授 駒形和男先生による寄稿文「カルチャーコレクションの役割」を掲載
- ⑨ LIST OF CULTURES, ANIMAL CELL LINES, 4th ed. 1994.
- ⑩ IFO Res. Commun. 17, 1995. The memorial issue on the fiftieth anniversary of IFO.



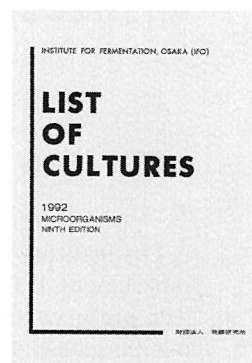
100 years of culture collection 1990.



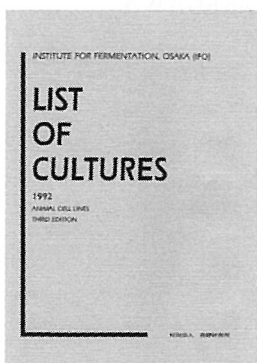
武田の財団活動 1991.



Institute for Fermentation, Osaka (leaflet) 1992.



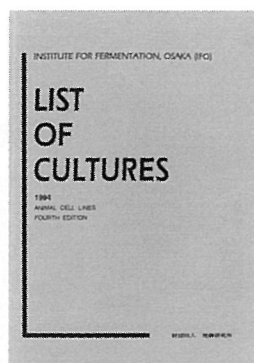
LIST OF CULTURES MICROORGANISMS 9th ed. 1992.



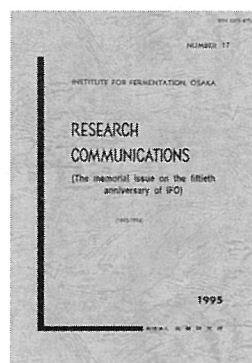
LIST OF CULTURES ANIMAL CELL LINES 3rd ed. 1992.



財団法人発酵研究所 (リーフレット) 1993.



LIST OF CULTURES ANIMAL CELL LINES 4th ed. 1994.



IFO Res. Commun. 17: 1995.

## カルチャーコレクションの役割

人類は、微生物の存在や機能を知る以前から微生物を利用して多くの酒を醸し、いろいろの発酵食品を製造してきた。

古代エジプトでは、パンの生地の一部を次の発酵の元種として用い、また中国では 1,000年以上も前から有種法による発酵が行われていた。これも微生物株保存法の一つであろうが、近代的な意味での微生物株の保存が問題になったのは、今から100年ほど前のことであろう。

しかし、残念ながら現在、我々は過去の研究や産業に用いられた貴重な菌株を殆ど入手することができない。その理由の一つに、菌株保存の技術が充分でなく、恒久的なカルチャーコレクションがなかったことがあげられよう。

微生物は有用物質の生産のみならず、生命のモデルとして分子生物学、遺伝学、生化学の進歩に大きな貢献をしている。また、多様性に富む微生物は貴重な遺伝子資源として注目されている。この意味において、微生物株は、研究・生産、あるいは文化の面で重要な役割を果たし、「生きている文化財」ともいえよう。このような重要な意味を持つ微生物株は、我々が次の世代に受け渡さねばならない「人間共通の資産」である。

カルチャーコレクションは、従来微生物株を保存し、それを供給する業務を行う機関と考えられてきた。しかし、最近ではカルチャーコレクションの対象が微生物からプラスミド、動物・植物の培養細胞、ハイブリドーマにまで及び、カルチャーコレクションは広義の培養生物とその情報を取り扱う機関に変貌しつつある。

発酵研究所は永い歴史を有し、その優れた培養生物株の保存事業は、良く知られている。

今後、その高いアクティビティが世界の学問・文化の発展に大きく寄与するものと期待されている。

東京大学名誉教授 駒形和男  
(1993年9月)



## A MESSAGE FROM THE DIRECTOR

The Institute for Fermentation, Osaka(IFO) was established in 1944. Since the establishment, IFO has shown steady growth. The major functions of IFO are to collect, preserve and industrial application. And also, it carries out basic research on microorganisms and animal cell lines with a sophisticated understanding of recent developments in microbiology, microbial genetics and cell biology.

We wish to strive continuously on improving culture quality to maximize the usefulness and keeping cultures as living assets into the next century.

Toru HASEGAWA  
Director  
(Sept. 1992)



## 組 織

発酵研究所の運営の中心は理事・評議員会である。1991年5月、当財団役員の任期満了に伴う改選で、永年理事長として運営に当たられた武田薬品工業株式会社名誉会長 小西新兵衛氏が退任され、新理事長に当財団理事の武田薬品工業株式会社社長 森田 桂氏が就任された。また当財団の常務理事 飯島貞二氏が理事に、理事の長谷川徹が常務理事にそれぞれ就任し、新たに理事として武田薬品工業株式会社取締役 杉野幸夫氏が就任された。一方、任期満了に伴う改選で、永年当財団の評議員として運営に参画された東京大学名誉教授 與良 清氏と酪農学園大学教授 高尾 彰一氏は退任され、新たに大阪大学教授 豊島久真男氏と北海道大学教授 富田房男氏がそれぞれ評議員に就任された。1993年3月、新たに京都大学教授 木村 光氏が評議員に就任された。

1991年3月および1994年3月の両理事・評議員会において、それぞれ武田薬品工業株式会社からの寄付金は17,500万円で、前期9,000万円、後期8,500万円を受領し、保存株分譲収入、保存株保管手数料と合わせ、人件費、設備費、研究費、その他の支出に対応することが出来た。

1994年、発酵研究所の役員と研究所各部門の担当者は以下の通りである。また以下に研究所各部門の担当者全員の集合写真を掲載する。

### 発酵研究所の組織 (1994年)

理 事 長：森田 桂			
理 事：長谷川 徹	飯島 貞二	岡田 善雄	岡見 吉郎
杉野 幸夫	別府 輝彦	福井 三郎	山田 秀明
早石 修			
評 議 員：磯野 正雄	大嶋 泰治	大村栄之助	木村 光
駒形 和男	武田 六郎	田村 學造	富田 房男
豊島久真男	椿 啓介	林田 晋策	原田 篤也
本郷 次雄	松原 謙一		
監 事：長谷川武治	三輪谷俊夫		

#### 研 究 所

所 長：長谷川 徹		
管理部門：家塚 俊次	森田 崇義	佐藤 邦子
情報管理：今井 紘		

#### 研 究 部 門

糸 状 菌：伊藤 忠義	中桐 昭	岡根 泉	
酵 母：見方洪三郎	長谷川建夫	上田久美子	今西 悦子
細 菌：横田 明	坂根 健	武内真理子	黒嶋 健一
中川 恭好	鈴木 壽保		
放 線 菌：波多野和徳	西井 忠止	田村 朋彦	塩山 絹子
動物細胞：竹内 昌男	吉田 東歩	佐藤 元信	中垣内弓子
久野 晴彦			



後列左から、中川恭好、家塚俊次、田村朋彦、竹内昌男、長谷川建夫、武内真理子、佐藤邦子、佐藤元信、  
黒嶋健一、今井 紘、塩山絹子、森田崇義、坂根 健、鈴木壽保

中列左から、長谷川 徹、伊藤忠義、波多野和徳、西井忠止、横田 明、岡根 泉

前列左から、今西悦子、上田久美子、吉田東歩、久野晴彦、中垣内弓子、見方洪三郎、中桐 昭

(1994年10月28日 撮影)

## 発酵研究所設立50周年

当財団の歴史を概観した項でも記述したが、1944年に財団法人航空醗酵研究所の名称で設立されて以来、1945年に財団法人醗酵研究所に、次いで1960年に財団法人発酵研究所に、それぞれ研究所の名称が改められ、1994年に設立50周年を迎えるに至った。

1994年7月、所内での協議の結果、発酵研究所設立50周年記念号として、「IFO Res.Commun.」の刊行(1995年3月出版予定)を決定した。その後、記念寄稿文の執筆者の協力を得て、予定通り「IFO Res.Commun. 17, 1995」が3月に出版の運びとなった。<sup>8)</sup>

同誌に掲載された記念寄稿文の表題と筆者(敬称略)は以下の通りである。

- 微生物株保存事業とIFO：長谷川武治
- IFOと菌類の系統分類：椿 啓介
- Microbial diversity and application of microorganisms：駒形和男
- 発酵研究所における情報管理：飯島貞二
- 担子菌系酵母の有性世代発見とその後の推移：坂野 勲

なお、上記記念寄稿文の前に、以下のような序文と追悼文が掲載された。

- 序 Towards the era of the genom：森田 桂
- 追悼文 Sinbei Konisi (1907-1995)  
坂口謹一郎先生を偲ぶ：長谷川武治

## 長谷川武治元所長の叙勲

長谷川武治博士は、1961～1975年の14年間、財団法人発酵研究所の所長として発酵研究所が世界有数の研究所へ発展するよう傾注された。また発酵研究所の菌株カタログは世界に行き渡り、IFOと名付けられた菌株は微生物学の進歩と微生物産業の発展に大きく寄与したことは疑いの余地のないところである。さらに同氏は各種政府委員を歴任するとともに、研究教育活動および学会活動にも数々の実績を残された。

以上のような多大な功績に報いるべく、1993年秋の叙勲に向け、同年2月申請書類を文部省に提出した。以後、同氏の過去の実績・業績等について、同氏の協力のもとに細部にわたって調査し、まとめ上げた調書を賞勲局に提出した。その結果、1993年10月4日に受勲の内示があり、11月3日に同氏の勲四等瑞宝章受章のニュースが新聞紙上で報道された。

その後、11月30日に同氏から薫陶を受けた諸氏が武田薬品工業株式会社十三寮に集い、同氏を囲んで盛大に受勲祝賀会が開かれた。



## おわりに

財団法人発酵研究所は先輩方の努力により成し遂げられた我が国で最も古い歴史を有する遺伝資源の保存施設であり、特にこれまで築かれてきた技術とノウハウの蓄積は計り知れないものがあつた。所謂、生きている文化財であり、新たな研究や産業に大いに役立つ人類共有の資産といえよう。このような素晴らしい歴史のある環境のもとで、5年間の所長在任期間を含む8年間にわたって、遺伝資源の保存事業に従事する機会に恵まれたことは、何にも代え難く幸せな出会いであった。

1995年3月、広島大学へ赴任のため所長を辞し、予てから発酵研究所の発展に努力されていた竹内昌男副所長がその職を引き継ぐことが理事・評議員会で承認された。

その後、2001年に当研究所は動物細胞株およびその担当所員がヒューマンズ振興財団研究資源バンクへ、さらに2002年には微生物株およびその担当所員が独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(NBRC)へそれぞれ移動したとの情報もたらされた。即ち、発酵研究所の貴重なカルチャーコレクションは外国特許関連の保存株を除き、その殆どが上記の研究部門へ移動したとのことであった。

2003年4月、発酵研究所が新たに研究助成事業に転じたことを知り、時の移り変わりを感じつつ当研究所在職中の出来事が懐かしく思い出された。その後、2011年に財団法人発酵研究所は公益財団法人発酵研究所へ移行した。このところ、各種学会誌等の掲示板で“公益財団法人発酵研究所平成〇〇年度助成の募集”と題した広告が散見されるようになった。その研究助成事業の対象が一般から大学での寄付講座助成にまで広がりを見せ、ますますその公益性が増していることに感慨ひとしおである。発酵研究所のOBの一人として、波多野和徳理事長を中心に研究助成事業がますます発展するよう期待してやまない。

## 謝 辞

財団法人発酵研究所在職中に賜りました多大なご協力・ご指導・ご鞭撻に対し、当時の役員および所員ならびに武田薬品工業株式会社の役員および社員の皆様、また各種学会・業界、さらには国内外のカルチャーコレクションに携わっておられた多くの方々に改めて衷心より感謝申し上げます。

この度の「発酵研究所の歴史」の執筆にあたり、資料の調査にご協力頂きました公益財団法人発酵研究所 中濱一雄氏、佐藤邦子氏、吉田恒明氏、および独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 泉南資源研究施設 吉田東歩氏に厚く御礼申し上げます。

## 資料と文献

- 1) 長谷川武治. 1996. 日本の微生物株保存 1. 揺籃時代. 日本微生物資源学会誌 12: 1.
- 2) 飯島貞二. 2001. A History of Institute for Fermentation, Osaka 発酵研究所の歴史. IFO Res. Commun. 20: 15.
- 3) IFO LIST OF CULTURES MICROORGANISMS 9th ed. 1992.
- 4) IFO LIST OF CULTURES ANIMAL CELL LINES 3rd ed. 1992.
- 5) 日本放線菌学会. 2011. 放線菌と生きる 日本放線菌学会 25周年記念. 5. 国際協力. 5-8. みみずく舎 医学評論社.
- 6) Sly L.I., T. Iijima and B. Kirsop. 1990. 100 Years of Culture Collection. Published by IFO.
- 7) IFO Res. Commun.1995. 発酵研究所における情報管理. 17: 44.
- 8) IFO Res. Commun.1995. 創立50周年記念寄稿文. 17: 9



## 第 8 回助成研究報告会の開催

平成 26 年 6 月 5 日に千里ライフサイエンスセンター 5 階ホールにおいて第 8 回助成研究報告会を開催し、2 年間の助成を受けた大型研究助成 4 件の研究成果の口頭発表、5.5 年間の助成を受けた寄付講座助成 1 件の研究成果の口頭発表、ならびに 2 年間の助成を受けた一般研究助成 30 件および 2～3 年間の助成を受けた若手研究者助成 2 件の研究成果のポスターによる発表が行われた。参加者は、大学、国公立研究所、企業の研究者や大学院学生など総数 195 名であった。

報告会に先立ち波多野理事長から挨拶があった。報告会では大型研究助成 4 件のうち「コロニー形成の遺伝学」(正木春彦)の 1 題は工藤俊章理化学研究所名誉研究員の座長のもとに、「新しい発想による機能性糖化合物の微生物酵素合成とその応用の展開」(山本憲二)の 1 題は今中忠行立命館大学教授の座長のもとに、「土壌メタゲノム・菌株ゲノム情報を活用した農耕地からの亜酸化窒素ガス発生原因微生物の特定・分離と性状解析」(妹尾啓史)および「細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明」(秋山芳展)の 2 題は大竹久夫大阪大学大学院教授の座長のもとに、口頭発表が行われた。また、寄付講座助成の 1 題「新規微生物機能の探索を基盤とした環境保全技術の開発」(島 純)は木村 光京都大学名誉教授の座長のもとに口頭発表が行われた。これは寄付講座助成の研究発表としては初めてのものであった。各研究発表に対して活発な討議がなされ、示唆に富んだ意見も出るなど実りのある発表となった。発表の内容は全文が本報告集に収録されている。なお、寄付講座助成の報告は総論 1 報と各論 4 報に分けて報告されている。

引き続き一般研究助成 30 件および若手研究者助成 2 件はポスター展示による発表がなされた。各ポスターの前で参加者と熱心な質疑が交わされた。さらにこの後行われた懇親会の時間にもお酒を片手にポスターの前で討論する姿が見られて、ポスター発表内容について十分に議論されたようであった。一般助成研究および若手研究者助成の研究結果は本報告ではページ数の関係で要約のみを掲載した。

懇親会には報告会参加者のほとんどが参加した。まずは別府輝彦理事(東京大学名誉教授)の挨拶があり、次いで原島 俊理事(大阪大学教授)のご発声で乾杯を行った。懇親会では、参加者の間で和やかに歓談が持たれたのに加えて、報告会では十分に出来なかった質疑応答も行われ、また当財団からの寄付により設置された京都大学、北海道大学、九州大学、大阪大学、東京大学、石川県立大学、北里大学の寄付講座の各教員からの挨拶などもあって、異なる分野の研究者の間で賑やかな交換が見られた。報告会と共に交流の場としても十分役だったようで、参加された皆様のご協力に心から感謝致します。来年第 9 回の助成研究報告会は平成 27 年 6 月 5 日(金)に同じ会場で開催します。

以下に報告会、ポスター展示、懇親会の模様の一部を写真で紹介する。

(文) 横田 明

RESEARCH COMMUNICATIONS



開会挨拶  
波多野和徳 理事長



座長 工藤 俊章 先生



座長 今中 忠行 先生



座長 大竹 久夫 先生



座長 木村 光 先生



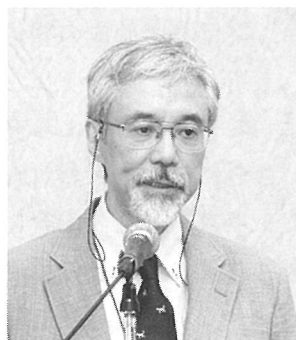
正木 春彦 氏



山本 憲二 氏



妹尾 啓史 氏



秋山 芳展 氏



高 純 氏

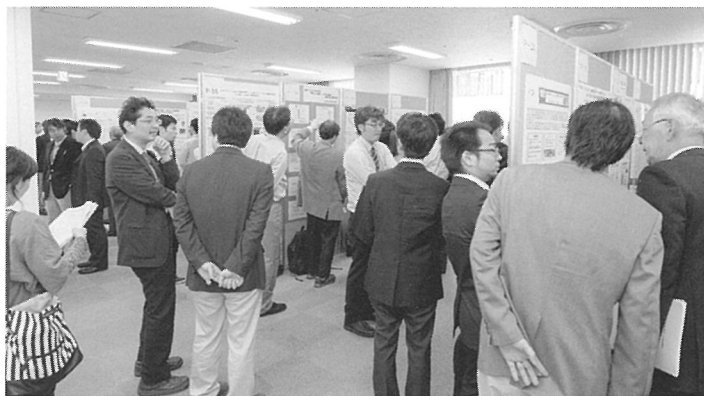


司会  
中濱 一雄 常務理事



講演会

RESEARCH COMMUNICATIONS



ポスター発表



挨拶 別府 輝彦 理事



乾杯 原島 俊 理事



懇親会

# 平成24年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成24年4月～平成26年3月

## コロニー形成の遺伝学

正木 春彦

東京大学大学院農学生命科学研究科  
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

### Genetics of bacterial colony-formation

Haruhiko Masaki

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo  
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Colony-isolation is the first effort spent in every bacterial research. Colony counting is also widely applied to determine the viability of a bacterial culture. But in these decades, it has become understood that the majority of naturally living bacteria can hardly form colonies. Thus, colony-formation is never equivalent to simply being alive but a certain special status of being alive. We have to newly define what is colony-formation. For this purpose, we tried to isolate *Escherichia coli* mutants defective of colony formation, and succeeded in this from a classical temperature-sensitive mutant (ts) collection. This collection consists of mutant strains that can form colonies at 30°C but not at 41°C. We counter-selected the strains from the collection that can grow in a liquid medium at 41°C. From 1432 ts strains of the collection, we eventually isolated a candidate mutant and identified the responsible single ts mutation in the *fabB* gene encoding 3-oxoacyl-ACP synthase I, which is involved in fatty acid synthesis. It was confirmed that this *fabB<sup>ts</sup>-1* strain exhibited very poor colony-forming activity at 41°C with an efficiency of less than 1/1000 of that of liquid cultivation at the same temperature. We expect that our findings draw on a breakthrough in understanding of what is colony formation.

Key words: *Escherichia coli*, colony, fatty acid synthesis, temperature-sensitive mutant, MPN

#### 緒言

寒天等の固体培地上にコロニーを形成させ、そこからバクテリアを単離する純粋分離法は、コッホの時代に確立されて現在に至るまで、すべてのバクテリア研究の第一歩となっている。実験微生物学や公衆衛生学では、生きたバクテリアをコロニー形成能で定義し、計数することが一般に行われている。しかし近年、寒天培地を用いたコロニー法によって単離・培養できるのは、天然のバクテリアのごく一部であるという認識が広まってきた (Staley & Konopka, 1985)。1979年に木暮らは、海洋バクテリアについて、顕微鏡下で伸張分裂できる細胞数を計測する Direct Viable Count (DVC) 法を考案し、その数がコロニー形成数より格段に大きいことを示した (Kogure *et al.*, 1979)。このDVC法を取り入れて Colwell らは、大腸菌やコレラ菌

を、培養後に食塩水や水に懸濁して低温飢餓状態に置くと、DVCが長く保たれている間にもコロニー形成数が急速に落ちていく現象を観察し、生きているが増殖できない Viable but non-culturable (VBNCあるいはVNC) という状態のあることを示した (Xu *et al.*, 1982; Colwell *et al.*, 1985)。このVBNC概念は拡大されて、環境中のほとんどのバクテリア細胞がコロニーを作らない難培養状態にあることのモデルとしても期待されるが、培養によって試料が入手できないだけにそのVBNC状態の実体の解明は進んでいない。

しかし、VBNCの実験は、もともとコロニーを作って培養できるバクテリアでも、生きているのにコロニー形成できない状態に陥ることを実演した点で重要であり、コロニー形成が、単に生きていることと同値ではなく、生きている以上の特殊な状態であることを教えてくれる。では、コロニー形成とは何だったのか、それを改めて明らかにする必要が生じる。何らかの遺伝子発現がコロニー形成を決めているとすれば、どういう遺伝子がどのように関係しているのか。

E-mail: amasaki@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

この疑問に迫るため、我々は大腸菌の、コロニーを作らない変異体を分離しようと考えた。生きていてもコロニーを作らない状態が存在するのだから、遺伝子変異でそれと同じあるいは似た状態が作れるはずである。しかし、今まで分離されてきた変異体はほとんどすべて、最初にコロニーとして分離されている。もしコロニーを作らない変異株が存在するとしても、それを分離するにはまず、コロニー法以外で、コロニー法を包含するような菌の取り扱い法が必要となる。我々は、海洋バクテリアを分離する際に、液体培地限界希釈法（最確数（MPN）法の原理で96穴マルチプレートを用いることにより、菌数推定だけでなく分離も行う方法）を用いると、コロニー法よりも10倍近い数の菌が分離できる経験を持つ（Shigematsu *et al.*, 2007; Shigematsu *et al.*, 2009）。そこで、コロニーを作れない変異株は、液体培地では増殖できるが固体培地では増殖できない変異株として分離できると考えた。また、木暮のDVCは、コロニー数より数桁高い「生菌数」を与えるが、その試料細胞の状態は培地に分散して増殖する液体培養に近いと思われる。その点からも、コロニー形成法の対照として液体培養法を捉えるのは妥当であろう。

本論文では、温度感受性変異ライブラリーから、液体培養できるがコロニーを作らない大腸菌変異株のスクリーニングを試みた結果を報告するが、その前に、より常識的な方法で試みた経験を総括しておきたい。

#### トランスポゾン変異

まず、大腸菌 W3110 株に  $\lambda::Tn5\text{ }CI^{857}P_{am}O_{am}$  を感染させ、96穴マルチプレートに希釈分注して、ゲノムに Tn5 (Km<sup>r</sup>) が挿入した株を液体培養で分離した。これをマスタープレートとして、液体培地と寒天培地にレプリカし、液体培地では増殖するがコロニーは作らないという株のスクリーニングを何度か試みたが、成功しなかった。この方法では、液体培養だけで独立の多数のマスタークローンを用意するのが困難だが、それ以上の問題として、このような単なるレプリカ法では、コロニー形成の「頻度が低下する」ような変異を取り逃す。例えば液体培地で、 $10^9$ /mL まで増えた菌懸濁液を、レプリカピンで  $1\mu\text{L}$  寒天培地に移したとすれば、接種菌数は  $10^6$  個になる。従って、たとえ細胞のコロニー形成頻度を大きく落とす変異が存在したとしても、そのコロニー形成頻度が  $10^6$  未満でない限りコロニーを生じてしまい、候補として見落としてしまう。これはかなり厳しい制限である。もちろん、目的遺伝子のオペロン下流に必須遺伝子があれば、極性効果で分離できない別の問題もある。

#### EMS 変異

大腸菌 W3110 株に EMS（エチルメタンサルホン酸）で変異処理を施した。処理後の菌の生存率を測って処理の強さを調節することは可能だが、この方法も、トランスポゾン法と同じく、液体培養だけで独立の多数のマスタークローンを用意するのが困難で、4200株調べたうちに目的の株は見いだせなかった。また、レプリカ法に伴う問題も上記と同様である。更に、重度の処理ではトランスポゾン法に比べて、多数の変異の混合効果を見てしまうおそれが高くなる。

#### EMS 処理とペニシリンスクリーニング

固体培地で生育しない株を見つけるため、ペニシリンスクリーニングを試みた。上記と同様に EMS 処理した  $10^7\sim 10^8$  の菌を、液体培養後メンブレンフィルター上に集め、フィルターごと寒天培地に移して  $37^\circ\text{C}$  1 時間保温して固体培養に適応させる。これをアンピシリンを含んだ寒天培地上に移し、 $37^\circ\text{C}$  で一晩静置培養する（固体培養で増える菌を殺す）。フィルターから菌を濯ぎだし、希釈してマルチプレートに分注し、濁りを生じた 581 株について、それぞれ 5 段階の 25 倍希釈系列を作り、その系列ごと液体培地と固体培地にレプリカして、生え方に差のあるクローンを探したが、求める株は得られなかった。条件の最適化が不十分なため成功しなかった可能性も否定はできない。

「液体で培養できるがコロニーを作らない」大腸菌変異株を求める以上の試みの失敗を通じ、コロニー形成は確率的事象であると確信した。そうであれば、母集団の個々の株のコロニー形成頻度に注目してスクリーニングする必要がある。そういう全数検査の可能な、温度感受性変異ライブラリーからのスクリーニングを試みることにした。

## 実験方法

#### 菌株と培地

大腸菌 K-12 PA3092 株 (*thyA*, *thr-1*, *leuB-6*, *thi-1*, *argH1*, *hisG1*, *trp-1*, *lacY-1*, *gal-6*, *mtl-2*, *xyl-7*, *malA1*, *ara-13*, *rpsL9*, *tonA2*,  $\lambda^-$ , *supE44*) を親株とする温度感受性変異体コレクション、および変異点のマッピングのための、大腸菌 ORF をプラスミドにクローニングした部分ライブラリーとその供与宿主、大腸菌 K-12 JA200 株 ( $F^+$ , *thr-1*, *leu-6*, *DE(trpE)5*, *recA*, *lacY*, *thi*, *gal*, *xyl*, *ara*, *mtl*) は、西村昭子博士より分与された。使用培地は  $L_T$  培地（1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl,  $40\mu\text{g}/\text{mL}$  チミン）。固体培地としては、国産化学の寒天末を  $L_T$  培地に 1.5% に溶か

して使用した。

固体培養と液体培養の生育の比較

30°C で一夜培養した菌株の一定量を、希釈して寒天培地にまき、30°C あるいは41°C で2日間静置したのち生じたコロニーを計数した。これから制限温度下での原培養液中のコロニー形成頻度 (CFU/mL) を求めた。一方、一定量を、液体培地で希釈したのち、96穴マルチプレートにウェル当たり 120 μL ずつ分注し、30°C あるいは41°C で2日間静置し、濁ったウェルの割合を求めた。ポアソン分布を考慮して原培養液中の増殖を開始した細胞の頻度 (MPN/mL) を求めた。[CFU/MPN] の比で、30°C あるいは41°C における固体培養と液体培養での増殖頻度を比較評価した (Table 1)。

固体培養と液体培養の生育の比較 (簡便法)

多数の *ts* 菌株と様々な培養温度に関して固体培養と液体培養の生育の差を比較するため、以下の簡便法を用いた。調べたい菌株を30°C で一夜液体培養し、この1000倍希釈液をスタートにして、順次3倍11段階の希釈によりマルチプレート上に120 μL ずつ希釈系列を作る。このマスタープレートから、新しいマルチプレートの寒天培地と液体培地とに2 μL ずつレプリカ接

**Table 1** Comparison of CFU and MPN of the *fabB<sup>ts</sup>-I* strain grown at 30°C and 41°C

Temperature	CFU (/mL)	MPN (/mL)	CFU/MPN
30 °C	7.2 x 10 <sup>8</sup>	8.6 x 10 <sup>8</sup>	0.84
41 °C	1.2 x 10 <sup>5</sup>	2.1 x 10 <sup>8</sup>	5.7 x 10 <sup>-4</sup>

種し、各プレートを33°C, 35°C, 37°C, 39°Cに3日間静置したのち、コロニーあるいは濁りを生じた最大希釈度をそれぞれ分子と分母に置いた分数にして比較した (Fig. 1, Table 2)。

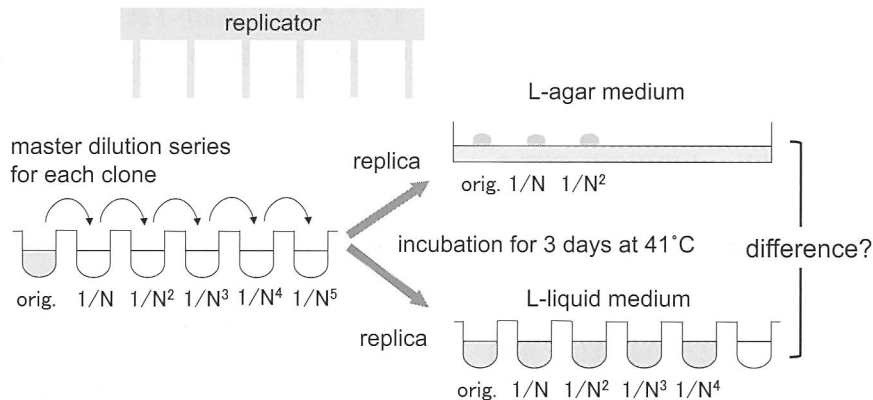
変異点の確認

*fabB<sup>ts</sup>-I* 株の DNA を鋳型にして *fabB* 遺伝子を PCR 増幅し、プラスミド pUC19 の *Bam*HI-*Pst*I 間に一旦クローニングした。次いで、*Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I 酵素消化で得られる *fabB<sup>ts</sup>* 遺伝子の3断片を、pUC19 にサブクローニングしたのち、Thermo Sequence™ サイクルシーケンシングキット (GE Healthcare) と DNA シーケンサー DSEQ-2000L (Shimadzu) を用いて塩基配列を決定した。

**Table 2** Comparison of the growth of seven *fabB<sup>ts</sup>* strains on solid medium and in liquid medium at various temperatures

<i>fabB<sup>ts</sup></i> clone number	33°C		35°C		37°C		39°C	
212	10/10	7/11	7/9	8/10	4/8	3/10	0/2	0/6
458	9/11	8/11	9/9	7/11	7/10	6/10	0/4	1/4
814	7/8	7/8	1/8	1/9	1/2	0/1	0/3	0/2
1153	4/8	5/7	4/5	4/6	5/6	5/7	3/7	4/6
1229	7/9	8/10	8/9	6/9	0/0	0/0	0/0	0/0
1249	7/10	7/9	6/10	7/8	0/3	0/2	0/7	0/1
1251	7/7	7/8	6/6	5/8	0/8	0/8	0/7	1/6

Each numerator and denominator represents the highest dilution factor that yielded a colony and turbidity, respectively. Shaded cells suggest inhibition of colony formation. The test was duplicated.



**Fig. 1** Comparison of growth on solid medium and in liquid medium.

A master dilution series was prepared for each clone and transferred with a replicator to both solid and liquid media. The highest dilution factors giving a colony or turbidity were compared.

## 結 果

## 温度感受性変異体コレクションからのスクリーニング

いわゆる広田の温度感受性変異体コレクションは、大腸菌 PA3092 株を N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで変異処理し、30℃ でコロニー形成するが高温（本実験では 41℃）では形成しない株の集団であり、重要な遺伝子の変異であることが期待できる。液体培養は 30℃ でなされることはあっても通常 41℃ では調べられない。我々は、41℃ において、コロニーは作らないが液体培養でできるような株を探した。

コレクションから任意に取り上げた 1432 個の株をそれぞれ、96 穴マルチプレート上の 150  $\mu$ L の L<sub>T</sub> 培地に植えて 30℃ で一夜培養し、それぞれの 31 倍希釈液 155  $\mu$ L と、さらにその 250 倍希釈液 150  $\mu$ L のウェルを並べたマスタープレートを用意した。一方、新たなプレートのウェルに L<sub>T</sub> 培地を 150  $\mu$ L ずつ分注したものと、L<sub>T</sub> 寒天培地プレートとを用意し、マスタープレートから約 2  $\mu$ L ずつこれらへレプリカ接種した。41℃ で 2 日間静置培養した後、液体培地で濁り固体培地でコロニーを出現させなかった 16 株を、1 次候補株とした。

各候補株を 30℃ で一夜培養後、それぞれの順次 29 倍 5 段階の希釈系列をウェルに並べたマスタープレートを用意し、一方、マルチプレートのウェルに L<sub>T</sub> 培地を 150  $\mu$ L ずつ分注したものと L<sub>T</sub> 寒天培地プレートとを用意し、マスタープレートから約 2  $\mu$ L ずつこれらへレプリカ接種した (Fig. 1)。41℃ で 2 日間静置培養後、液体培地で濁りを生じた最大希釈率と、固体培地でコロニーを出現させた最大希釈率とで、2 段階以上の差の見られた 2 株を 2 次候補とした。

## 変異点の同定

コレクションの各株には多数の変異が入っているの、そのうちどの変異が求める変異点であるか、すなわちどの変異が ts 性を与えているのかを調べる必要がある。注目している ts 株に対し、大腸菌の全 ORF を ColE1 由来プラスミドにクローニングしたライブラリーを、F 因子によるプラスミド可動化で接合伝達し、変異が相補されて 41℃ でコロニーを作れるようになる遺伝子を見つけ、候補株の ts 原因遺伝子を特定した (Saka *et al.*, 2005)。その結果、2 つの候補は、*fabB* と *polA* であることが判った。しかしその後途中から、候補とした *polA* 株では液体/固体培養の差が大きいという表現型が再現できなくなり、1 株の *fabB* 株だけが安定な候補として残った。この株を *fabB*<sup>ts-1</sup> と呼

ぶ。

*fabB* がコードするのは、脂肪酸合成サイクルにおいて、中間体に malonyl-acyl-carrier-protein [ACP] を縮合させると同時に脱炭酸して炭素鎖を 2 つ増やす酵素、3-oxoacyl-ACP synthase I で、特に長鎖の不飽和脂肪酸合成に必要とされる。得られた *fabB*<sup>ts-1</sup> 遺伝子の配列を決定したところ、C が T に変わることにより 405 アミノ酸中 218 番目の Ala が Val に変化していた。

## 固体培養と液体培養での生育比較

*fabB*<sup>ts-1</sup> 株の 30℃ と 41℃ での CFU と MPN を比較したところ (Table 1)、30℃ では固体培養と液体培養とで差がないのに対し、41℃ では、コロニー形成頻度が液体での増殖頻度の 1/1000 以下に低下した。別実験で親株では、温度によらず CFU と MPN で差のないことは確認してある。なお図は示さないが、41℃ での *fabB*<sup>ts-1</sup> 細胞はフィラメント化や肥大化はなく、30℃ での細胞と検鏡下で明確な違いは見られなかった。

スクリーニングで得た株が *fabB*<sup>ts-1</sup> の 1 株だけだったので、同じコレクションの中で今まで *fabB*<sup>ts</sup> として記録されていた 7 株の、液体培養に対する固体培養の増殖頻度を 2 連で比較した (Table 2)。これらの *fabB*<sup>ts</sup> 株は、*fabB*<sup>ts-1</sup> 株よりも 41℃ の液体での生育が悪く、41℃ での固体/液体の生育差が大きく出なかったの、より低い温度での差を調べた。株によって温度に対する感受性が違うが、4 段階（希釈度にして 81 倍）以上の差を仮に有意と見ると、株 212 は 37℃ で、株 814 は 35℃ で、株 1251 は 37℃ と 39℃ で、コロニー形成が悪くなっており、残りの株 458 と 1153 にも同様の傾向が見える。株 1229 と 1249 は 37℃ 以上で生育が悪すぎて差が見えない。以上の結果を考えると、*fabB*<sup>ts</sup> 変異がコロニーを作りにくいのは確かだと思われるが、スクリーニングに採用した 41℃ という選択条件が厳しすぎたために、*fabB*<sup>ts-1</sup> 株 1 つしか取得できなかったという可能性も考えられる。

## 考 察

今回のスクリーニングで、直接分離できたコロニー形成能を大きく損なう変異体は *fabB*<sup>ts-1</sup> の 1 株だけであったが、表現型へ現れる強さの違いはあっても複数の *fabB*<sup>ts</sup> 変異体で類似の表現型が確認できた。スクリーニングで取得したのが 1 例だけというのは何が起こったのか不明で、再現性も疑われかねない。そこで温度条件を緩め、希釈段階も 1 回目よりは細かくとって再度スクリーニングを試みたところ、同じ *fabB* 遺伝子の別の変異点の ts 株が取得された。これにより再現性



は確実にした。さらに、培地にオレイン酸を添加した培養条件で、野生株から *fabB* だけ欠失した変異体を作製することができた。これは、L-broth で植え継ぐことはできても L-寒天培地ではコロニーを形成できない。現在この欠失株を用いて表現型の分析を進めている（投稿準備中）。

なぜ脂肪酸合成がコロニー形成と関係してくるのか。バクテリアが外界で飢餓状態に陥ると、まず糖を消費し、ついで、リボソームなどのタンパク質を消費し、使えるエネルギー源の最後は細胞膜中の脂肪酸なのかも知れない。そうだとすると、そのストレスがなぜ固体培養の方に強く現れるのかは不明である。*fabB* 変異体でコロニーを作らない現象には、固体培地上での *fabB* 変異体の本質的な増殖不全のほか、寒天成分による増殖阻害（野生株では見られない）が加わっていることが判った。また *fabB* 以外の脂肪酸合成系欠損株でも、固体培地での増殖不全が観察された。

まだ、糸口が見えただけであるが、コロニーを極端に作らなくなる状態が、遺伝子変異で達成できた意義は大きい。また、コロニー形成は、yes か no かではなく確率的に決まるプロセスである可能性が高くなった。自然界の膨大な微生物資源に繋がるはずのコロニー形成研究の、難しさと新しさもそこにあるように思われる。

コロニーを作らない変異株を分離するために、本研究のようにローテクで迫るのであれば、コロニー培養を相対化する対照手法として液体培養法を考えるほかなかったが、液体培養ならすべての難培養バクテリアを扱えるという保証はない。従って、今回分離した変異株は、固体培養と液体培養の差を埋めるだけであって、その先に液体培養も難しいほんとうの難培養バクテリアが控えている、のかどうか、は不明である。また環境中のバクテリアは、もちろん *fabB* 変異株ではない。*fabB* 変異体の示す性質が、環境中のバクテリアの何を伝えているかが最終的な興味である。

この一方、コロニー形成できない変異の追求とは逆のアプローチで、コロニー形成を高く保つような遺伝因子の探索の取り組みも現在進めている。

## 要 約

バクテリア研究ではコロニーを形成させることがその第一歩であり、生菌数もコロニー形成能で定義されることが多い。しかし近年、自然界で生きているバクテリアのほとんどはコロニー形成できない状態にあることが認識されるようになった。すなわち、コロニー形成とは、生きていることと同値ではなく、そのうち

の特殊なプロセスであり、コロニー形成とは何かを改めて明らかにする必要性が生じた。そのため我々は、コロニー形成できない大腸菌変異株の分離を試み、最終的に、温度感受性変異コレクションから、41℃の液体培地では増殖できるが41℃の寒天培地にコロニーを極めて作りにくい性質の *fabB* 株を取得した。液体培地での増殖を MPN で測定しコロニー形成数と比較すると、寒天培地での増殖は液体培地の 1/1000 以下であることが判明した。同コレクションの既知の *fabB* 変異株の多くが、高温で同様のコロニー形成不全を示したが、その感受性温度域は41℃より低く様々であった。現在は野生株から *fabB* 欠失株を作製して、その性質やコロニー形成との関係を分析している。

## 本助成で得られた研究成果の報告

- 1) 安原幸司, 池端佑仁, 三井智玄, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦 (2012) 大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分離. 日本農芸化学会2012年度大会 (京都)
- 2) 三井智玄, 安原幸司, 池端佑仁, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦 (2012) 大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の分析. 日本農芸化学会2012年度大会 (京都)
- 3) 三井智玄, 納庄一樹, 高丸玲子, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦 (2013) 大腸菌のコロニー形成能を失った変異株の性質. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台)
- 4) 納庄一樹, 三井智玄, 池端佑仁, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦 (2014) 固体培地での生育能の低下した大腸菌変異株の分析. 日本農芸化学会2014年度大会 (東京)
- 5) 高丸玲子, 森本亜希子, 西尾優宏, 小川哲弘, 日高真誠, 正木春彦 (2014) 大腸菌の VBNC 化を緩和する遺伝子のスクリーニング. 日本農芸化学会2014年度大会 (東京)

## 謝 辞

本研究に対し、2年間研究助成を頂いた公益財団法人発酵研究所に感謝いたします。温度感受性変異体ライブラリーの恵みから、その取扱い、遺伝子マッピングまで丁寧なご指導を給わった西村昭子先生に御礼申しあげます。出口の見えない間でも学生として辛抱強く研究を進めてきた際本玲子、中野園子、安原幸司の諸君に感謝します。

## 文 献

- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A. & Palmer, L. M. (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technol.* 3: 817-820.

- Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415–420.
- Saka, K., Tadenuma, M., Nakade, S., Tanaka, N., Sugawara, H., Nishikawa, K., Ichiyoshi, N., Kitagawa, M., Mor, H., Ogasawara, N. & Nishimura, A. (2005). A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res.* **12**: 63–68.
- Shigematsu, T., Hayashi, M., Kikuchi, I., Ueno, S., Masaki, H. & Fujii, T. (2009). A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**: 240–247.
- Shigematsu, T., Ueno, S., Tuchida, Y., Hayashi, M., Masaki, H. & Fujii, T. (2007). Comparative analyses of viable bacterial counts in foods and seawater under microplate based liquid- and conventional agar plate cultivation: increased culturability of marine bacteria under liquid cultivation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **71**: 3093–3097.
- Staley, J. T. & Konopka, A. (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann Rev Microbiol.* **39**: 321–346.
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D.J. Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313–323.

# 新しい発想による機能性糖化合物の微生物酵素合成と その応用の展開

山本 憲二

石川県立大学生物資源工学研究所

〒921-8836 石川県野々市市末松1-308

Studies on enzymatic syntheses of bioactive carbohydrate compounds using  
microbial enzyme on the basis of novel idea and the development of its application

Kenji Yamamoto

Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University

1-308, Suematsu, Nonouchi, Ishikawa, 921-8836, Japan

Methods involving addition of oligosaccharides to various compounds have attracted attention as efficient techniques in glycotchnology. Recently, the method involving the transglycosylation activity of endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* (Endo-M) is developed and the exploration of oligosaccharide oxazolines as donor substrates for the transglycosylation of this endoglycosidase has significantly enhanced the efficiency of the process. Moreover, discovery of novel endoglycosidase mutants with glycosynthase-like activity has made it possible to effectively synthesize a large quantity of glycopeptides as well as the homogeneous glycoprotein. The use of mutant enzymes and oligosaccharide oxazolines has led to development of practical applications for the synthesis of bioactive carbohydrate compounds and therapeutic glycoproteins as biomedicines.

In this study, we found the efficient glycosynthase mutant N175H derived from Endo-M, which possess enhanced transglycosylation activity. Using N175H mutant, we succeeded in exchange of high-mannose type oligosaccharides on recombinant human immunoglobulin G produced by yeast to sialo-complex type oligosaccharides which are human-compatible oligosaccharides. The result indicates that this method is effective for practical use for producing pharmaceutical glycoproteins expressed by different cell expression system. We also synthesized sialylglycopolymer with a chitosan backbone as inhibitor for influenza virus infection using the transglycosylation activity of Endo-M. The inhibitor possessed high affinity to hemagglutinin of virus and hemagglutination inhibition activity.

Key words: endoglycosidase, transglycosylation, remodeling of sugar chain, influenza virus infectious inhibitor, bioactive carbohydrate compound

## 緒言

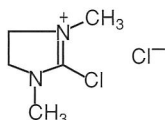
糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の多彩な構造の糖鎖はさまざまな生命現象において重要な役割を果たしている。糖鎖は核酸やタンパク質と並んで生命に

おける「第三の鎖」と呼ばれており、「糖鎖工学」は遺伝子工学やタンパク質工学と並ぶ重要な研究分野である。糖鎖をタンパク質などに付加することや天然に存在する糖鎖を改変して目的の機能を持つ糖鎖を創り出すことは遺伝子工学やタンパク質工学だけでは実現できない新しい機能を付加する技術として、糖鎖工学における重要な課題である。しかしながら、その技術や手段は遺伝子工学やタンパク質工学の域に達していない。

我々は遺伝子工学において遺伝子を切ったり貼ったりする制限酵素などと同じような働きをする手段として、微生物のエンド型のグリコシダーゼ（糖質分解酵

E-mail: yamamotk@ishikawa-pu.ac.jp

2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC)



素)に着目した。すなわち、我々が土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産するエンド型グリコシダーゼのエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-M) は糖タンパク質の *N*-グリコシド結合糖鎖をタンパク質から遊離する加水分解活性とともに、遊離した糖鎖を水酸基を有する化合物 (受容体) に転移付加する糖転移活性を有することを見出し (Yamamoto *et al.*, 1994) (Fig. 1), その特異な活性を利用して、これまでにさまざまな化合物に糖鎖を付加 (グリコシレーション) して、生理活性糖ペプチドなどの機能性糖化合物を合成した (Yamamoto *et al.*, 1998)。さらに、本酵素が substrate-assisted catalytic mechanism というユニークな反応機構によって酵素反応が進行することを見出し (Fujita *et al.*, 2001), その知見を基にして、酵素反応中間体であるオキサゾリン型糖鎖を合成して供与体として用いることにより効率的に糖鎖の転移生成物が得られることを見出した (Umekawa *et al.*, 2010b)。また、オキサゾリン型糖鎖を供与体とする糖転移反応において、部位特異的変異酵素である N175Q により、高い収率で生成物が得られる革新的な糖鎖転移生成物の生産方法を確立した (Umekawa *et al.*, 2010a)。この方法によって、物質生産レベルで本酵素を用いることが可能になった。そこで、この酵素法の応用を展開して、さまざまな有用な機能性を有する糖化合物を合成することを研究目的とし、バイオ医薬品やインフルエンザウイルス感染阻害剤の合成を試みるとともに、その効率的な合成法の確

立を検討した。

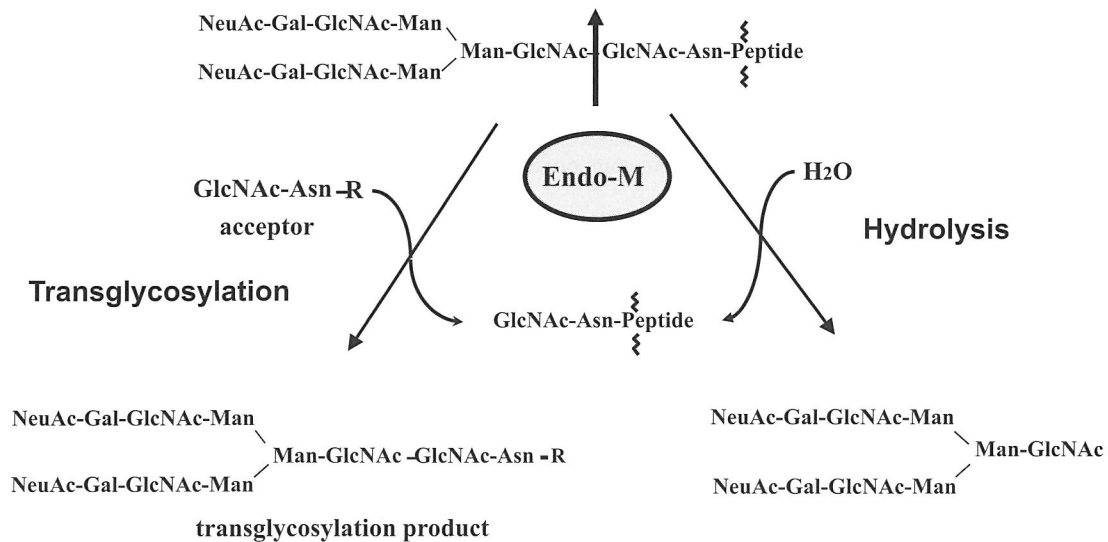
## 実験方法

### オキサゾリン型シアロ糖鎖の合成

ニワトリ卵黄から抽出したシアロ糖ペプチド (シアロ複合型二本鎖糖鎖を含む 6 残基のアミノ酸からなるペプチド) 80 mg に 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) の存在下で Endo-M 酵素標品 50  $\mu$ g を添加し、30°C で一夜反応して糖ペプチドよりシアル酸を含むシアロ糖鎖を遊離させた後、反応液を Sephadex G-25 ゲルろ過カラムに供し、遊離糖鎖を分画精製して凍結乾燥した。得られた粉末 (80 mg) を水に溶解し、45 等量のトリエチルアミンの存在下で 15 等量の 2-Chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC: 脚注参照) を添加して、氷上で 1 時間、縮合反応を行い、オキサゾリン型シアロ糖鎖を合成した。さらに 0.01% アンモニアを含む溶媒でゲルろ過して精製単離し、凍結乾燥した。

### 変異酵素の発現・精製

Endo-M の *N*-末端より 175 番目のアミノ酸をアスパラギン以外のさまざまなアミノ酸で置換した部位特異的変異体酵素をコードしたプラスミド pET23b を導入した組換え大腸菌 DH5 $\alpha$  をアンピシリンを含む LB 液体培地にて 19°C で 38 時間振とう培養した。培養菌体より Bug Buster でタンパク質を抽出して無細胞抽出液を



**Fig. 1** Enzymatic action of endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* (Endo-M). Abbreviations used: NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid); Gal, D-galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Man, D-mannose.

調製し、ニッケルカラム (Hi-trap chelating column) に供した後、100 mM イミダゾール、20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl の混合溶液によって酵素を溶出した。

#### エンドグリコシダーゼの酵素活性の測定

*Mucor hiemalis* のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼである Endo-M およびその変異酵素の加水分解活性については基質としてニワトリ卵黄由来のシアロ糖ペプチド (7.5 mM) を用いて、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で 30°C にて酵素反応を行い、逆相カラム (Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR-II) を用いた HPLC によって 214 nm における紫外吸収を測定し、加水分解反応の生成物を分析した。一方、糖転移活性については 10 mM パラニトロフェニール N-アセチルグルコサミニド (pNP-GlcNAc) を受容体とし、7.5 mM のシアロ糖ペプチドまたはオキサゾリン型シアロ糖鎖を供与体として、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) 中で 30°C にて酵素反応を行い、上記と同様の逆相カラムを用いた HPLC によって、280 nm における紫外吸収を測定して、反応生成物を分析した。

#### 糖タンパク質酵素の糖鎖リモデリング

糖タンパク質酵素であるウシ膵臓リボヌクレアーゼ B (RNase B) を放線菌由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼである Endo-H で処理して、1 残基の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のみが付加した RNase を得て、この酵素の糖鎖リモデリングを行った。すなわち、糖鎖供与体として 80 mM のオキサゾリン型シアロ糖鎖を用い、0.1 mM の GlcNAc-RNase B を受容体として、20 μg の N175Q 変異酵素により、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) の存在下で糖転移反応を行った。反応液を 150 mM の NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を溶出液としてゲルろ過して糖転移生成物を単離した。

#### 組換えヒト免疫グロブリン G の糖鎖リモデリング

産業技術総合研究所の千葉靖典博士より恵与された酵母 (*Ogataea minuta*) を宿主として発現した組換えヒト IgG に Endo-H を作用させ、Fc 領域の重鎖の N-グリコシド結合個所に GlcNAc のみが残った IgG を得た。この組換えヒト IgG 20 μg に変異酵素 N175H 10 μg とシアロ糖ペプチド 20 mM を加えて、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) の存在下で 200 μl にて糖転移反応を行った。反応液の分析は SDS-PAGE を行った後、ヒト IgG 抗体を用いたウエスタンブロットリングを行い、シアロ糖鎖の検出にはシアル酸に特異

的な SNA (西洋ニワトコ) レクチンを用いたブロットリングを行った。

#### インフルエンザウィルス捕捉型感染阻害剤の合成

インフルエンザウィルス捕捉型感染阻害剤の化学酵素合成は以前に実施した方法に従って行った (Umamura *et al.*, 2008)。シアロ糖ペプチド (572 mg) を供与体とし、p-Formylphenyl GlcNAc (248 mg) を受容体として 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) の存在下で、30°C、16時間、Endo-M による糖転移反応を行ってシアロ糖鎖を受容体に転移付加した糖鎖転移生成物 (106 mg) を得た。得られた糖転移生成物 (7.2 mg) にキトサン (1.2 mg) を加えた溶液に 0.1 M Sodium cyanocarbohydrate のメタノール溶液を添加して、37°C で 2 日間、還元アミノ化反応を行い、キトサンにシアロ糖鎖が多価に結合したポリマーをインフルエンザウィルス捕捉型感染阻害剤として得た。

#### インフルエンザウィルス感染阻害試験

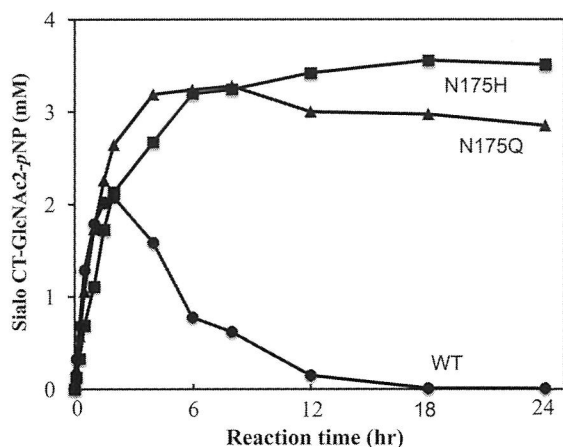
96穴プレート上に MDCK (Madine-Darby canine kidney) 細胞を撒いて一夜培養し、ウェルの底に細胞の層を形成させた。次いで、PBS に溶解した阻害剤を倍々希釈した後、ヒト A 型インフルエンザウィルスの A/New Caledonia (H1N1) 株の溶液 (4.0 × 10<sup>5</sup> CIU/ml) と混合して 25°C で 1 時間反応させ、反応液を各ウェルの MDCK 細胞層上に 40 μl 添加して CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて 1 時間、ウィルスを細胞に吸着させた。さらに、培養液を交換した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、14 時間培養した。培養液を除去した後、1% パラホルムアルデヒド PBS 溶液で 1 時間固定し、さらに 1% Triton X-100 で 15 分間処理した後、抗 A 型インフルエンザウィルスのマウス由来モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法により感染細胞を染色し、蛍光顕微鏡にて陽性細胞数をカウントした。感染率はコントロールとして阻害剤を含まない PBS 溶液をウィルスと反応させた時の陽性細胞数を分母として % で表した。

## 結 果

### 高い糖転移活性を有する Endo-M の変異酵素の取得とその性質

従来、高い糖転移活性を有し、加水分解活性が抑制されたグライコシターゼ様の活性を有する Endo-M の変異酵素として N175Q を取得している (Umekawa *et al.*, 2010b)。この変異酵素はオキサゾリン型糖鎖を

供与体とした糖転移活性の比活性が高い酵素である。そこで、N175 部位におけるアミノ酸置換した変異酵素について、シアロ糖ペプチドおよびオキサゾリン型シアロ糖鎖を供与体として糖転移反応を行い、糖転移生成物の収率を調べたところ、N175H 変異酵素が



**Fig. 2** Transglycosylation reaction of N175Q and N175H mutants using sialo-glycopeptide as a donor substrate and *p*NP-GlcNAc as an acceptor substrate. The transglycosylation reactions were carried out using 7.5 mM sialo-glycopeptide as a donor and 10 mM *p*NP-GlcNAc as an acceptor. The products were quantified by RP-HPLC. Symbols: squares, N175H; triangles, N175Q; circles, Endo-M wild type.

N175Q と同等、あるいはそれ以上の高い収率で糖転移生成物を生成することを見出した。とりわけ、長時間の反応において、糖転移生成物の収率が N175Q に比較してやや高いことを見出した (Fig. 2)。そこで、本変異酵素について、糖転移反応の至適 pH や至適温度などの反応条件を検討するとともに酵素学的な解析を行った。その結果、N175Q と至適 pH (pH 6.0) や至適温度 (30°C) に大きな相違は見られず、基質に対する *kcat*/*Km* 値も大きな差は見られなかった (Table 1)。N175Q および N175H はいずれもグライコシターゼ様の活性を示すが、糖転移反応において、オキサゾリン型シアロ糖鎖のみならず、シアロ糖ペプチドも糖鎖供与体として有効であることを見出したので、両変異酵素を用いる場合はシアロ糖ペプチドを糖鎖供与体として用いることも検討した。

#### 糖タンパク質糖鎖のリモデリング

これまでに見出されている微生物のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼは糖タンパク質の N-結合型糖鎖のなかでも酵母やカビなどの真核微生物の糖タンパク質に主として存在する比較的単純な構造の高マンノース型糖鎖 (マンノースのオリゴマー) や混成型糖鎖 (高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖の混成糖鎖) には作用するが、ヒトや動物など由来の糖タンパク質に存在する複雑な構造の複合型糖鎖に対しては全く作用しない。一方、Endo-M はいずれのタイプの糖鎖に対しても作用するという特徴がある。そこで、この特徴を

**Table 1** Kinetic parameters of Endo-M mutants for transglycosylation and hydrolysis reactions

Transglycosylation reaction						
Enzyme	Sialoglycopeptide			<i>p</i> NP-GlcNAc		
	<i>kcat</i>	<i>Km</i>	<i>kcat</i> / <i>Km</i>	<i>kcat</i>	<i>Km</i>	<i>kcat</i> / <i>Km</i>
	<i>min</i> <sup>-1</sup>	<i>mM</i>	<i>min</i> <sup>-1</sup> <i>mM</i> <sup>-1</sup>	<i>min</i> <sup>-1</sup>	<i>mM</i>	<i>min</i> <sup>-1</sup> <i>mM</i> <sup>-1</sup>
N175H	143	85.8	1.67	40.0	1.91	20.9
N175Q	248	118	2.09	76.5	2.03	37.7
WT	656	5.01	131	529	4.15	127

Hydrolysis reaction			
Enzyme	Sialoglycopeptide		
	<i>kcat</i>	<i>Km</i>	<i>kcat</i> / <i>Km</i>
	<i>min</i> <sup>-1</sup>	<i>mM</i>	<i>min</i> <sup>-1</sup> <i>mM</i> <sup>-1</sup>
N175H	92.2	55.0	1.68
N175Q	145	56.5	2.56
WT	385	2.41	160

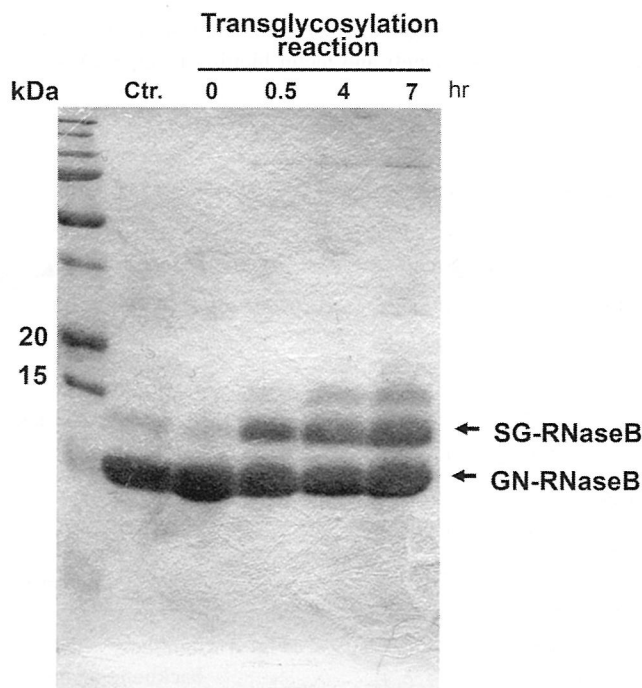
利用することによって、Endo-Mの糖転移活性により糖タンパク質の糖鎖のすげ替え（リモデリング）を行った。すなわち、糖タンパク質の糖鎖をヒト型の複合型糖鎖に変換することによって、ヒトに適応した糖タンパク質を創製することを企てた。

まず、糖鎖のリモデリングと糖鎖構造が均一な糖タンパク質を得る目的で、高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質性酵素のウシ膵臓 RNase B を用いて検討した。すなわち、RNase B に付加している 1 本の高マンノース型糖鎖を *Streptomyces plicatus* 由来の Endo-H を用いて切断し、1 残基の GlcNAc のみが付加した RNase について、N175Q 変異酵素を用いて複合型二本鎖のオキサゾリン型シアロ糖鎖を供与体とする糖転移反応によって糖鎖付加を行った。その結果、シアロ複合型二本鎖糖鎖のみを有する RNase B が得られ、高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質を複合型糖鎖を持つ糖タンパク質に変換することに成功した (Fig. 3)。

#### 酵母で発現した組換え免疫グロブリンの糖鎖のヒト型糖鎖への改変

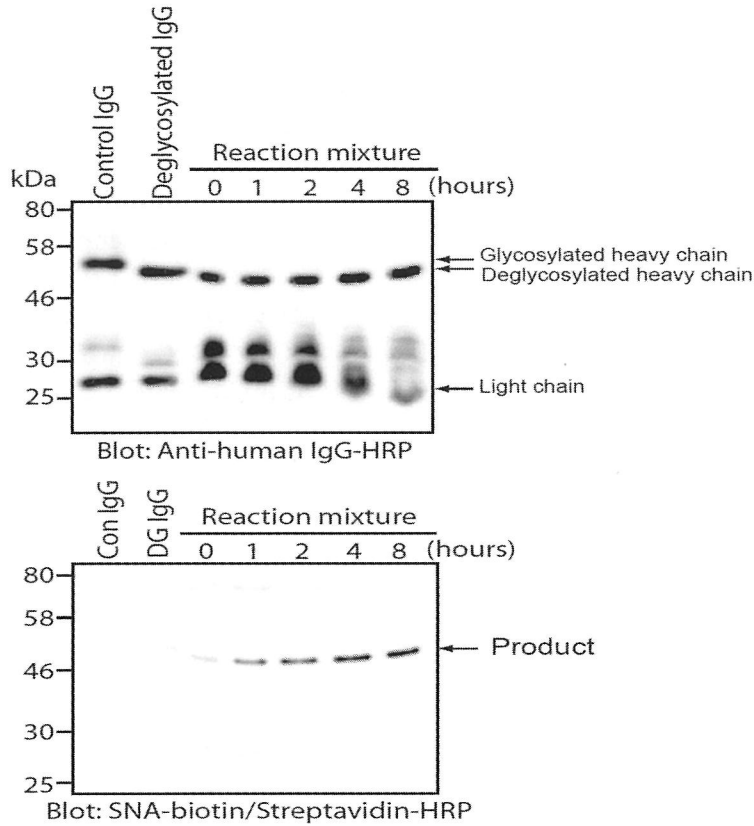
抗体医薬品として重要なヒト免疫グロブリン G (IgG) は重鎖と軽鎖と呼ばれるタンパク質からなる

糖タンパク質性の抗体であるが、Fc 領域の重鎖の部分に N-結合型糖鎖が存在し、抗体としての機能の発現に大きな役割を果たしている (Jefferis, 2009)。ヒト免疫グロブリンのような糖タンパク質を酵母で発現させた組換え糖タンパク質は酵母に特有の巨大なマンノースのオリゴマーを有し、ヒトに対して強い抗原性を発揮するため、酵母に比べて生産性が低いにもかかわらず、その生産には CHO 細胞などの動物細胞を用いて行われている。そこで、酵母で発現した組換えヒト免疫グロブリン G の糖鎖をヒト型糖鎖に改変して、ヒトに適合した抗体医薬としての IgG の生産を試みた。すなわち、酵母 (*Ogataea minuta*) で発現した組換えヒト IgG のマンノースのオリゴマーを Endo-H で切断した後、GlcNAc 1 残基を有する IgG を得て、シアロ糖ペプチドを糖鎖供与体とした N175H 変異酵素の糖転移反応によりヒト型のシアロ複合型糖鎖を導入した。シアロ糖鎖が GlcNAc-IgG に経時的に導入されたことはシアル酸に特異的なレクチンである SNA レクチンによって確認した (Fig. 4)。すなわち、酵母で発現させた組換え IgG をヒト型糖鎖を持つバイオ抗体医薬品として生産することに成功した。



**Fig. 3** Enzymatic remodeling of sugar chain on RNase using N175Q with sialo-complex-type sugar oxazoline as a donor.

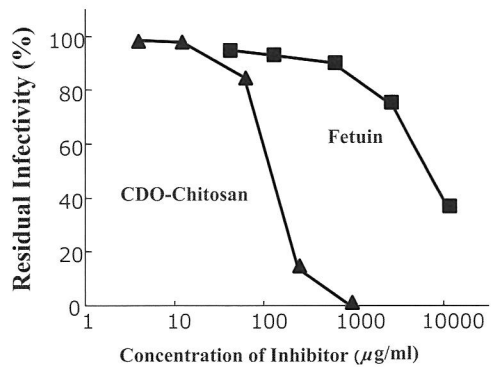
The reaction mixtures were analyzed by SDS-PAGE. SG-RNaseB: RNase having sialo-complex-type sugar chain; GN-RNaseB: RNase having GlcNAc residue.



**Fig. 4** Enzymatic change of sugar chain on recombinant human IgG using N175H with sialoglycopeptide as a donor. The reaction mixtures were analyzed by SDS-PAGE and followed by the western blotting using anti-human IgG-HRP (upper panel) and lectin blotting using SNA-biotin/streptavidin-HRP (under panel).

ヒトインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤の合成

ヒトインフルエンザウイルスはヘマグルチニンを受容体として宿主細胞膜上に存在するシアロ糖鎖の非還元末端のシアル酸に結合し、細胞に感染して細胞内で複製した後、自身を持つシアリダーゼ（シアル酸分解酵素）によってヘマグルチニンと結合したシアル酸を切断し、宿主細胞から出芽する。インフルエンザの治療薬として広く用いられているタミフルはこのシアリダーゼの阻害剤であって宿主細胞にウイルスが感染した後の増殖段階に限って有効であり、感染そのものを避けることはできない。一方、ヘマグルチニンのシアル酸への結合を阻害するような競合阻害剤はインフルエンザウイルスの宿主への感染そのものを阻害することができるために、感染予防に有効であると考えられる。そこで、シアロ糖鎖のポリマーの化学-酵素合成を試みて、ウイルスの捕捉型感染阻害剤としての有効性を調べた。すなわち、ニワトリ卵黄由来のシアロ糖ペプチドのシアロ糖鎖を Endo-M の糖転移活性を用いて



**Fig. 5** Inhibitory activity of sialylglycopolymer with a chitosan backbone against influenza virus infection of MDCK cells.

A/New Caledonia/20/99 (H1N1) influenza virus was inoculated into MDCK cells after incubation with sialylglycopolymer. Infected cells were stained by the indirect immunofluorescent method.



*p*-Formylphenyl GlcNAc に転移付加し、これをリンカーとしてキトサンに多価に還元アミノ化反応によって付加した。得られたシアロ糖鎖ポリマーについて、ヒトインフルエンザ A 型の New Caledonia (H1N1) 株について MDCK 細胞への感染阻害活性を調べた結果、コントロールのシアロ糖タンパク質であるフェツインに比較して 100 倍以上の感染阻害活性が示された (Fig. 5)。

## 考 察

本研究は複雑な構造を持つ「糖鎖」を一段階の酵素反応によって化合物に効率的に付加して、機能性糖化合物を合成することを目的とし、その手段として微生物の特異なエンドグリコシダーゼを用いて行うことを課題とした研究である。同時に、多様な構造の糖鎖を有する動物細胞由来のバイオ医薬品としての高品質な「バイオシミラー Bio-similar」が求められる糖鎖の均一性に対応することを課題とした研究でもある。

Endo-M は他の微生物に広く分布するエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼとは異なり、ヒトや動物の糖タンパク質に存在するシアロ複合型糖鎖に対して良く作用する特異な酵素であり、さらに substrate-assisted catalytic mechanism というユニークな反応機構によって触媒反応が進行する酵素であることを我々は見出している (Fujita *et al.*, 2001) (Fig. 6)。この反応機構においては、ほとんどの糖加水分解酵素 (グリコシダーゼ) が有する酸/塩基触媒残基と求核残基の 2 つの活性残基が酵素タンパク質に存在せず、酸/塩基触媒残基のみが存在し、反応基質のアセトアミド基が求核残基となって、酵素反応中間体は糖とタンパク質の複合体ではなく、オキサゾリン化合物が反応中間体になる。このような機構によって反応が進む酵素タンパク質には活性中心付近にオキサゾリン化合物の形成に重要と考えられる残基が高度に保存されていることが示唆されている (Williams *et al.*, 2002)。Endo-M についても活性中心である N-末端から 177 番目のグルタミン酸の近傍の 175 番目にアスパラギン残基が同じ

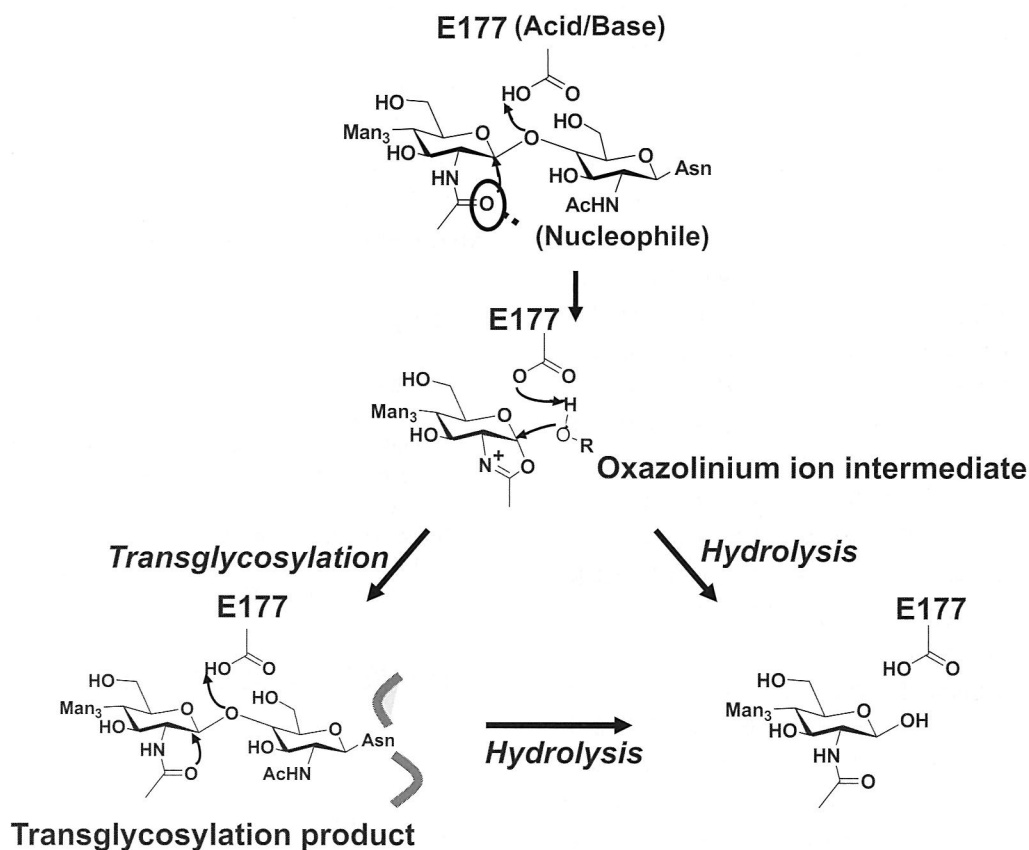


Fig. 6 Substrate-assisted catalytic mechanism of Endo-M.

ファミリーに属する酵素 (Glycoside Hydrolase 85) において高度に保存されていることが見出され、この部位にグルタミン残基を導入した変異酵素 N175Q は加水分解活性が抑制され、糖転移活性が促進された変異酵素であることを明らかにしている (Umekawa *et al.*, 2010b). すなわち、N175Q 変異酵素はオキサゾリン化合物を基質として反応することにより、グライコシクターゼ様の活性を示して、糖転移生成物が加水分解されずに蓄積されていくというユニークな酵素である。本研究ではヒスチジン残基を導入した N175H も N175Q に比較してそれほど劣ることなく、糖転移反応生成物を得ることができ、グライコシクターゼ様の活性を示すことを見出した。何故、ヒスチジン残基がグルタミン残基と同様の活性を示すのか、不明であるが、至適 pH や至適温度などの酵素的性質、 $k_{cat}/K_m$  はいずれの基質に対しても大きな差異はない。このような変異酵素とオキサゾリン型糖鎖を用いて糖転移反応を行うことによって、物質生産レベルで糖鎖を有する機能性化合物を得ることが可能になった。

最近、バイオ医薬品に関する議論が盛んになってきたが、その背景には2015年ごろにバイオ医薬品の特許切れがピークを迎えることがあり、それに関してバイオ医薬品の中でも多数を占める糖タンパク質医薬品の後発品について、先行品と同じ効果を持つかということや安全性の問題がある。なかでも糖タンパク質医薬品の薬効に重要な役割を果たす「糖鎖」の修飾に関わる技術的な課題が挙げられ、先行品との同質性、同等性が追求される上で、付加している糖鎖の均一性が求められる。すなわち、高品質な「バイオシミュラー」の開発が重要になって来た。このような現状において、ヒト型糖鎖を転移付加することができる Endo-M は重要な機能性糖鎖化合物を合成する上で非常に貴重なツールとなる。我々が本研究において、酵母で生産された組換え糖タンパク質を効率よくヒト型糖鎖を持つ糖タンパク質に変換することができることを明らかにしたことは、将来、バイオ医薬品の大量生産に繋がるものと期待される。次世代の医薬品として注目されている抗体医薬品の免疫グロブリンをヒトに適合した組換え糖タンパク質に変換する技術を開発することができたことは大きな進歩である。

また、我々は Endo-M の糖転移活性を活用して、ヒトインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤を作成することを企てた。これはヒトインフルエンザウイルスが細胞膜上のシアロ糖鎖の非還元末端にある  $\alpha 2,6$ -結合したシアル酸を認識して結合することを利用したもので、重篤な症状を引き起こすインフルエンザ A 型ウイルスを極めて有効に捕捉することが示された。この捕

捉型感染阻害剤はニワトリ卵黄から得られる糖ペプチドやカニから得られるキトサンを材料として合成することができるので、ヒトに無害な化合物としてさまざまな分野で利用できるものと考えられる。将来的にはマスクや空気清浄機などに封入して、インフルエンザウイルスを排除することができることと考えている。

## 要 約

本研究では Endo-M の特異な糖転移活性を用いることにより機能性糖化合物を合成する新しい技術を進展させ、実際の応用に展開した。従来、オキサゾリン型糖鎖とグライコシクターゼ様の活性を持つ部位特異的変異酵素によって効率的に糖転移生成物を生成する方法を確立して来たが、変異酵素について検証した結果、より効果的な変異酵素 N175H を取得した。この変異酵素 N175H とオキサゾリン型シアロ糖鎖を用いた糖タンパク質糖鎖のリモデリングを行った。抗体医薬であるヒト IgG を酵母で発現させた組換え IgG の糖鎖を除去した後、ヒト型糖鎖であるシアロ複合型糖鎖を N175H 変異酵素によって転移付加して、ヒト型糖鎖を有する IgG に変換した。すなわち、酵母で生産させた組換え糖タンパク質をヒト型糖鎖を有する糖タンパク質に変換する酵素法を確立した。また、Endo-M の糖転移活性を利用することによって、シアロ複合型糖鎖をキトサンに多価に結合させた糖鎖ポリマーをインフルエンザウイルスの捕捉型感染阻害剤として合成した。この阻害剤はインフルエンザ A 型ウイルスの MDCK 細胞への強い感染阻害活性を示した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 坂口広大, 山本憲二 (2013) *Mucor hiemalis* 由来 endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (Endo-M) の変異酵素の解析とその応用. 第65回日本生物工学会大会 (広島)
- 2) 坂口広大, 加藤紀彦, 山本憲二 (2014) 変異酵素 Endo-MN175H の酵素学的解析と効率的な糖転移反応の検討. 2014年度日本農芸化学会大会 (川崎)

## 保存機関に寄託した菌株

なし

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成いただきました公

益財団法人発酵研究所に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- Fujita, M., Shoda, S., Haneda, K., Inazu, T., Takegawa, K. & Yamamoto, K. (2001). A novel disaccharide substrate having 1,2-oxazoline moiety for detection of transglycosylating activity of endoglycosidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1528**: 9–14.
- Jefferis, R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**: 226–234.
- Umekawa, M., Higashiyama, T., Koga, Y., Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., Shoda, S., Huang, W., Wang, L.-X., Ashida, H. & Yamamoto, K. (2010a). Efficient transfer of sialo-oligosaccharides onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**: 1203–1209.
- Umekawa, M., Li, C., Higashiyama, T., Huang, W., Ashida, H., Yamamoto, K. & Wang, L.-X. (2010b). Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural *N*-glycan. *J. Biol. Chem.* **285**: 511–521.
- Umemura, M., Itoh, M., Makimura, Y., Yamazaki, K., Umekawa, M., Masui, A., Matahira, Y., Shibata, M., Ashida, H. & Yamamoto, K. (2008). Design of a sialylglycopolymer with a chitosan backbone having efficient inhibitory activity against influenza virus infection. *J. Med. Chem.* **51**: 4496–4503.
- Williams, S.J., Mark, B.L., Vocadlo, D.J., James, M.N. & Withers, S.G. (2002). Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state. *J. Biol. Chem.* **277**: 40055–40065.
- Yamamoto, K., Fujimori, K., Haneda, K., Mizuno, M., Inazu, T. & Kumagai, H. (1998). Chemo-enzymatic synthesis of a novel glycopeptide using a microbial endoglycosidase. *Carbohydr. Res.* **305**: 415–422.
- Yamamoto, K., Kadowaki, S., Watanabe, J. & Kumagai, H. (1994). Transglycosylation activity of *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase which transfers complex oligosaccharides to the *N*-acetylglucosamine moieties of peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 244–252.

# 土壌メタゲノム・菌株ゲノム情報を活用した農耕地からの 亜酸化窒素ガス発生原因微生物の特定・分離と性状解析

妹尾 啓 史

東京大学大学院農学生命科学研究科

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

## Identification of N<sub>2</sub>O-generating microorganisms in agricultural field by utilizing genomic information

Keishi Senoo

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Denitrification, the microbial nitrate reduction to gaseous nitrogen (N) such as nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) and dinitrogen gas (N<sub>2</sub>), is an important process in the global N cycle, because it causes the N loss from environments and generates N<sub>2</sub>O which is one of greenhouse gases and ozone depleting substances. Agricultural soil is a major source of artificial N<sub>2</sub>O emission, largely through denitrification. In the denitrification, nitrite reduction to nitric oxide (NO) is the crucial step and catalyzed by the nitrite reductase (NirK and NirS). Therefore, biogeochemical and ecological roles of denitrifiers in environments have been studied using the NirK and NirS genes (*nirK* and *nirS*); however, recent genome-based studies strongly indicated that we have analyzed only a limited range of the genes in environments. Here, we firstly demonstrated a comprehensive phylogenetic analysis of the *nirK* and *nirS* genes, then revealed their distribution and abundance in environments and finally assessed the functional importance of the denitrifiers having the unrealized *nirK* or *nirS* gene. The *nirK* and *nirS* phylogenies were divided into four and three divergent clusters based on the amino acid sequences, respectively, in which three *nirK* and two *nirS* clusters have been rarely analyzed in many previous studies. We designed the specific primers and revealed that such unaccounted genes were widely and abundantly distributed in terrestrial environments through the clone library and quantitative PCR methods using the designed primers. We confirmed the expression of the genes in a N<sub>2</sub>O-generating soil microcosm under the denitrification-induced condition and also found that 41% of the *nirK* or *nirS* clones in newly realized clusters had the similar amino acid sequences with the genes from the bacterial strains (13 genera) which have been isolated from the soil and of which denitrification activities were confirmed. These results suggested that we have seriously underestimated the diversity, distribution and abundance of denitrifying microbes in environment. The knowledge and methodology obtained in this study will lead to the N<sub>2</sub>O-mitigation technology in agricultural field.

Key words: nitrous oxide gas, upland soil, denitrification, nitrite reductase

### 緒 言

脱窒とは硝酸イオンや亜硝酸イオンを逐次的に一酸

E-mail: asenoo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者およびその所属機関：磯部一夫（東京大学大学院農学生命科学研究科），巍魏（同左），白鳥豊（新潟県農業総合研究所），西澤智康（東京大学大学院農学生命科学研究科，現在茨城大学農学部），大塚重人（東京大学大学院農学生命科学研究科），吉田尚弘（東京工業大学大学院総合理工学研究科），豊田栄（同左）

化窒素（NO），一酸化二窒素（亜酸化窒素，N<sub>2</sub>O），窒素ガス（N<sub>2</sub>）などのガス態窒素へと還元する微生物反応である（Zumft, 1997; Knowles, 1982）。脱窒は自然生態系や農業生態系における窒素の損失をもたらす、排水処理系においては余剰の窒素の除去を担う（Tiedje, 1988; Conrad, 1996; Bouwman *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 1999）。脱窒の最終産物の一つであるN<sub>2</sub>Oは温室効果ガスであり、またオゾン層破壊に関与する（Davidson, 2009; Ravishankara *et al.*, 2009）。農耕地土壌はN<sub>2</sub>Oの主要な人為的発生源の一つとなっている。

そのため脱窒は科学的にも産業的にも古くから大きな注目を集めている。系統的に多様な微生物が脱窒能を有しており、環境中の脱窒速度は脱窒微生物の生理特性や酸素供給などの環境要因によって大きく制御されている (Philippot *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014)。亜硝酸イオンから NO への還元は溶存態窒素からガス態窒素への変換という意味で脱窒のキーステップである。このステップは構造的に異なるが機能的に同等の二つの亜硝酸還元酵素である銅保有型の NirK とシトクローム cd1 保有型の NirS によって触媒される (Hochstein & Tomlinson, 1988; Sakurai & Kataoka, 2007; Francesca *et al.*, 2001)。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統と *nir* 配列に基づく系統は必ずしも一致しないため (Tiedje, 1994)、環境中での脱窒微生物の生態学的挙動を知るために *nirK* や *nirS* を対象とした PCR プライマーが利用されている (Zumft, 1997; Knowles, 1982; Tiedje, 1988)。また多くの研究でプライマーの作成や改良が報告されている (Braker *et al.*, 1998; Hallin & Lindgren, 1999; Michotey *et al.*, 2000; Throbäck *et al.*, 2004; Braker *et al.*, 2000)。このようなプライマーの作成や改良は分離培養された脱窒微生物の *nirK* や *nirS* 配列情報をもとに行われるが、それら分離培養株の多くは *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱細菌である (Braker *et al.*, 2000; Heylen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2011)。しかし近年のゲノム解析技術の進展によって、例えば *Nitrospira* 門, *Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Spirochaeta* 門, *Chroloflexi* 門の細菌や一部のアーキアもまた *nirK* や *nirS* を保有していることが明らかになっている (Cantera & Stein, 2007; Nishizawa *et al.*, 2013; Nolan *et al.*, 2009; Moir, 2011; Bartossek *et al.*, 2010)。これらの *nirK* や *nirS* の配列は従来のプライマーの作成や改良には考慮されていない。また、水田土壌に存在している *nirK* や *nirS* の大部分が従来のプライマーではミスマッチがあり検出できないことがメタゲノム解析から明らかになっている (伊藤ら, 2011)。したがって、環境中の脱窒微生物についての我々の知見は大きく偏っている可能性が高い。農耕地土壌において N<sub>2</sub>O ガスを生成している脱窒微生物についての知見も限られている。

本研究の目的は陸域環境においてこれまで検出されてこなかった脱窒微生物の多様性や存在量とその生態的重要性を明らかにした上で、畑土壌において N<sub>2</sub>O 生成を行っている脱窒微生物を特定することである。そのため我々は (1) 知られているすべての *nirK* と *nirS* の全長配列を用いて系統解析を行い、検出されてこ

なかった *nirK* と *nirS* の存在を明らかにした。(2) 続いて、全ての *nirK* と *nirS* を検出するためのいくつかのプライマーセットを作成した。(3) これらプライマーセットを用いて陸域環境における *nirK* と *nirS* の多様性や存在量を明らかにした。(4) 最後に、これまで検出されなかった *nirK* や *nirS* を有する脱窒微生物が畑地土壌において N<sub>2</sub>O 生成を担っている微生物群であることを明らかにした。

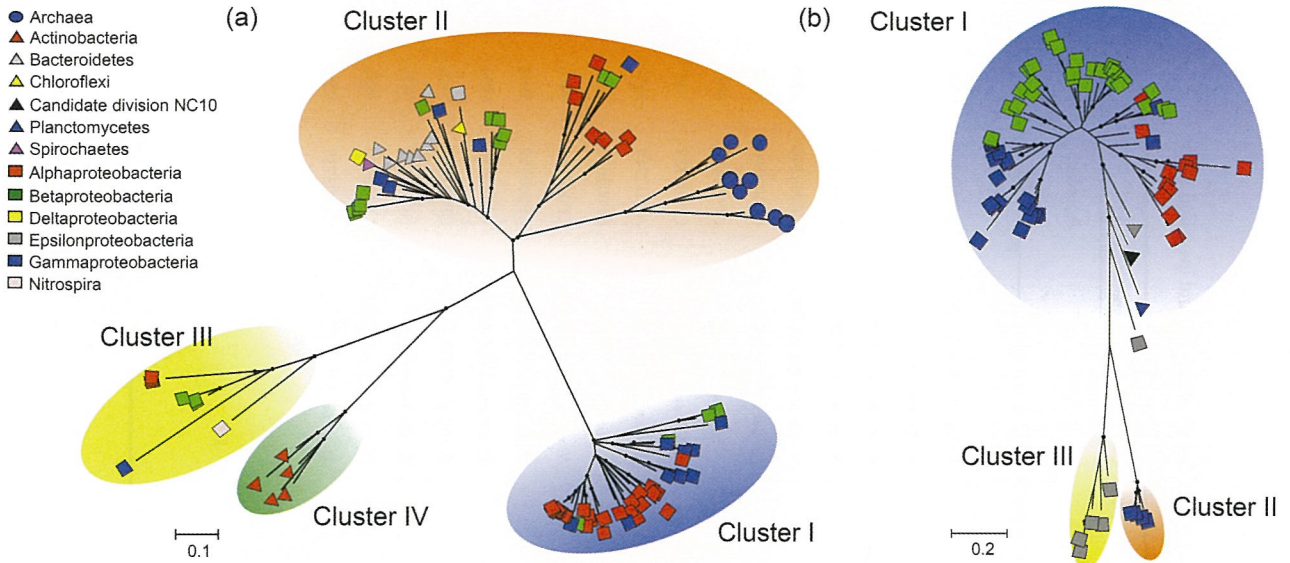
## 実験方法

### NirK と NirS 遺伝子の系統解析

*nirK* と *nirS* の塩基配列全長を、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Repository (<http://www.genome.jp/kegg>), National Center for Biotechnology Information (NCBI) Microbial Genomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>), Functional Gene Repository (<http://fungene.cme.msu.edu/index.spr>) から収集し、ClustalW2 を用いてアミノ酸配列に変換した後、アライメントをした。*nirK* について、タイプ 1 銅 (2つのヒスチジンと1つのメチオニン) とタイプ 2 銅 (2つのヒスチジン) を含む銅中心タイプ 1 ドメインのホモログを解析に供した。*nirS* については亜硝酸と結合して還元するシトクローム d1 ドメインのホモログを解析に供した。系統樹はアミノ酸配列に基づいて最尤法により作成した。

### NirK と NirS 遺伝子を検出するためのプライマーの作成

作成した系統樹において *nirK* の系統樹を 4つのクラスター (クラスター I-IV) に、*nirS* の系統樹を 3つのクラスター (クラスター I-III) に大別した (Fig. 1)。各クラスターに属する *nirK* と *nirS* をそれぞれ検出するための特異的なプライマーセットを作成した。プライマーの作成には COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) アルゴリズムを用いた。*nirK* の系統樹において、高度好塩菌である *Halobacteria* 綱アーキアの *nirK* はプライマー作成領域のアミノ酸配列がクラスター II に属する他の *nirK* アミノ酸配列と配列が類似していたためクラスター II に含めた (Fig. 1a)。*nirS* の系統樹において、近年報告された *Bacteroidetes* 門, 未培養微生物群 NC10 (門), *Planctomycetes* 門, *Epsilonproteobacteria* 綱のゲノムに由来する 4つの *nirS* 配列は、プライマー作成領域のアミノ酸配列がクラスター II の *Proteobacteria* 門細菌が有する *nirS* と類似していたためクラスター I に含めた (Fig. 1b)。



**Fig. 1** Unrooted maximum likelihood phylogeny of partial *nirK* (a) and *nirS* (b) amino acid sequences obtained from genomes. The *nirK* type 1 copper center and *nirS* cytochrome d1 heme were detected for each Cluster. Bootstrap values (500 replicates) greater than 70% are denoted by dots above the branches, and the branch lengths correspond to sequence differences, which are indicated by the scale bar. Symbols on tree tips indicate the taxonomic affiliations of reference sequences.

#### 作成したプライマーの有用性の検証

作成したすべてのプライマーセットについて、検出範囲と特異性を Japan Collection of Microorganisms (JCM, Tsukuba, Ibaraki, Japan), NITE Biological Resource Center (NBRC, Kisarazu, Chiba, Japan) から入手した18の培養株 (Table 1) を用いて検証した。これらの培養株はその 16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類から *nirK* と *nirS* の系統樹 (Fig. 1) の各クラスターにそれぞれ属していると予想された。加えて、これまでに水田土壌 (新潟県農業総合研究所) から分離された44の脱窒細菌 (Table 1) も検証のために用いた。また脱窒能を有しない *Geobacillus kaustophilus* をネガティブコントロールとして用いた。

すべてのプライマーセットに対して PCR 条件を最適化した。PCR 反応液は BIOTaq HS DNA ポリメラーゼ (Bioline, London, UK) を用いて、 $MgCl_2$  を 4 mM (終濃度)、dNTP Mix を 0.2 mM (終濃度)、bovine serum albumin を  $0.5 \mu g \cdot \mu l^{-1}$  (終濃度)、各プライマーを  $0.2 \mu M$  (終濃度)、genomic DNA を 25-50 ng となるように添加した。クラスター III に属する *nirK* についてはその GC 含量が高いため DMSO を終濃度 5% (v/v) になるようにさらに添加した。PCR 反応条件は  $95^\circ C$  を 10 分の後、 $95^\circ C$  を 30 秒、Table 2 に示す温度で 30 秒、 $72^\circ C$  を 30 秒のセットを 30 サイクル、最後に

$72^\circ C$  を 10 分行った。PCR 産物は Gel and PCR clean-up system (Promega Corporation, USA) を用いて精製し、pGEM-T Easy ベクターと *E. coli* JM109 high efficiency コンピテントセル (Promega Corporation, USA) を用いてクローニングしたのち、塩基配列の解読を Takara Bio Inc. (Otsu, Japan) にて行った。PCR 増幅の結果に基づいて最適なプライマーセットを決定し、それらの配列と PCR/定量 PCR の最適条件を Table 2 に示した。

#### 環境中の NirK と NirS 遺伝子の多様性

様々な環境サンプルを用いてクローンライブラリー解析を行い、環境中の *nirK* と *nirS* の多様性を検証した。環境サンプルとして畑地土壌 (灰色低地土)、水田土壌 (灰色低地土)、森林土壌 (褐色森林土)、湖堆積物を用いた (Table 3)。土壌サンプルについては各サイトにおいて 3 地点から表層 5-10 cm の土壌を採取した。湖堆積物については 3 地点から表層 10 cm の堆積物を採取した。各環境サンプルから ISOIL (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて DNA を抽出し、作成した各プライマーセットを用いて PCR を行った。PCR 条件は上述と同じであるが  $MgCl_2$  濃度を 2.0 mM (終濃度) とした。PCR 産物を上述同様に精製、クローニング、塩基配列の解読を行った。得られた配列は

**Table 1** Amplification of the *nirK* and *nirS* sequences in each cluster of the denitrifying strains obtained from the culture collections and cropland soils

Strains	Cluster										Denitrification		Accession number	Similarity
	Amplicon by primer sets *										activity †			
	nirK1E/ nirK2R	nirK2E/ nirK3R	nirK3F/ nirK4F/ FlαCu/ R3Cu	nirSC1F/ nirSC2R	nirSC2E/ nirSC3F/ cd3aF/ R3cd	nirSC1R	nirSC2R	nirSC3R	nirSC4R	R3Cu				
<b>Culture collections:</b>														
<i>Caulobacter segnis</i> NBRC-15250	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D		CP002008	99%
<i>Azospirillum lipoferum</i> NBRC-102290	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A		FQ311871	90%
<i>Azospirillum brasilense</i> JCM-1224	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A		HE577330	94%
<i>Neisseria denitrificans</i> JCM-21446	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	700 †	B		FN995097	90%
<i>Pseudomonas haloplanktis</i> NBRC-100993	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B		CR954246	100%
<i>Pseudoxanthomonas stuwonensis</i> NBRC-106385	++	-	-	-	-	-	-	-	-	300, 1400	D		CP002446	97%
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> JCM-13311	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D		CP002446	89%
<i>Haloarcula hispanica</i> NBRC-102182	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D		CP002921	100%
<i>Actinoplanes missouriensis</i> NBRC-13243	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	D		AF012319	99%
<i>Actinosynnema mirum</i> NBRC-14064	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	D		CP001630	99%
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> NBRC-14297	-	-	++	-	-	-	-	-	-	1500	D		CP000115	96%
<i>Ochrobactrum anthropi</i> JCM-21032	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	A		CP000759	99%
<i>Alcaligenes faecalis</i> JCM-20522	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+, 1500	B		AF114786	99%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JCM-5965	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	B		CP002881	99%
<i>Denitrisoma oestradiolicum</i> JCM-12830	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	A		NC017075	88%
<i>Cupriavidus metallidurans</i> JCM-21315	-	-	-	-	-	++	-	-	-	1000, 1200	A		CP000352	98%
<i>Methylobacterium kuyamae</i> NBRC-105905	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	A		CP002738	92%
<i>Geobacillus kaustophilus</i> JCM-12893	-	-	-	-	-	-	-	-	-	700, 1500	-		-	-
<b>Bacterial isolates:</b>														
<i>Streptomyces</i> sp. UNPA38	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	D	§	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. UNPA97	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-

Table 1 continued

Strains	Cluster Amplicon by primer sets *				Denitrification activity †				Closest relative genome		Accession number	Similarity
	nirK-C1F/ nirK-C2F/ nirK-C3F/ nirK-C4F/ F1aCu/ nirK-C1R	nirK-C2F/ nirK-C3F/ nirK-C4R/ R3Cu	nirSC1F/ nirSC2E/ nirSC3F/ cd3aF/ nirSC1R	nirSC2R/ nirSC3R/ R3cd	+	+	Affiliations					
<i>Agromonas</i> sp. NC2H-3-107	nirK-C1 +++	-	-	-	-	-	-	D	<i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321	AP012279	96%	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UNPA215	nirS-1 -	-	-	-	++	-	+	D	-	-	-	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UNPF333	nirS-1 -	-	-	-	++	-	++	C	-	-	-	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UNPF42	nirK-C1 ++	-	-	-	-	-	-	A	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTai1	CP000494	89%	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UNPA324	nirK-C1 +	-	-	-	+	-	-	D	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTai1	CP000494	92%	
<i>Ensifer</i> sp. NC3H-6bA	nirK-C1 -	++	-	-	-	-	-	A	<i>O. anthropi</i> ATCC 49188	CP000758	88%	
<i>Ensifer</i> sp. NC3H-75	nirK-C1 +++	-	-	-	-	-	-	D	<i>S. fredii</i> HH103	HE616890	80%	
<i>Rhizobium</i> sp. NC2L-3-2-34	nirK-C1 ++	-	-	-	-	-	-	D	<i>Rhizobium</i> <i>eti</i> CFN 42	CP000138	84%	
<i>Sinorhizobium</i> sp. NC2L-3-23	nirK-C1 +++	-	-	-	-	-	-	D	<i>S. fredii</i> HH103	HE616890	82%	
<i>Sinorhizobium</i> sp. NH30B	nirK-C1 +++	-	-	-	-	-	-	D	<i>S. fredii</i> HH103	HE616890	82%	
<i>Magnetospirillum</i> sp. NC3H-69bA	nirS-1 -	-	-	-	+++	-	-	D	<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	HG794546	90%	
<i>Achromobacter</i> sp. OF-24	nirK-C1 +	-	-	-	+	-	-	D	<i>A. cycloclastes</i> ATCC 21921	AAD26537	97%	
<i>Cupriavidus</i> sp. NC3H-55a	nirS-1 -	-	-	-	900	++	++	D	<i>C. necator</i> N-1	CP002878	97%	
<i>Cupriavidus</i> sp. NC3H-55b	nirS-1 -	-	-	-	1500	+	++	C	<i>C. necator</i> N-1	CP002878	97%	
<i>Cupriavidus</i> sp. NC3H-76b	nirS-1 -	-	-	-	-	+++	+++	D	<i>C. taiwanensis</i> LMG19424	CU633750	87%	
<i>Cupriavidus</i> sp. NC3H-95a	nirS-1 -	-	-	-	1200	+++	+++	C	<i>C. taiwanensis</i> LMG19424	CU633750	87%	
<i>Ralstonia</i> sp. UNPF2a	nirK-C1 -	+++	-	-	-	-	-	D	<i>R. pickettii</i> 12D	CP001645	97%	
<i>Ralstonia</i> sp. UNPF19a	nirK-C1 -	+++	-	-	-	-	-	D	<i>R. pickettii</i> 12D	CP001645	97%	
<i>Ralstonia</i> sp. UNPF45	nirK-C1 -	+++	-	-	-	-	-	D	<i>R. pickettii</i> 12D	CP001645	95%	
<i>Wautersiasp.</i> NH26B	nirK-C1 -	++	-	-	-	-	-	D	-	-	-	
<i>Wautersia</i> sp. NC2H-3-95	nirK-C1 -	-	-	-	600	+++	+++	D	<i>R. entropia</i> JMP134	CP000091	93%	
<i>Acidovorax</i> sp. NC3L-63c	nirK-C1 -	++	-	-	1200	-	-	A	-	-	-	
<i>Curvibacter</i> sp. UNPF65	nirK-C1 -	+++	-	-	-	-	++	D	<i>R. solanacearum</i> CFBP2957	FP885907	85%	
<i>Rhodoferrax</i> sp. NC3L-59aB	nirK-C1 -	+	-	-	-	-	-	A	<i>Dechlorosoma</i> <i>suillum</i> PS	CP003153	81%	
<i>Rhodoferrax</i> sp. NC3L-68a	nirK-C1 -	+	-	-	-	-	-	A	-	-	-	
<i>Rhodoferrax</i> sp. NC3L-63bB	nirK-C1 -	++	-	-	-	-	-	A	-	-	-	



Table 1 continued

Strains	Cluster Amplicon by primer sets *										Denitrification activity †	Closest relative genome Affiliations	Accession number	Similarity
	nirKC1F/ nirKC1R	nirKC2F/ nirKC2R	nirKC3F/ nirKC3R	nirKC4F/ nirKC4R	F1aCu/ R3Cu	nirSC1F/ nirSC1R	nirSC2F/ nirSC2R	nirSC3F/ cd3af/ R3cd						
<i>Hermittimonas</i> sp. NC3L-11b	---	+++	---	---	1500	---	---	---	---	---	D	---	---	---
<i>Ideonella</i> sp. UNPF83	---	---	---	---	---	++	+	+	+	+	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	83%
<i>Ideonella</i> sp. NC3L-43b	---	+++	---	---	---	+	---	---	---	---	C	---	---	---
<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. UNPF3a	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	83%
<i>Yogesella</i> sp. NS47	---	---	---	---	---	++	+	+	+	+	---	<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B	(AP012224)	96%
<i>Azoarcus</i> sp. UNPF34a	---	---	---	---	---	+	---	---	---	---	D	<i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B	(AP012224)	94%
<i>Azoaspira</i> sp. NC3H-14	---	---	---	---	700	++	---	---	---	+++	A	<i>Azoarcus</i> sp. KH32C	(AP012304)	99%
<i>Dochloromonas</i> sp. UNPF85	---	---	---	---	---	+	---	---	---	---	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	79%
<i>Dochloromonas</i> sp. NC3L-11a	---	---	---	---	---	+	---	---	---	---	A	<i>D. aromatica</i> RCB	(CP000089)	89%
<i>Zoogbea</i> sp. UNPF11a	---	---	---	---	---	+	---	---	---	---	A	<i>D. aromatica</i> RCB	(CP000089)	88%
<i>Zoogbea</i> sp. UNPF89	---	---	---	---	---	++	---	---	---	++	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	80%
<i>Zoogbea</i> sp. UNPF86	---	---	---	---	---	++	---	---	---	++	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	81%
<i>Zoogbea</i> sp. UNPF36	---	---	---	---	---	++	---	---	---	++	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	80%
<i>Zoogbea</i> sp. NC3L-7a	---	---	---	---	---	+	---	---	---	++	D	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	(NC017075)	81%
<i>Yersinia</i> sp. NC3L-70	---	++	---	---	1500	---	---	---	---	---	D	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6	(CP001013)	80%
<i>Enterobacter</i> sp. NC3H-6aB-1	++	---	---	---	+	---	---	---	---	---	D	---	---	---

\* The concentration of PCR amplification product: +, 0-20 ng/ $\mu$ l; ++, 20-50 ng/ $\mu$ l; +++, >50 ng/ $\mu$ l.

† Numbers indicate approximate sizes of non-specific amplification product.

‡ Denitrification activity was normalized with the ratio of N<sub>2</sub>O to N<sub>2</sub>O+N<sub>2</sub>. The capital letter represents the ratio value: A, 0-20%; B, 20-40%; C, 40-80%; D, 80-100%.

§ No significant similarity of genome or partial reference sequences found in database.

**Table 2** Sequences of the primers for *nirK* and *nirS* in each cluster and the 16S rRNA gene and the optimal PCR conditions

Primers	Sequence*	Cluster	Conventional PCR		Real-time QPCR		R <sup>2</sup> /Efficiency (%)
			Annealing temperature (second)	temperature (°C)/time	Annealing temperature (°C)	7m (°C)	
nirKC1F/nirKC1R	ATGGCGCCATCcatggtmytnc/ TCGAAGGCCTCGatnarrtrtg	I	54/30		54	88.4	0.999/86
nirKC2F/nirKC2R	TGCACATCGCCAAcggmatgtwygg/ GGCGCGGAAAGATGshrtgrtonac <sup>a</sup>	II	56/30		56	89.0	0.992/97
nirKC3F/nirKC3R	CATCGGCAACGGCcatyayggngc/ CGACCATGGCCGTGgswnacraangg	III	58/30		58	92.5	0.991/91
nirKC4F/nirKC4R	TACGGTGTGATCatorstgatcc/ GCATCACGCATGgaatgatysac (Tiedje, 1994)	IV	60/30		60	87.4	0.996/84
F1aCu/R3Cu		I	57/35		58	88.0	0.998/87
nirSC1F/nirSC1R	ATCGTCAACGTcaargarcvvg/ TTGGGGTGGGTctisabgaasag	I	56/30		56	90.2	0.999/80
nirSC2F/nirSC2R	TGGAGAACGCCggneargtntgg/ GATGATGTCCACGgcnactrangg	II	56/30		56	86.8	0.993/73
nirSC3F/nirSC3R	TTCGCCCTGaargayggng/ AGGTGCCCCACGaanamcnc	III	— <sup>†</sup>		—	—	—
cd3aF/R3cd	(Braker <i>et al.</i> , 1998; Hallin & Lindgren, 1999)	I	57/30		57	90.4	0.996/95
357F/520R	(Morales <i>et al.</i> , 2010)	16S rRNA	58/30		58	83.2	0.999/91

\* the sequences with capital and lowercase letters denote the clamp and core region of the primer, respectively.

<sup>†</sup> not detected in the test strains and environmental samples.

**Table 3** Amplification and clones of *nirK* and *nirS* in each cluster of environmental samples

Habitat type *	<i>nirK</i> and <i>nirS</i> Cluster	Amplicon †	No. of sequences	No. of OTUs (3% cut)	Reference	
Cropland soil	<i>nirK</i>	Cluster I	+++	47	15	(Morales <i>et al.</i> , 2010)
		Cluster II	+++	44	20	
		Cluster III	+++	43	30	
		Cluster IV	++	23	2	
	<i>nirS</i>	Cluster I	+++	31	21	
		Cluster II	+	12	8	
		Cluster III	—	—	—	
Rice paddy soil	<i>nirK</i>	Cluster I	++	18	14	(Morales <i>et al.</i> , 2010)
		Cluster II	+++	24	20	
		Cluster III	++	21	16	
		Cluster IV	—	—	—	
	<i>nirS</i>	Cluster I	+++	28	24	
		Cluster II	++	29	16	
		Cluster III	—	—	—	
Forest soil	<i>nirK</i>	Cluster I	++	18	13	(Wei <i>et al.</i> , 2014)
		Cluster II	+++	20	17	
		Cluster III	+++	20	17	
		Cluster IV	—	—	—	
	<i>nirS</i>	Cluster I	+	15	3	
		Cluster II	—	—	—	
		Cluster III	—	—	—	
Lake sediment	<i>nirK</i>	Cluster I	++	23	8	(Francesca <i>et al.</i> , 2001)
		Cluster II	+++	24	15	
		Cluster III	++	19	6	
		Cluster IV	+	8	2	
	<i>nirS</i>	Cluster I	+++	25	20	
		Cluster II	+	24	10	
		Cluster III	—	—	—	
Cropland soil (soil microcosm )	<i>nirK</i>	Cluster I	+++	19	15	(Morales <i>et al.</i> , 2010)
		Cluster II	+++	24	14	
		Cluster III	+++	20	15	
		Cluster IV	+	5	1	
	<i>nirS</i>	Cluster I	+++	48	20	
		Cluster II	+	16	9	
		Cluster III	—	—	—	

\* Cropland soil, gray lowland soil applied with organic fertilizers; rice paddy, a flooded paddy soil; forest soil, a natural forest soil.

† The concentration of PCR amplification product: +, 0-20 ng/μl; ++, 20-50 ng/μl; +++, >50 ng/μl.

Mothur プログラムを用いて 97% の相同性を同じ operational taxonomic unit (OTU) とした。最終的に 195 OTU の *nirK* と 102 OTU の *nirS* の塩基配列をアミノ酸配列に変換して、上述の通り系統樹を作成した。

#### 環境中の NirK と NirS 遺伝子の存在量

様々な環境サンプルを用いて定量 PCR 法を行い、環境中の *nirK*, *nirS*, 16S rRNA 遺伝子の存在量を検証した。環境サンプルとして有機肥料を施肥した畑地土壌（黒ボク土）、尿素または有機肥料を施肥した畑地土壌（灰色低地土）、湛水時または非湛水時の水田土壌（灰色低地土）、2カ所の天然林土壌（褐色森林土と黒ボク土）、1カ所の人工林土壌（褐色森林土）、湖堆積物を用いた。各環境サンプルから DNA を上述の通り抽出し、StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Warrington, UK) と KOD SYBR qPCR Mix kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて定量した。各クラスターに属する *nirK* と *nirS* は作成した各プライマーセットを用いて、16S rRNA 遺伝子はプライマーセット 357F/520R を用いて定量した。また比較のために、現在広く用いられている汎用プライマーセットである F1aCu/R3Cu (クラスター I に属する *nirK* を対象) と cd3aF/R3cd (クラスター I に属する *nirS* を対象) に用いて定量を行った。定量 PCR の反応溶液は全量 20  $\mu$ l の系で、KOD SYBR qPCR Mix を 10  $\mu$ l, 50  $\times$  ROX reference dye を 0.4  $\mu$ l, 各プライマーを 0.2  $\mu$ M (終濃度), DNA を 10 ng 添加した。PCR 反応条件は 98 $^{\circ}$ C を 2 分の後、98 $^{\circ}$ C を 10 秒, Table 2 に示す温度で 10 秒, 68 $^{\circ}$ C を 30 秒のセットを 40 サイクル行った。プライマーセット F1aCu/R3Cu と KOD SYBR qPCR Mix を用いた PCR において非特異的増幅が見られたため、プライマーセット F1aCu/R3Cu に対しては KOD SYBR qPCR Mix の代わりに Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) を用いた。反応溶液は全量 20  $\mu$ l の系で、Power SYBR Green PCR Master Mix を 10  $\mu$ l, 各プライマーを 0.2  $\mu$ M (終濃度), bovine serum albumin を 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (終濃度), DNA を 10 ng 添加した。PCR 反応条件は 95 $^{\circ}$ C を 10 分の後、95 $^{\circ}$ C を 30 秒, 58 $^{\circ}$ C を 30 秒, 72 $^{\circ}$ C を 30 秒のセットを 40 サイクル行った。検量線の増幅効率と融解曲線の T<sub>m</sub> 値については Table 2 に示した。

#### 畑地土壌マイクロコズムにおける N<sub>2</sub>O 生成と NirK と NirS 遺伝子の転写発現

新たに作成したプライマーセットを用いて検出された *nirK* と *nirS* の転写発現について脱窒を活性化させ

た畑地土壌マイクロコズムを利用し検証した。土壌には畑地土壌を用いた。無施肥の畑地土壌（灰色低地土, 新潟）40 g を 80 ml のバイアル瓶に充填し, 0.5 g の粒状有機肥料を混合し, 20 日間インキュベートした。コントロール実験として肥料を添加しない土壌を用意した。N<sub>2</sub>O フラックスを 2 日毎に測定し, 8 日目に最大速度を計測した。培養 8 日目の肥料を混合した, また添加していない土壌から RNA と DNA を RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit, DNA Elution Accessory Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) を用いて抽出した。抽出には 1.2 g の土壌を用いた。RNA 溶液中に残存する DNA については Ambion TURBO DNA-free Kit (Life Technologies) を用いて除去した。抽出した DNA と RNA の濃度を Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies) を用いて定量した。RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) を用いて転写し cDNA を作成した。DNA と cDNA 溶液を用いて, 上述の通り *nirK*, *nirS*, 16S rRNA 遺伝子の存在量を定量した。また DNA を用いて, 培養 8 日目の土壌の *nirK* と *nirS* について上述の通りクローンライブラリー解析を行った。

## 結果と考察

#### NirK と NirS 遺伝子の系統解析

*Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Chloroflexi* 門, *Nitrospira* 門, *Proteobacteria* 門, *Spirochaeta* 門細菌と *Euryarchaeota* 門アーキアが有する *nirK* の塩基配列全長を得た。その際, 一つの種からアミノ酸配列で 99% 以上の類似度を基準に代表配列を選び, 全 97 の配列を得た。これらの銅中心タイプ 1 ドメイン (Sakurai & Kataoka, 2007) の配列をもとに系統樹を作成した。現在広く利用されている全ての汎用プライマーセット (例えば F1aCu/R3Cu や nirK2F/nirK5R) もまたこの領域を増幅するよう作成されている (Braker *et al.*, 1998; Hallin & Lindgrem, 1999)。系統樹は 70% 以上のブートストラップ値のもと, 4 つのクラスター (クラスター I-IV) に大別された (Fig. 1a)。F1aCu/R3Cu や nirK2F/nirK5R といったプライマーセットによって増幅される配列はクラスター I に属し, クラスター II-IV には属さなかった。クラスター I には *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱細菌が有する *nirK* のみが含まれた。クラスター II には *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱, *Deltaproteobacteria* 綱, *Epsilonproteobacteria* 綱,

*Bacteroidetes* 門, *Chroloflexi* 門, *Spirochaeta* 門の細菌が有する *nirK* が含まれた. また上述の通り, *Halobacteriaceae* 科アーキアが有する *nirK* もクラスター II に含まれた. クラスター III には *Actinobacteria* 門細菌の有する *nirK* のみが含まれた. クラスター IV には *Nitrosospira* 属, *Nitrosococcus* 属, *Nitrosomonas* 属, *Nitrobacter* 属の硝化細菌が有する *nirK* のみが含まれた. また一部の硝化細菌が有する *nirK* はクラスター I-II にも含まれた. これは Cantera *et al.* (2007) の結果と一致する.

*nirK* と同様に, *Bacteroidetes* 門, 未培養微生物群 NC10 (門), *Planctomycetes* 門, *Proteobacteria* 門細菌が有する 75 の *nirS* 塩基配列全長を得た. これらの配列のシトクロム d1 ドメインの配列をもとに系統樹を作成した. 現在広く利用されている全ての汎用プライマーセット (例えば cd3aF/R3cd や nirS2F/nirS4R) もまたこの領域を増幅するよう作成されている (Braker *et al.*, 1998; Throbäck *et al.*, 2004). 系統樹は 87% 以上のブートストラップ値のもと, 3つのクラスター (クラスター I-III) に大別された (Fig. 1b). cd3aF/R3cd や nirS2F/nirS4R といったプライマーセットによって増幅される配列はクラスター I に属し, クラスター II-III には属さなかった. クラスター I には *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱, *Epsilonproteobacteria* 綱細菌や *Bacteroidetes* 門, *Planctomycetes* 門, NC10 門細菌が有する *nirS* が含まれた. クラスター II には *Methylobacter* 属, *Methylomonas* 属, *Methylomicrobium* 属のメタン酸化細菌が有する *nirS* が含まれた. クラスター III には熱水系の深海堆積物から得られた *Epsilonproteobacteria* 綱で *Nitratifractor* 属, *Sulfurovum* 属, *Sulfurimonas* 属細菌が有する *nirS* が属していた.

以上の系統解析の結果, 系統的に多様な微生物が *nirK* や *nirS* を有しており, 汎用のプライマーセットではその大部分 (クラスター II-IV に属する *nirK*, クラスター II-III に属する *nirS*) を検出することができていないため, これまで PCR を用いた方法では検出されてこなかった *nirK* と *nirS* が多く存在していることが明らかとなった.

#### 作成したプライマーの有用性の検証

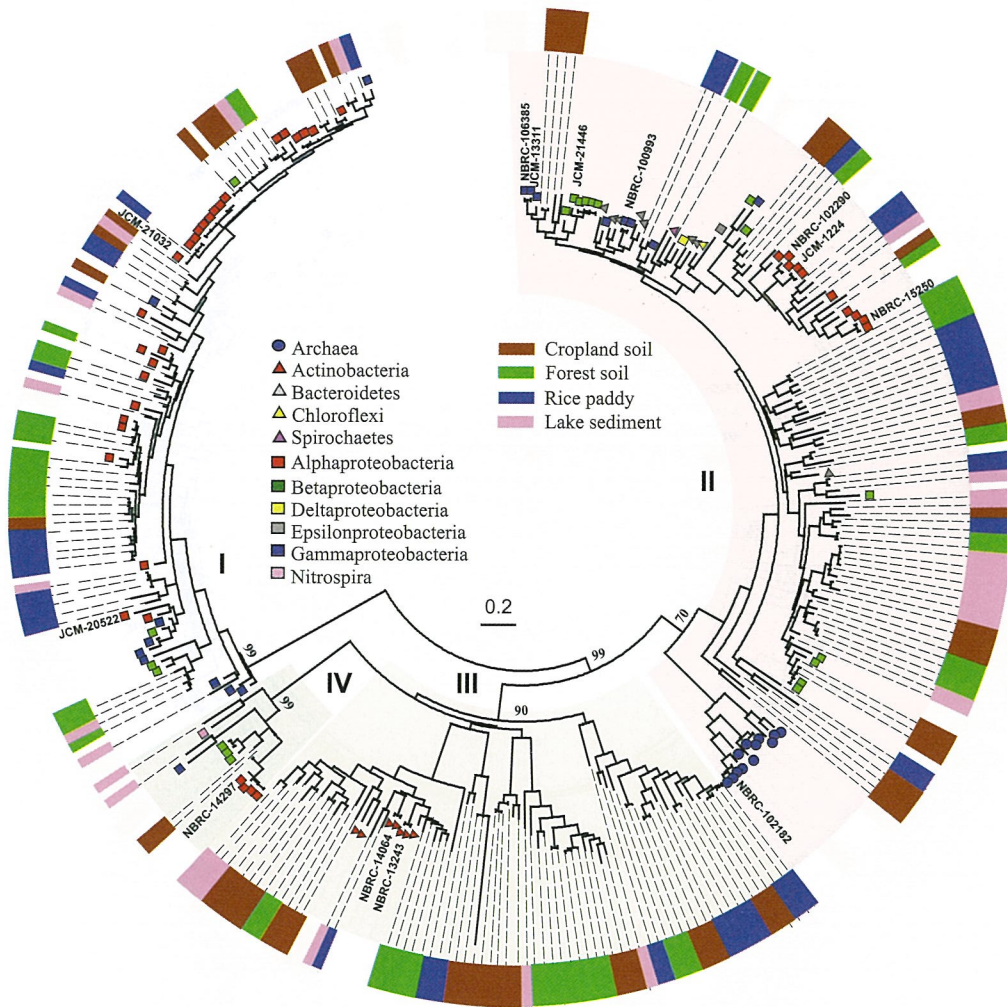
系統樹 (Fig. 1) の 77 のクラスターに属する *nirK* と *nirS* をそれぞれ増幅しうる 7セットのプライマーを作成した (*nirK* のクラスター I-IV を対象に nirKC1F/nirKC1R, nirKC2F/nirKC2R, nirKC3F/nirKC3R, nirKC4F/nirKC4R, *nirS* のクラスター I-III を対象に nirSC1F/nirSC1R, nirSC2F/nirSC2R,

nirSC3F/nirSC3R, Table 2). 増幅する領域と増幅産物のサイズ (*nirK* は約 430-468 bp, *nirS* は約 410-420 bp) は汎用のプライマーとほぼ同じである. それゆえ, 本研究により新たに作成されたプライマーを用いて得られる *nir* 配列はこれまでに既存のプライマーを用いて得られた膨大な量の *nir* 配列との比較解析が可能である.

カルチャーコレクションから得た脱窒細菌と水田土壌から分離した脱窒細菌を用いて作成したプライマーセットの検出範囲と特異性を検証した. 全てのプライマーセットは脱窒細菌のゲノム DNA から予想されたサイズの単一断片を増幅した. 増幅された断片のシーケンス解析から各プライマーセットは対象としたクラスターに属する *nirK* または *nirS* を増幅することを確認した. また脱窒能を有しない細菌のゲノム DNA からは増幅産物が認められなかった. 比較として, 汎用のプライマーセットである *nirK* を対象とした F1aCu/R3Cu と *nirS* を対象とした cd3aF/R3cd を用いて *nirK* と *nirS* の PCR 増幅を行った. これらのプライマーセットはそれぞれクラスター I に属する *nirK* と *nirS* を増幅したが, 他のクラスターに属する *nir* を増幅しなかった. また非特異的な増幅が確認された. 以上の結果は, 本研究で新たに作成したプライマーセットは既存のプライマーと比較して多様な *nirK* または *nirS* を検出できるとともに, より特異的であることを示している.

#### 環境中の NirK と NirS 遺伝子の多様性

作成したプライマーを用いてクローンライブラリー解析を行い, 環境中の *nirK* と *nirS* の多様性を検証した. 用いた全ての環境サンプルからクラスター I-IV に属する *nirK* クローンとクラスター I-II に属する *nirS* クローンが得られた (Figs. 2 and 3). クラスター III に属する *nirS* クローンはどの環境サンプルからも得られなかった. 続いて, 得られた *nirK* および *nirS* クローンとデータベースから得られた脱窒微生物の *nir* との間で配列比較を行った. クラスター I に属する全ての *nirK* クローンの配列は *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱細菌が有する *nirK* の配列と高い相同性 (アミノ酸配列で 70% 以上) を示した. クラスター II に属する全 112 の *nirK* クローンのうち 90, 13, 5 クローンの配列はそれぞれ *Proteobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Spirochaetes* 門の脱窒細菌が有する *nirK* の配列と高い相同性 (アミノ酸配列で 64-99%, 68-87% and 72-76%) を示した. 残りの 4 クローンの配列は既知の脱窒細菌が有する *nirK* の配列と相同性を示さなかった. クラスター III

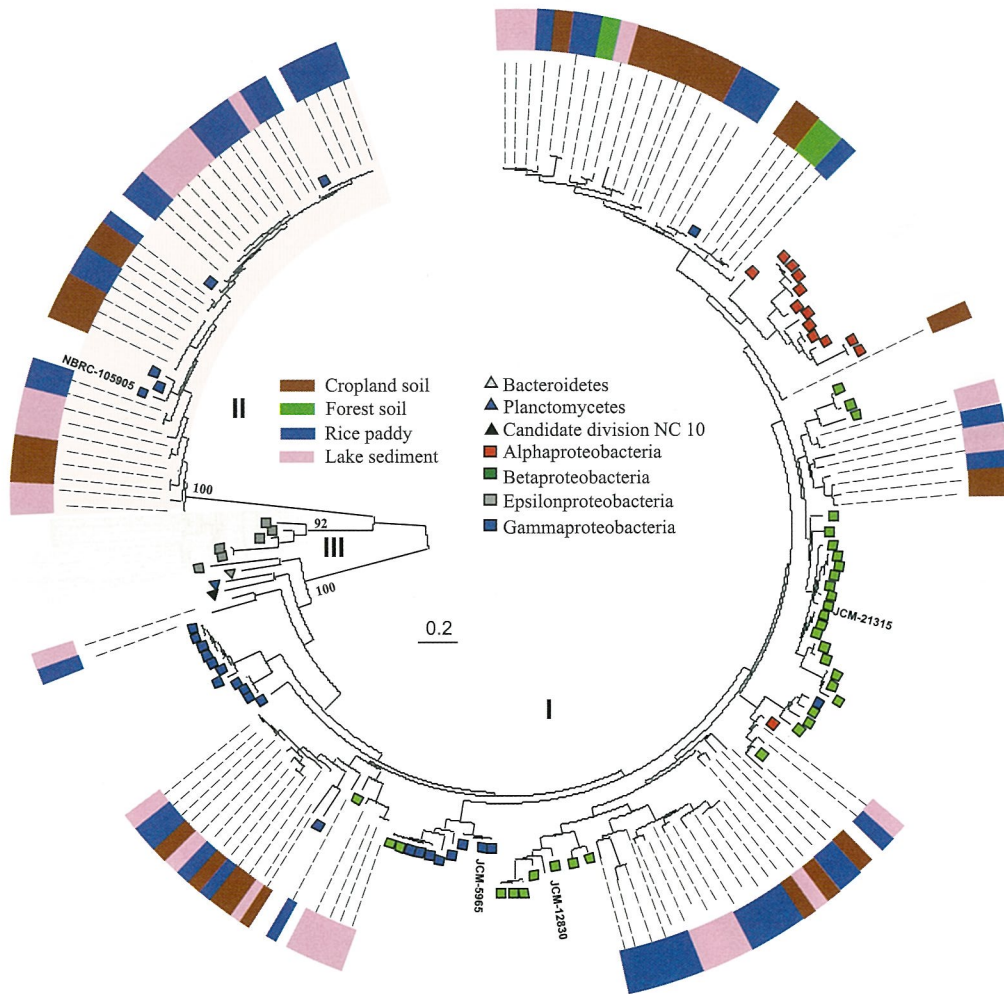


**Fig. 2** Maximum likelihood phylogeny of the 4 Cluster of *nirK* amino acid sequences obtained from the environmental samples listed in Table 3 and the reference sequences from the genomes and denitrifying strains listed in Table 1. Bootstrap values (500 replicates) of each Cluster are denoted above the branches. Non-coded and coded symbols on tree tips indicate the taxonomic affiliations of the reference sequences from genomes and denitrifying strains, respectively. The outer color strip shows the source of environmental clones. The branch lengths correspond to sequence differences, which are indicated by the scale bar.

に属する全103の *nirK* クローンのうち34クローンの配列は *Actinobacteria* 門の脱窒細菌が有する *nirK* の配列と高い相同性（アミノ酸配列で60-90%）を示した。残りのクローンは既知の *Actinobacteria* 門細菌が有する *nirK* と高い相同性を示さなかった (<50%)。また26クローンの配列はクラスター III とは離れた位置に一群を形成した。しかし、これらの配列は *nirKC3F/nirKC3R* で増幅されたことからクラスター III に含めた (Fig. 2)。クラスター IV に属する全ての *nirK* クローンの配列は硝化細菌である *Nitrobacter* 属、

*Nitrosomonas* 属、*Nitrosococcus* 属、*Nitrospira* 属細菌が有する *nirK* の配列と高い相同性（アミノ酸配列で60-90%）を示した。

クラスター I に属する全99の *nirS* クローンのうち96クローンの配列は *Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱細菌が有する *nirS* の配列と高い相同性（アミノ酸配列で71-95%）を示した。残りの3クローンは *Chloroflexi* 門細菌が有する *nirK* の配列と高い相同性を示した（77-80%）。クラスター II に属する全65の *nirS* クローンの



**Fig. 3** Maximum likelihood phylogeny of the 3 Cluster of *nirS* amino acid sequences obtained from the environmental samples listed in Table 3 and the reference sequences from the genomes and denitrifying strains listed in Table 1. Bootstrap values (500 replicates) of each Cluster are denoted above the branches. Non-coded and coded symbols on tree tips indicate the taxonomic affiliations of the reference sequences from genomes and denitrifying strains, respectively. The outer color strip shows the source of environmental clones. The branch lengths correspond to sequence differences, which are indicated by the scale bar.

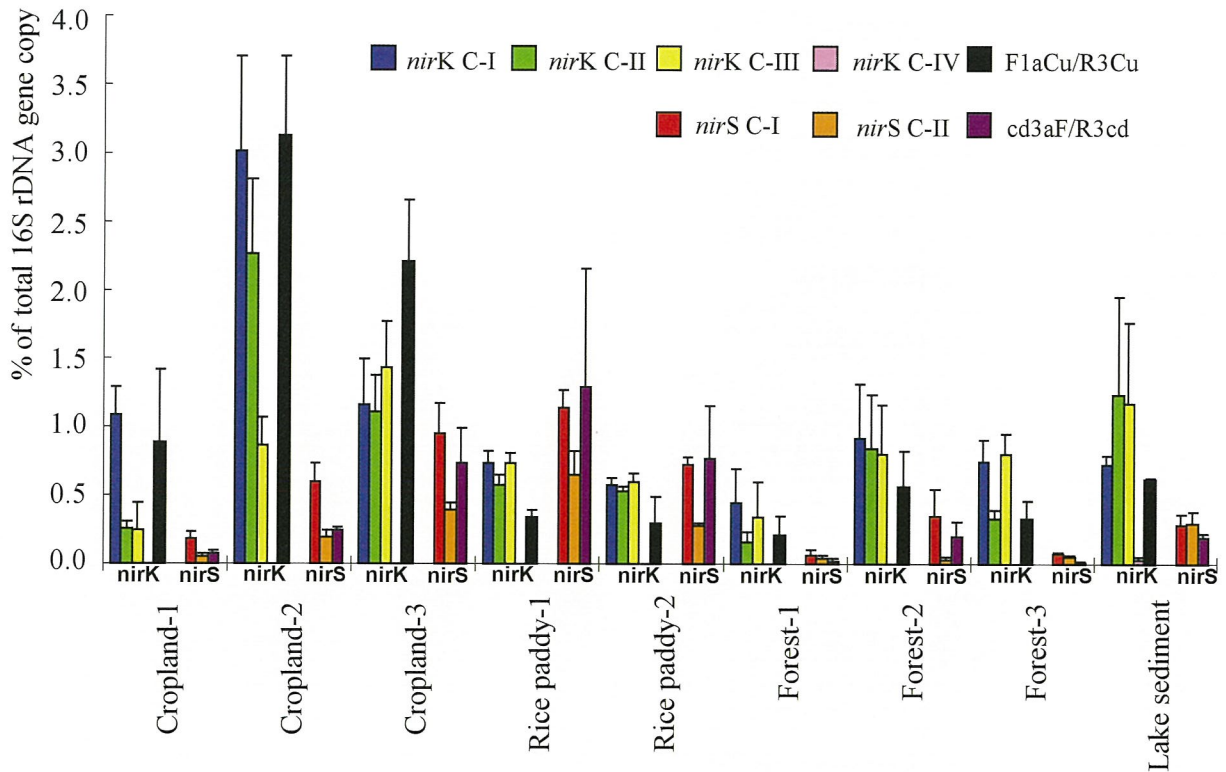
配列はメタン酸化細菌である *Methylomicrobium* 属, *Methylobacter* 属, *Methylomonas* 属細菌が有する *nirS* の配列と高い相同性 (アミノ酸配列で 82-99%) を示した。

環境中の汎用のプライマーセットを用いて *nirK* や *nirS* を解析している多くの研究では, *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Gammaproteobacteria* 綱細菌が有する *nirK* や *nirS* を主な対象としている (Braker, 2000; Heylen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2012; Ishii *et al.*,

2011). 本研究の結果はより多様な微生物 (例えば *Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Chloroflexi* 門, *Spirochaetes* 門細菌) もまた *nirK* や *nirS* を有し, 陸域環境中に広く分布していることを示している。

#### 環境中の NirK と NirS 遺伝子の存在量

作成したプライマーを用いて定量を行い, 環境中の *nirK* と *nirS* の存在量を検証した. また比較として, クラスタ I に属する *nirK* と *nirS* を対象とした汎用プライマーセット F1aCu/R3Cu と cd3aF/R3cd を用い



**Fig. 4** Relative abundance of each *nirK* and *nirS* Cluster of gene copies from the different environmental samples, calculated as a proportion of the total number of bacterial 16S rRNA gene copies (for the mean and standard deviation of replicates by site). \*Cropland-1 denotes an Andosol soil treated with organic fertilizer; Cropland-2 and 3 denote a Gray Lowland soil treated with organic and urea fertilizer, respectively; Rice paddy-1 and 2 denote a Gray Lowland soil of flooded and non-flooded paddy fields, respectively; Forest-1 and 3 denote Brown Forest soil and Andosol soil from a natural forest, respectively; Forest-2 denotes Brown Forest soil from a planted forest. Relative abundance of *nirK* Cluster IV and *nirS* Cluster I genes detected by the widely used primer sets F1aCu/R3Cu and cd3aF/R3cd are shown as a reference.

**Table 4** The relative abundance of the nitrite reductase gene and transcript responsible for N<sub>2</sub>O emission in a soil microcosm

	Treatments*	<i>nirK</i> in	<i>nirK</i> in	<i>nirK</i> in	<i>nirK</i> in	Total <i>nirK</i>	<i>nirS</i> in	<i>nirS</i> in	Total <i>nirS</i>	Total Nitrite reductase gene
		Cluster I†	Cluster II	Cluster III	Cluster IV		Cluster I	Cluster II		
Gene	NF-8	0.506	0.717	2.191	0.027	3.441	1.863	0.498	2.36	5.802
	OF-8	5.631	5.272	1.282	0.014	12.199	1.344	0.275	1.619	13.818
Transcript	NF-8	0.002	0.003	0.001	—‡	0.006	—	—	—	0.006
	OF-8	0.010	0.049	0.002	—	0.062	0.001	—	0.001	0.063

\*NF-8 and OF-8 represent the control and organic fertilized soil on the 8th day of N<sub>2</sub>O flux in the soil microcosm.

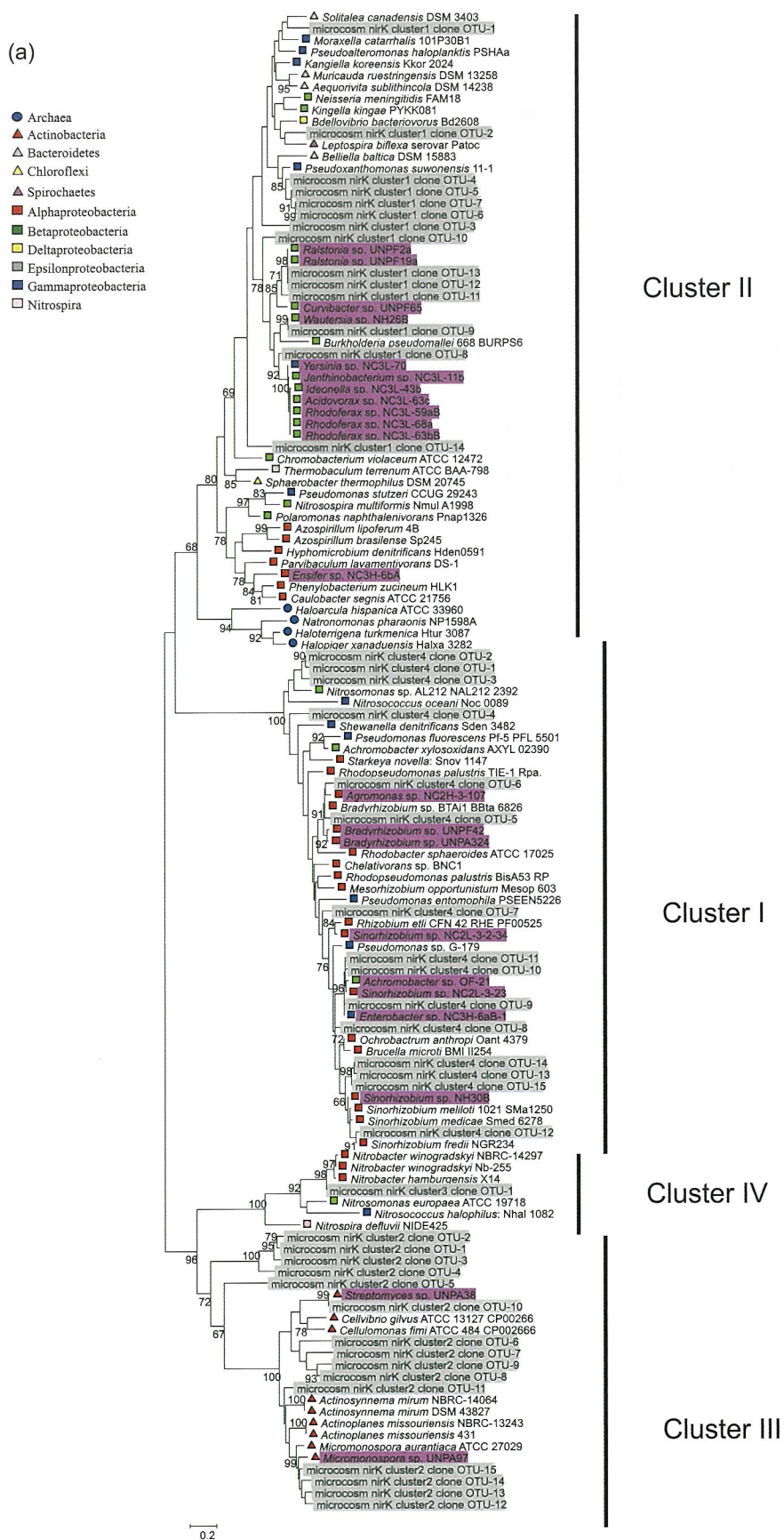
†Relative abundance of the nitrite reductase gene or transcript copies calculated as a percentage of the total bacterial 16S rRNA gene copies (for the mean and standard deviation of replicates).

‡Not detected.

で定量 PCR を行った。各クラスターに属する *nirK* と *nirS* の存在量は 16S rRNA 遺伝子の存在量で正規化し、異なる環境間で単位を標準化した。

クラスター I-IV に属する *nirK* とクラスター I-II に属する *nirS* は全ての環境サンプルにおいて検出された (Fig. 4)。クラスター III の *nirS* 配列は検出されな





**Fig. 5** Maximum likelihood phylogeny, including the sequences of the clones, denitrifying isolates and reference strains based on the partial *nirK* (a) and *nirS* (b) gene. Bootstrap values (500 replicates) greater than 65% are indicated above the branches. Branch lengths correspond to sequence differences indicated by the scale bar. The strains with pink backgrounds exhibited the denitrifying isolates. The clones with gray background exhibited the OTU sequences from each *nirK* and *nirS* cluster.



った, *nirS* のクラスター III には熱水環境から得られた *Epsilonproteobacteria* 綱細菌が有する *nirS* のみが含まれているが, 既往研究においても土壌や堆積物において *Epsilonproteobacteria* 綱細菌の存在量は極めて少ないことが報告されている (Roesch *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2013).

多くの研究において汎用のプライマーセット F1aCu/R3Cu (*nirK*) や cd3aF/R3cd (*nirS*) を用いて *nir* の定量が行われている. 本研究において作成したプライマーセットを用いて定量されたクラスター I に属する *nirK* と *nirS* の存在量は Cropland-3 を除き, 汎用のプライマーで定量された存在量と同等であった. しかし, 作成したプライマーセットで定量されたクラスター I-IV の *nirK* とクラスター I-II の *nirS* の全存在量は, 汎用プライマーセットで定量された存在量の約 2-6 倍であった. 本研究の結果から, 我々は環境中の脱窒微生物の存在量を著しく過小評価していたことが明らかとなった.

#### 畑地土壌マイクロコズムにおける $N_2O$ 生成と NirK と NirS 遺伝子の転写発現

作成したプライマーセットを用いて検出された *nirK* と *nirS* の転写発現について脱窒を活性化させた畑地土壌マイクロコズムを利用して検証した. 上述と同じように各クラスターに属する *nirK* と *nirS* の存在量は 16S rRNA 遺伝子の存在量で正規化した.

$N_2O$  生成速度が最も大きかった培養 8 日目において, クラスター I-III に属する *nirK* の DNA とクラスター I-II に属する *nirS* の DNA は施肥した土壌, していない土壌の両方で検出された (Table 4). クラスター I-II に属する *nirK* の DNA 存在量は施肥した土壌において, していない土壌より大きかったため, これらの *nirK* を有する微生物群が全体の微生物コミュニティの中で増殖したと考えられた. クラスター I-III に属する *nirK* の cDNA とクラスター I に属する *nirS* の cDNA は施肥した土壌, していない土壌の両方で検出されたが, 特にクラスター I-II に属する *nirK* の cDNA 量は施肥した土壌において大きかった (Table 4). 以上の結果から, クラスター I-III に属する *nirK* とクラスター I に属する *nirS* を有する微生物は, 施肥後の畑地土壌からの  $N_2O$  生成に大きく関与していること, 特に, クラスター I-II に属する *nirK* を有する微生物は  $N_2O$  生成活性が高く, 増殖速度も大きいと考えられた. 一方で, クラスター IV に属する *nirK* とクラスター II に属する *nirS* の DNA は検出されたが, cDNA は検出されなかったことから, クラスター IV の *nirK* を有する硝化細菌, ならびにメタン酸化細菌は施肥後の

畑地土壌からの  $N_2O$  生成への関与は小さいと考えられた.

我々は以前シングルセル分離法 (Ashida *et al.*, 2010) を用いて同じ土壌から多くの脱窒細菌を分離した (Nishizawa *et al.*, 2012). これらの分離株は脱窒活性と増殖速度を高めた条件で分離されたため (Ashida *et al.*, 2010; Nishizawa *et al.*, 2012), 土壌中で脱窒活性が高く, 増殖速度が大きい一群であると考えられる. 44 の分離株のうち, 24 の分離株はこれまで検出されてこなかった *nirK* または *nirS* を有していた. すなわち汎用のプライマーセットでは増幅されなかったが, 新たに作成したプライマーセットでは増幅された (Table 1). そこで土壌マイクロコズムから得られた *nirK* または *nirS* のクローン (Table 3) の配列と分離株の *nir* の配列を比較解析することで, 土壌マイクロコズムから得られた *nirK* または *nirS* を有する微生物が実際に脱窒能を有しているのか, またその系統分類を推定することを試みた. 土壌マイクロコズムから得られたクラスター I-III に属する *nirK* とクラスター I に属する *nirS* 111 クローンのうち 45 クローンは脱窒能が確認されている分離株の *nir* と高い相同性を示した (Fig. 5). これらの結果は上記の畑地土壌で検出された *nirK* または *nirS* を有する微生物群が機能的に重要である (実際に脱窒を担っている) という結論をより強固にするものである. またその 45 クローンのうち 26 クローンは *Enterobacter* sp., *Ensifer/Sinorhizobium* sp. が有するクラスター I に属する *nirK*, *Ralstonia* sp., *Curvibacter* sp., *Wautersia* sp., *Yersinia* sp. が有するクラスター II に属する *nirK*, *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp. が有するクラスター III に属する *nirK*, *Dechloromonas* sp. が有するクラスター I に属する *nirS* と高い相同性 (アミノ酸配列で 80% 以上) を示した. これらの分離株は脱窒の最終産物として  $N_2O$  を生成する ( $N_2O + N_2$  生成に対する  $N_2O$  の生成割合は 80% 以上). 分離株の数が限られているためすべてのクローンに対して対応する分離株を得られることはできていないが, 以上の結果から, これまで検出されてこなかった *nirK* や *nirS* を有する微生物群が施肥後の畑地土壌からの脱窒, 特に  $N_2O$  生成を活発に担っている一群であると考えられた. これらの微生物群の性質をさらに解析することにより, 農耕地土壌からの  $N_2O$  発生削減技術の確立に貢献できると期待される.

#### 要 約

環境の窒素循環において, 脱窒, すなわち微生物による硝酸から一酸化二窒素 ( $N_2O$ ) や分子状窒素

(N<sub>2</sub>)などのガス態窒素への還元反応は重要なプロセスである。N<sub>2</sub>Oは温室効果ガスの一つでありオゾン層破壊作用も有し、農耕地土壌が主要な人為的発生源となっている。脱窒において亜硝酸イオンから一酸化窒素(NO)への還元はキーとなるステップであり、亜硝酸還元酵素(NirKとNirS)によって触媒される。NirKとNirSをコードする遺伝子(*nirK*と*nirS*)はマーカー遺伝子として、環境中の脱窒微生物の分布、量、多様性、活性などを知るために利用されている。しかし、本研究において*nirK*と*nirS*の系統解析を行った結果、現在広く利用されているPCRプライマーでは限られた系統の*nirK*と*nirS*しか検出できないことがわかった。そこで我々は知られている全ての系統の*nirK*と*nirS*の検出を可能にするプライマーセットを新たに作成した。作成したプライマーセットを用いてクローンライブラリー解析と定量PCRを行った結果、陸域環境において*nirK*と*nirS*ははるかに多様であり、かつこれまで検出されてきたよりも2-6倍も豊富に存在していることが明らかになった。続いて、土壌RNAを用いたクローンライブラリー法ならびに定量PCRと培養法から、これまで検出されてこなかった*nirK*または*nirS*を有する微生物が、畑地土壌において脱窒、特にN<sub>2</sub>O生成に大きく関与していることがわかった。本研究で示す通り、我々はこれまで環境における脱窒微生物の役割を過小評価しており、本研究によって得られた知見と方法論はそれら脱窒微生物の役割を精確に理解するための重要かつ大きな前進であると言える。また、畑地土壌からのN<sub>2</sub>O発生に関わっている微生物の性質をさらに解析することにより、農耕地土壌からのN<sub>2</sub>O発生削減技術の確立に貢献できると期待される。

## 本助成で得られた研究成果の報告（口頭発表、原著論文）

### 口頭発表

- 1) 魏巍, 磯部一夫, 白鳥豊, 大塚重人, 妹尾啓史. 有機質固形肥料を施用した畑地土壌からのN<sub>2</sub>O生成カビの単離. 第28回日本微生物生態学会大会, 第4回日韓微生物生態シンポジウム (2012年9月19~22日)
- 2) 魏巍, 磯部一夫, 白鳥豊, 大塚重人, 妹尾啓史. 土壌表面に施用した有機質肥料からの糸状菌によるN<sub>2</sub>O発生. 日本土壤肥科学会関東支部大会 (2012年12月3日)
- 3) 魏巍, 磯部一夫, 白鳥豊, 西澤智康, 大塚重人, 妹尾啓史. 畑地土壌表面に施用した有機質肥料からの糸状菌脱窒によるN<sub>2</sub>O発生. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台) (2013年3月25~27日)
- 4) Keishi Senoo, Wei Wei, Kazuo Isobe, Satoshi Ishii,

Hiroki Ohno, Masahiro Tsuboi, Hideomi Itoh, Masahira Hattori, Kenshiro Oshima, Shigeto Otsuka, Identification and isolation of N<sub>2</sub>O-producing and -eliminating microorganisms in agricultural soils. 3rd International Conference on Nitrification, Tokyo (Sept. 2-5, 2013)

- 5) Wei Wei, Kazuo Isobe, Yutaka Shiratori, Tomoyasu Nishizawa, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo. Bacterial and fungal contribution to N<sub>2</sub>O emission in cropland field after basal and surface application of granular organic fertilizers. 日本土壤肥科学会2013年度名古屋大会 (2013年9月11~13日)
- 6) Keishi Senoo, Wei Wei, Kazuo Isobe, Yutaka Shiratori, Satoshi Ishii, Hiroki Ohno, Masahiro Tsuboi, Hideomi Itoh, Masahira Hattori, Kenshiro Oshima, Shigeto Otsuka, Fungal and bacterial denitrification in soil: The final step of N-cycle responsible for N<sub>2</sub>O emission and elimination. 18th International Congress on Nitrogen Fixation, Miyazaki JAPAN (Oct.14-18, 2013)
- 7) 妹尾啓史. 農耕地土壌の窒素変換微生物: 特定・分離と地球環境保全への応用. 新潟大学農学部セミナー (2013年12月25日)
- 8) Keishi Senoo. Denitrifying microbial community in agricultural soil: Key players involved in N<sub>2</sub>O generation and elimination. 20th World Congress of Soil Science, Jeju, Korea (June 8-13, 2014)

### 原著論文

- 1) Wei, W., Isobe, K., Shiratori, Y., Nishizawa, T., Ohte, N., Otsuka, S., & Senoo, K. (2014). N<sub>2</sub>O emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications of organic fertilizer. *Soil Biol. Biochem.*, **69**; 157-167.

## 保存機関に寄託した菌株

なし

## 謝 辞

本研究に対し多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所ならびに関係諸氏に深く感謝いたします。森林土壌ならびに底質の採取・収集にそれぞれご協力いただきました大手信人博士（東京大学大学院農学生命科学研究科）ならびに木庭啓介博士（東京農工大学大学院農学研究院）に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- Ashida, N., Ishii, S., Hayano, S., Tago, K., Tsuji, T., Yoshimura, Y., Otsuka, S. & Senoo, K. (2010). Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: Application to study denitrifying bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1211-1217.
- Bartossek, R., Nicol, G. W., Lanzen, A., Klenk, H. P. & Schleper,

- C. (2010). Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environ. Microbiol.* **12**: 1075–1088.
- Bouwman, A. F., Boumans, L. J. M. & Batjes, N. H. (2002). Emissions of N<sub>2</sub>O and NO from fertilized fields: Summary of available measurement data. *Global Biogeochem. Cy.* **16**: 1058–1071.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A. H. & Tiedje, J. M. (2000). Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2096–2104.
- Braker, G., Fesefeldt, A. & Witzel, K. P. (1998). Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3769–3775.
- Cantera, J. J. & Stein, L. Y. (2007). Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria. *Environ. Microbiol.* **9**: 765–776.
- Conrad, R. (1996). Soil organisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**: 609–640.
- Davidson, E. A. (2009). The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nat. Geosci.* **2**: 659–662.
- Francesca, C., Brown, K., Wilson, E. K., Bellelli, A., Arese, M., Tegoni, M., Cambillau, C. & Brunori, M. (2001). The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: Essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2232–2237.
- Hallin, S. & Lindgren, P. E. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1652–1657.
- Heylen, K., Vanparis, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. & De Vos, P. (2006). The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* **8**: 2012–2021.
- Hochstein, L. I. & Tomlinson, G. A. (1988). The enzymes associated with denitrification. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 231–261.
- Ishii, S., Ohno, H., Tsuboi, M., Otsuka, S. & Senoo, K. (2011). Identification and isolation of active N<sub>2</sub>O reducers in rice paddy soil. *ISME J.* **5**: 1936–1945.
- 伊藤英臣, 石井聡, 妹尾啓史 (2011). 農業環境分野へのメタゲノム解析の展開. *日本水産学会誌* **77**: 254
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L. & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J.* **7**: 417–426.
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**: 43–70.
- Leahy, J. G. & Olsen, R. H. (1997). Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration, and the effect of nitrate. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 23–30.
- Martin, T. L., Kaushik, N. K., Trevors, J.T. & Whiteley, H.R. (1999). Review: Denitrification in temperate climate riparian zones. *Water Air Soil Poll.* **111**: 171–186.
- Michotey, V., Mejean, V. & Bonin, P. (2000). Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1564–1571.
- Moir, J. W. B. (2011). Nitrogen cycling in bacteria: Molecular analysis. 236. Caister Academic Press
- Morales, S. E., Cosart, T. & Holben, W. E. (2010). Bacterial gene abundances as indicators of greenhouse gas emission in soils. *ISME J.* **4**: 799–808.
- Nishizawa, T., Uei, Y., Tago, K., Isobe, K., Otsuka, S. & Senoo, K. (2013). Taxonomic composition of denitrifying bacterial isolates is different among three rice paddy field soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**: 305–310.
- Nishizawa, T., Tago, K., Uei, Y., Ishii, S., Isobe, K., Otsuka, S. & Senoo, K. (2012). Advantages of functional single-cell isolation method over standard agar plate dilution method as a tool for studying denitrifying bacteria in rice paddy soil. *AMB Express* **2**: 50.
- Nolan, M., Tindall, B. J., Pomrenke, H., Lapidus, A., Copeland, A., Rio, T. G. D., Lucas, S., Chen, F., Tice, H., Cheng, J. F., Saunders, E., Han, C., Bruce, D., Goodwin, L., Chain, P., Pitluck, S., Ovchinnikova, G., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Brettin, T., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. & Detter, J. C. (2009). Complete genome sequence of *Rhodothermus marinus* type strain (R-10<sup>T</sup>). *Stand. Genomic Sci.* **1**: 283–290.
- Palmer, K., Biasi, C. & Horn, M. A. (2012). Contrasting denitrifier communities relate to contrasting N<sub>2</sub>O emission patterns from acidic peat soils in arctic tundra. *ISME J.* **6**: 1058–1077.
- Philippot, L., Čuhel, J., Saby, N. P.A., Chèneby, D., Chroňáková, A., Bru, D., Arrouays, D., Martin-Laurent, F. & Šimek, M. (2009). Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environ. Microbiol.* **11**: 1518–1526.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J. S. & Portmann, R. W. (2009). Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123–125.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A. O., Farmerie, W. G. & Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1**: 283–290.
- Sakurai, T. & Kataoka, K. (2007). Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol. Life Sci.* **64**: 2642–2656.
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F. & Osborn, A. M. (2007). Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**: 3612–3622.
- Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A. & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 401–417.
- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory

- nitrate reduction to ammonium. *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Zehnder AJB eds (JohnWiley & Sons, New York), p. 179–244.
- Tiedje, J. M. (1994). Denitrifiers. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*, eds Bottomley PS, Angle JS, Weaver RW (Soil Science Society of America, Madison) p. 253–254.
- Wei, W., Isobe, K., Shiratori, Y., Nishizawa, T., Ohte, N., Otsuka, S. & Senoo, K. (2014). N<sub>2</sub>O emission from cropland field soil through fungal denitrification after surface applications of organic fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* **69**: 157–167.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533–616.

## 細菌表層ストレス応答システムの新機能の解明

秋山芳展

京都大学ウイルス研究所がん遺伝子分野  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

### Novel functions of a bacterial extracytoplasmic stress response

Yoshinori Akiyama

Laboratory of Gene Analysis, Institute for Virus Research, Kyoto University  
53 Shogoin Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

*Escherichia coli* is equipped with multiple envelope stress-response systems to sense and cope with disorders of envelope constituents. Among them, the  $\sigma^E$ -dependent stress response system is the only essential one and thus would play pivotal roles to maintain proteostasis in the cell surface. However, the control mechanism of the  $\sigma^E$  stress response pathway and the cellular roles of the  $\sigma^E$ -regulated genes are not fully understood. In this study, we addressed these problems, focusing on the functions of cell surface proteases.

In the regulation of the  $\sigma^E$  pathway, membrane protease DegS responds to misassembled outer membrane proteins and introduces the first proteolytic cleavage into RseA, a single membrane-spanning anti- $\sigma^E$  protein, at the periplasmic side. Subsequently, RseP, an S2P family intramembrane-cleaving protease, introduces the second cleavage into the transmembrane region of RseA. RseP cleaves RseA only after DegS truncates the periplasmic part of RseA that suppresses the action of RseP. Previous studies suggest that the periplasmic PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) domains of RseP are involved in this negative regulation. We analyzed the three-dimensional structure of the two tandemly-arranged PDZ domains (PDZ tandem) and revealed that the two putative ligand-binding grooves constitute a single pocket-like structure that would lie just above the active center sequestered within the membrane. Complete removal of the PDZ tandem from RseP led to the intramembrane cleavage of RseA without prior truncation by DegS. These observations suggest that the PDZ tandem serves as a size-exclusion filter to accommodate the truncated form of RseA into the active center.

BepA (formerly YfgC) is one of the  $\sigma^E$ -controlled putative periplasmic metalloprotease. Disruption of the *bepA* gene sensitizes cells to multiple drugs, suggesting that it may be involved in maintaining outer membrane (OM) integrity. However, the specific function of BepA remains unclear. We showed that BepA enhances biogenesis of LptD, an essential OM protein (OMP) involved in OM transport and assembly of lipopolysaccharide, by promoting rearrangement of intramolecular disulfide bonds of LptD. In addition, BepA possesses protease activity and is responsible for the degradation of incorrectly folded LptD. Interestingly, defective oxidative folding of LptD caused by *bepA* disruption was partially suppressed by expression of protease-active site mutants of BepA, suggesting that BepA functions independently of its protease activity. These findings raised the possibility that BepA maintains the integrity of OM both by promoting assembly of OMPs and by proteolytically eliminating OMPs when their correct assembly was compromised.

Key words:  $\sigma^E$ , intramembrane proteolysis, cell surface proteases, transmembrane signaling, protein quality control

E-mail: yakiyama@virus.kyoto-u.ac.jp

共同研究者：檜作洋平(京都大学ウイルス研究所), 禾 晃和(横浜市立大学大学院生命医科学研究科), 小田隆士(横浜市立大学大学院生命医科学研究科), 佐藤 衛(横浜市立大学大学院生命医科学研究科), 高木淳一(大阪大学蛋白質研究所), 田畑早苗(大阪大学蛋白質研究所), 川上-田村 恵(大阪大学蛋白質研究所), 成田新一郎(京都大学ウイルス研究所, 現・盛岡大学栄養科学部), 舛井千草(京都大学ウイルス研究所), 堂前 直(理化学研究所グローバル研究クラスター), 鈴木健裕(理化学研究所グローバル研究クラスター)

### 緒 言

大腸菌を含むグラム陰性細菌の細胞表層は、細胞質を取り囲む内膜(細胞質膜)とその外側に存在する外膜の二重の膜から形成されており、二つの膜間領域はペリプラズム空間と呼ばれる。細胞表層に局在するタンパク質は、それら表層構造の維持や膜を超えた細胞

内外への物質の輸送、情報の伝達、代謝、細胞の運動など様々なプロセスに働いており、細胞機能の維持に必須の役割を果たしている。単細胞生物であるグラム陰性細菌では、細胞表層は直接外界と接しており、また外膜はイオン等の低分子物質は容易に透過するため、温度や pH、イオン濃度といった外環境の変化により細胞表層タンパク質は大きな影響を受け時には変性を起こす。このような表層タンパク質の異常は細胞の生存に重大な影響を及ぼしうることから、細胞にはその恒常性を維持するための機構が備えられている。これらは表層ストレス応答 (extracytoplasmic stress response) と呼ばれる。

大腸菌における表層ストレス応答には、 $\sigma^E$ , Cpx, Rcs, Psp 及び Bae 経路の 5 つが知られている (Laubacher & Ades, 2008)。このうち大腸菌では  $\sigma^E$  経路のみが細胞の生育に必須であり、最も研究の進んでいるストレス応答経路のひとつである。 $\sigma^E$  経路においては、転写因子 (シグマ因子)  $\sigma^E$  がストレスに応答した遺伝子の発現に関わる (Kanehara *et al.*, 2002; Ades, 2008; Lima *et al.*, 2013)。 $\sigma^E$  は、通常は一回膜貫通型アンチ  $\sigma^E$  タンパク質である RseA の細胞質ドメインに結合して不活性な状態に保たれている。細胞がストレスに晒されると、ストレスによって生じた異常な外膜タンパク質 (OMP) やリポ多糖 (LPS) の蓄積が引き金となり、ペリプラズム側に触媒部位を持つ膜プロテアーゼ DegS が活性化されて RseA をそのペリプラズム領域内で切断する。DegS による切断で生じた RseA 分解中間体は、続いて膜プロテアーゼ RseP によりその膜貫通領域内部で切断を受け、細胞質側ドメインを含む RseA 断片と  $\sigma^E$  の複合体は膜から遊離する。最終的に RseA 断片が ClpXP 等の細胞質プロテアーゼにより分解されることで  $\sigma^E$  がストレス応答遺伝子の転写に働く。このように細胞表層プロテアーゼは  $\sigma^E$  表層ストレス応答の制御に重要な役割を果たしているが、異常な表層タンパク質の分解等、ストレスへの対応にも直接的に関わっている。本研究では、応答制御に関わる RseP と、 $\sigma^E$  による発現制御を受ける BepA (YfgC) に焦点を当て、その構造・機能の解析を行った。

$\sigma^E$  ストレス応答経路において RseA の第 2 段階目の切断に働く RseP は、膜内切断プロテアーゼと呼ばれる一群のプロテアーゼに属する (Kroos & Akiyama, 2013)。プロテアーゼによるポリペプチドの切断は加水分解反応であり水分子を必要とするが、膜内切断プロテアーゼは、通常水分子の排除された脂質二重層内部で標的となる膜タンパク質の膜貫通部位を切断する点に特徴を持つ。膜内切断プロテアーゼは、S2P、ロンボイド (Rhomboid)、プレセニリン (Presenilin)/シ

グナルペプチドペプチデース (SPP) の三つのファミリーに分類され、原核生物から高等真核生物まで広く生物界で膜を超えたシグナル伝達や膜タンパク質の機能制御、品質管理等様々な細胞内プロセスにキーとなる働きをしている (Wolfe, 2009)。RseP は S2P ファミリーに属する膜 4 回貫通型タンパク質であり、中央のペリプラズム領域には 2 つの連続した PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) ドメイン (PDZ タンデム: 個々の PDZ ドメインを N 末端側からそれぞれ PDZ-N, PDZ-C と呼ぶ) を持つ (Inaba *et al.*, 2008)。PDZ ドメインは、一般にリガンドタンパク質の C 末端領域を特異的に認識結合するタンパク質間相互作用に関わるタンパク質モジュールであり、多くのタンパク質に存在する (Jeleń *et al.*, 2003)。細菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼは、ストレス応答制御を始め、細胞分裂、細胞分化などにも関わり、病原性の発現等にも重要な役割を果たすことから (Schneider & Glickman, 2013)、その機能・構造の解析について多くの研究がなされてきた。上述の通り、大腸菌の RseP は RseA の 2 段階目の切断を行うが、通常は全長の RseA を直接切断することはできない。この「負の制御」は、DegS がストレスセンサーとして働くことを考えれば、ストレスに応じた遺伝子発現を保証するために必要な機構であり、 $\sigma^E$  ストレス応答機構を理解するためには重要な問題である。これまでに、精製タンパク質を用いた生化学的解析や 2 つの PDZ ドメインを個別に発現し構造解析を行った結果に基づき、「DegS による第 1 段階目の切断により新たに生じた RseA の C 末端残基 (Val-148) が、RseP の PDZ-C ドメインに特異的に結合する。これが RseP による第 2 段階目の切断が起こるために必要である」とするモデルが提唱された (Li *et al.*, 2009)。このモデルは、DegS による切断を受けた RseA 分解中間体のみを RseP が切断することを上手く説明する。しかしながら、我々は、生細胞中で PDZ ドメインを欠失した RseP の変異体や、RseA 分解中間体の C 末端残基 (Val-148) を他のアミノ酸に置換した変異体を発現し、RseP による RseA 切断機能を解析した結果、RseP PDZ ドメインによる RseA の C 末端残基の結合は、RseA の切断には必要ないことを示した (Hizukuri & Akiyama, 2012)。このような食い違いは、本来 RseP と RseA がともに 2 次元平面である膜に組み込まれた状態で働くのに対し、前記モデルが界面活性剤で可溶化したタンパク質を用いた解析の結果に基づくことによるものと推測される (Hizukuri & Akiyama, 2012)。RseP の PDZ ドメインは、個別に発現した PDZ-N, PDZ-C の構造は明らかになっているが (Inaba *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009)、それらがお互いに



対してどのような配置をとるかは分かっていない。このような知見を踏まえ、本研究ではPDZ タンデム全体の構造を決定し、その構造を元に *in vivo* での解析を行って RseP 機能制御における PDZ ドメインの役割を検討した (Hizukuri *et al.*, 2014)。

これまでに  $\sigma^E$  ストレス応答による発現制御を受ける遺伝子が 114 個同定されている (Bury-Moné *et al.*, 2009)。これらの中には、プロテアーゼやそのホモログをコードするものが複数含まれており、プロテアーゼが RseP や DegS のようにストレス応答経路の制御に関わるだけではなく、直接ストレスに対抗して働く作用因子としても重要な役割を持つことが示唆される。これらのうち、ペリプラズムには、DegP, PtrA, YhiJ 及び YfgC という 4 つのプロテアーゼ/プロテアーゼホモログが存在する。DegP はプロテアーゼ機能と分子シャペロン機能を併せ持ち、異常な表層タンパク質の分解とともに外膜タンパク質の外膜へのアセンブリーにも働くことが知られているが (Spiess *et al.*, 1999)、他の 3 つのプロテアーゼホモログの機能は明らかではなかった。最近、大腸菌の染色体遺伝子を個別に欠損させた菌株ライブラリー (Keio コレクション) (Baba *et al.*, 2006) のスクリーニングから、YfgC の欠損により細胞が種々の抗生物質や薬剤に感受性となることを見出された (Liu *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011; Nichols *et al.*, 2011)。外膜は抗生物質や薬剤への障壁として働くことから、YfgC は外膜機能の維持に関わることが示唆される。YfgC は M48 ファミリーの亜鉛メタロプロテアーゼと相同性を持つ。本研究では我々は YfgC に注目して機能解析を行い、YfgC が外膜タンパク質の生合成や品質管理に働くことを見出して、このタンパク質を BepA ( $\beta$ -barrel assembly-enhancing protease A) と名付けることを提案した (Narita *et al.*, 2013)。

## 実験方法

### 菌株、プラスミド及び培地

本研究で用いた菌株のうち、AD16 (野生株) (Kihara *et al.*, 1996), KK211 ( $\Delta rseA$ ,  $\Delta rseP$ ) (Kanehara *et al.*, 2002), KK374 ( $\Delta rseA$ ,  $\Delta rseP$ ,  $\Delta degS$ ) (Akiyama *et al.*, 2004) については過去に記載されている。GC187 ( $\Delta lptE$ ,  $\Delta(\lambda_{att-lom})::bla-P_{ana}lptE(atg)-araC$ ; アラビノースにより細胞内 LptD の量を調節可能) は T. Silhavy (Princeton 大学) から供与を受けた。SN56 及び SN1194 は、Keio コレクション (Baba *et al.*, 2006) の *bepA::kan* 株からこのマーカーを P1 形質導入によりそれぞれ AD16 及び GC187 へ

と移した後、部位特異的相同組み替えにより *kan* カセットを除いて作成した。

pKK11(*rseP-his<sub>6</sub>-myc*) (Kanehara *et al.*, 2001), pKK34(*rseP(R23Q)-his<sub>6</sub>-myc*) (Kanehara *et al.*, 2001), pTGF13(*rseP(L151P)-his<sub>6</sub>-myc*) (Inaba *et al.*, 2008), pYH126 (*rseP* ( $\Delta$ PDZ-NC)-*his<sub>6</sub>-myc*) (Hizukuri & Akiyama, 2012) については過去に記載されている。pYH129 は、pYH126 に部位特異的変異導法により E23Q 変異を導入して作成した。pYH181 は pSTD892 (Koide *et al.*, 2007) からシステイン残基を持たない (Cys-less) RseP-His<sub>6</sub>-Myc をコードする遺伝子をベクター pTWV228 (Takara Bio Inc.) にクローニングして作成した。RseP シングルシステイン (single Cys) 変異体プラスミドは、pYH181 に変異導入をおこなうことで作成した。pTH-bepA-his<sub>10</sub> は、大腸菌染色体 DNA から適切なプライマーを用いて PCR により *bepA-his<sub>10</sub>* 断片を増幅し、ベクター pTH18r (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 2000) にクローニングして作成した。E137Q, H136R 変異型遺伝子を持つ pTH-bepA-his<sub>10</sub> の派生体は部位特異的変異導入により作成した。pMAN-lptE は、大腸菌染色体 DNA から適切なプライマーを用いて PCR により *lptE* 断片を増幅し、ベクター pMAN885EH (Yakushi *et al.*, 1997) にクローニングして作成した。

菌株の培養には、L 培地 (Hizukuri & Akiyama, 2012) または M9 最少培地 (Hizukuri & Akiyama, 2012) を用い、必要に応じてアンピシリン (50  $\mu$ g/ml), カナマイシン (25  $\mu$ g/ml), エリスロマイシン (5  $\mu$ g/ml) またはクロラムフェニコール (20  $\mu$ g/ml) を加えた。

### *Aquifex aeolicus* RseP ホモログ (*AaRseP*) の PDZ ドメイン (*AaPDZ* タンデム) の精製

GST-*AaPDZ* タンデムをコードするプラスミドは、*AaPDZ* タンデムをコードする DNA 断片を *Aquifex* ゲノム DNA (H. Huber (Rosenburg 大学) から供与) から PCR を用いて増幅し、ベクター pGEX-2T (GE Healthcare, Inc.) にクローニングすることで構築した。このプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、1mM IPTG で発現を誘導した。菌体をリン酸緩衝液 (PBS) 中で破碎の後、可溶性分画を Glutathione-Sepharose (GE Healthcare, Inc.) と混合して GST-*AaPDZ* タンデムをレジンを結合させ、洗浄の後 *AaPDZ* を TEV プロテアーゼを用いたカラム中での切断により溶出した。溶出分画は、さらに HiTrap SP FF (GE Healthcare, Inc.) および Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, Inc.) を用いたカラムクロマトグラ

フィーにより精製した。

#### **AaPDZ** タンデムの X 線構造解析と anti-AaPDZ モノクローナル抗体の調製

精製した AaPDZ タンデムタンパク質を単独で、あるいは anti-AaPDZ モノクローナル抗体の Fab 断片との複合体として結晶化した。X 線回折データは、Photon Factory BL-17A あるいは SPring-8 BL-44XU を用いて収集した。結晶化の条件、収集データと精密化の詳細は Hizukuri *et al.* (2014) の記載を参照。構造は CCP4 プログラムを用いて解析した。anti-AaPDZ モノクローナル抗体は精製した AaPDZ タンデムタンパク質を抗原として作製した。Fab 断片は精製したモノクローナル抗体をパivainで処理して調製した。

#### **In vivo RseA** 切断アッセイと **EcRseP single Cys** 変異体の化学修飾実験

大腸菌 KK221 株に野生型あるいは変異型 RseP-His<sub>6</sub>-Myc をコードするプラスミドと、HA-RseA をコードするプラスミドを導入し、20種類のアミノ酸（各 20 μg/ml）、2 μg/ml チアミン、0.4% グルコース、1 mM IPTG、1 mM cAMP を含む M9 最少培地で 3 時間 30°C で培養した。その後、全細胞質タンパク質をトリクロロ酢酸処理により沈殿させた。SDS ゲル電気泳動後に HA 抗体または Myc 抗体（Santa Cruz Biotchnology Inc.）を用いた免疫プロットングにより解析した。

methoxypolyethylene glycol 5000 maleimide (mal-PEG-5k) を用いた修飾実験は次のようにおこなった。大腸菌 KK374 株に Cys-less あるいは single Cys 型 RseP-His<sub>6</sub>-Myc をコードするプラスミドを導入し、1 mM IPTG、1 mM cAMP を含む L 培地で 2.5 時間 30°C で培養した。細胞を回収後 20% ショ糖を含む 30 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) に懸濁し、1 μg/ml リゾチーム/10 mM EDTA 処理によりスフェロプラスト化した。その一部をとって、5 mM 塩化マグネシウム、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 及び 1 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine 存在下に 0°C において 3 分間 1% Triton X-100 で処理して膜を可溶化した。トライトン X-100 処理をしたサンプル、しないサンプルそれぞれに 1 mM mal-PEG-5k を加えて 4°C で記載した時間保温した。修飾反応は最終濃度 10% の 2-メルカプトエタノールを加えることで停止した。タンパク質はトリクロロ酢酸処理により沈殿させ上記と同様に解析した。

#### **BepA** の精製と *in vitro* プロテアーゼ活性の解析

BepA 精製用のプラスミド pCDF-bepA-his<sub>10</sub> は、

BepA<sub>His10</sub> をコードする DNA 断片を PCR により増幅し、pDCFDuet-1 (Novagen) にクローニングすることにより構築した。これらプラスミドを KRX 株 (Promega) に導入し、0.1% ラムノースを含む L 培地で 37°C で OD (600 nm) が 1 になるまで培養した。細胞を回収後、1 μg/ml DNase I を含む 20 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、フレンチプレスで菌体を破碎した。その遠心上清を TALON レジン (Clontech) カラムにかけて、BepA<sub>His10</sub> を結合させ、0、5 あるいは 20 mM イミダゾールを用いて溶出した。

*in vitro* での BepA プロテアーゼ活性測定は、精製した BepA (200 μg/ml) と *a* カゼイン (400 μg/ml) を反応液 (20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)、0.05% *n*-dodecyl-β-D-maltopyranoside 及び 10 μM 塩化亜鉛を含む) 中で混合し、37°C で保温することでおこなった。

#### パルス・チェイス実験

大腸菌株を、メチオニンを除く 19 種類のアミノ酸（各 20 μg/ml）、2 μg/ml チアミン、0.4% グルコースを含む M9 最少培地で 30°C あるいは 37°C で培養した。Fig. 7B で示した実験においては、グルコースの代わりに 0.2% マルトースと 1 mM IPTG を加えた。培養液に 370 kBq/ml の [<sup>35</sup>S]-メチオニンを加えて 1 分間標識し、最終濃度 0.04% の非標識メチオニンを加えることでチェイスを開始した。表示した時間で培養液の一部をとり、トリクロロ酢酸処理によりタンパク質を沈殿させ、1% SDS 及び 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) に可溶化した。50 mM NaCl, 2% (wt/vol) Triton X-100、及び 0.1 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) で 20 倍に希釈した後、不溶物を遠心分離により除去し、上清を LptD 抗体及び Dynabeads Protein A (Invitrogen) を用いた抗体沈殿に供した。沈殿回収したタンパク質は、SDS ゲル電気泳動と BAS-1800 イメージアナライザー (Fujifilm) で解析した。

## 結果と考察

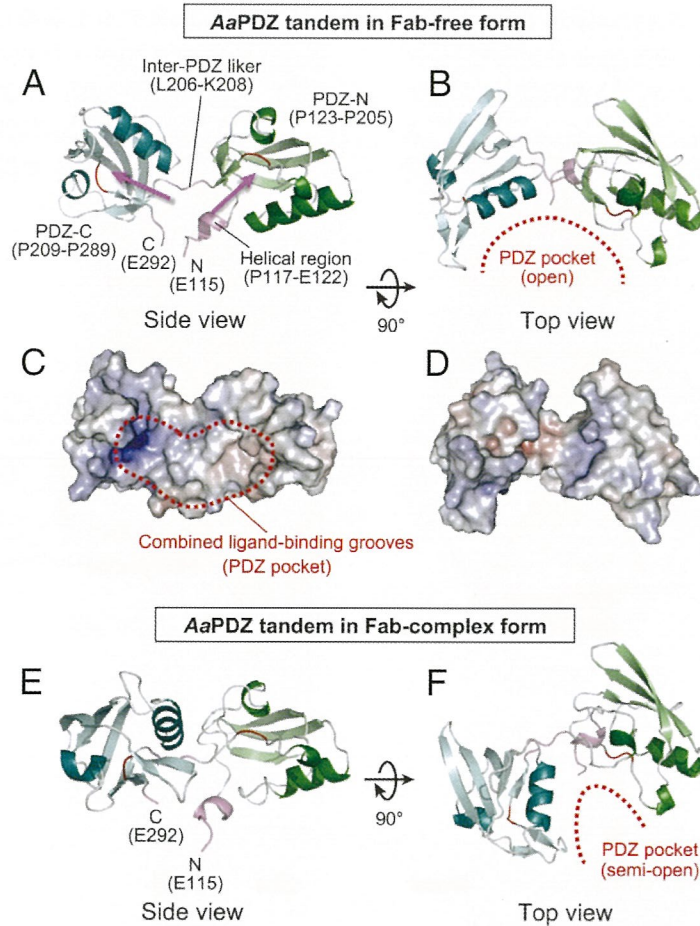
### RseP の構造と機能の解析

#### **Aquifex aeolicus RseP** ホモログの PDZ タンデムの結晶構造

我々は以前に、連結した大腸菌 PDZ-N/PDZ-C ドメイン (*Ec*PDZ タンデム) の結晶化を試みたが成功せず、X 線小角散乱解析の結果から *Ec*PDZ タンデムがタンベル上の概形を持つことを示唆した (Inaba *et al.*, 2008)。大腸菌 RseP (*Ec*RseP) の PDZ ドメイン間に

は6残基のリンカー領域が存在しており、全体として構造の柔軟性が高いため結晶が得られなかったことが考えられる。一方、好熱菌 *Aquifex aeolicus* の RseP ホモログ (*AaRseP*) ではリンカー領域の長さが3残基と短く、より結晶化に適するものと推測されたことか

ら、*AaRseP* の PDZ タンデム (*AaPDZ* タンデム) を発現精製し、結晶化及びX線構造解析を試みた。その結果、2.8Åの分解能で構造を決定した (Fig. 1A-D)。*AaPDZ* タンデムは全体として二枚貝様の構造を持ち、推定リガンド結合部位は分子の同じ側に位置してお



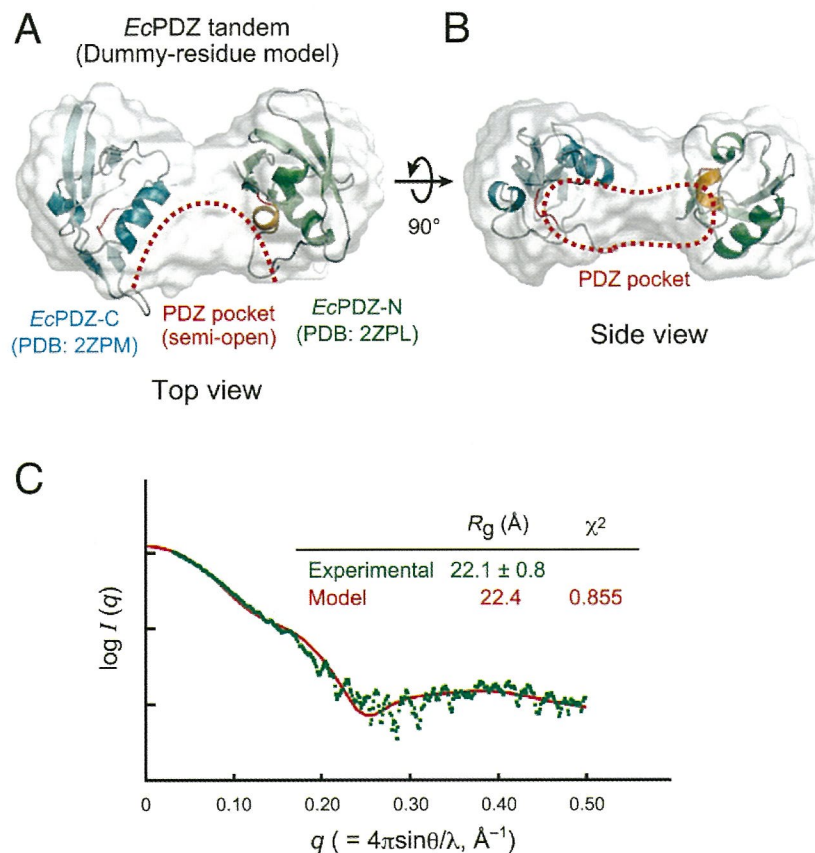
**Fig. 1** Crystal structures of *AaPDZ* tandem of RseP in Fab-free form and Fab-complex form. (A, B) Ribbon representation of the crystal structure of the Fab-free form shown in two different views. All of the residues included in the construct (from E115 to E292) were assigned in this model. PDZ-N and -C are shown in green and cyan, respectively. Additional regions in the N- and C-termini and the inter-PDZ linker are colored in light pink. Residues P117-E122 in the N-terminus assume a helical structure. The carboxylate-binding loops of the two PDZ domains are highlighted in red and the directions of the putative ligand-binding in the canonical binding mode are indicated with magenta arrows. The PDZ pocket is indicated with a red dotted line. (C, D) Electrostatic surface of *AaPDZ* tandem in the Fab-free form. The molecular surface is colored according to the electrostatic surface potential from +10 kT/e (blue) to -10 kT/e (red). The two ligand-binding grooves constituting the PDZ pocket are enclosed with red dotted lines. (E, F) Ribbon representation of crystal structure in the Fab-complex form. One of the two *AaPDZ* tandem fragments in the asymmetric unit of the crystal (chain B) is extracted and shown in two different views. Compared with the Fab-free form, the two ligand-binding grooves are closer to one another and the PDZ pocket (red dotted line) assumes a “semi-open” conformation. (Reproduced from Hizukuri *et al.*, 2014)

り、推定リガンド結合部位のくぼみは一つのポケットを形成していた。*EcRseP*の場合と同様に*AaRseP*においても、個々のPDZドメインは典型的なPDZドメインとよく似た立体構造をとっていたが、典型的なPDZドメインの一次構造と比較するとこれらの一次構造は循環配列 (circular permutation) 型となっており、このために推定リガンド結合部位が一つのポケットを形成することができる。同様に、モノクローナル抗体 Fab 断片と *AaPDZ* タンデムの複合体構造も 2.2 Å の分解能で決定した (Fig. 1E, F)。Fab 結合型 *AaPDZ* タンデムは、個々のPDZドメインの構造は単独 *AaPDZ* タンデムの構造とほぼ一致したが、ドメイン間の角度が異なり推定リガンド結合部位同士がより近接した配置

(semi-open 型) をとっていた。PDZドメイン間の角度や距離はある程度の揺らぎを持ちうることが示唆される。

X線小角散乱解析結果を用いた *EcPDZ* タンデム構造モデルの構築

*AaPDZ* ドメインの構造と以前行った X線小角散乱解析の結果 (Inaba *et al.*, 2008) を利用して *EcPDZ* ドメインの構造モデルを構築した (Fig. 2A, B)。まず、*EcPDZ* タンデムの個々のPDZドメインを *AaPDZ* タンデム構造 (Fab 結合型) に重ね合わせ、両ドメインの角度を保ったまま X線小角散乱解析から得られた概形に当てはめて両ドメインの距離を調整した。このよう



**Fig. 2** Modeling of the *EcPDZ* tandem structure of RseP. (A, B) Superposition of the crystal structures of *EcPDZ*-N and -C domains with the envelope of the dummy-residue model in two different views. The ribbon representation of the two domains is colored as in Fig. 1. The relative distance of the *EcPDZ*-N and -C domains were adjusted on the assumption that the *EcPDZ* tandem adopts a semi-open conformation similar to the crystal structure of the *AaPDZ* tandem in the Fab-complex form. The PDZ pocket constituted by the two putative ligand-binding grooves is indicated with a red dotted line. (C) Fit of the theoretical scattering profile for the predicted model with the experimental SAXS data. The  $R_g$  and  $\chi^2$  values are shown in the inset table. (Modified from Hizukuri *et al.*, 2014)

にして得られた構造モデルから計算された散乱カーブは実験値とよく一致した (Fig. 2C). これらの結果は, *Ec*PDZ タンデムも, *Aa*PDZ タンデムと同様に二枚貝様の構造をとることを示唆しており, RseP タイプの S2P ホモログの PDZ タンデムが共通して同様な構造をとることが推定される.

#### PDZ タンデムの膜上の配向

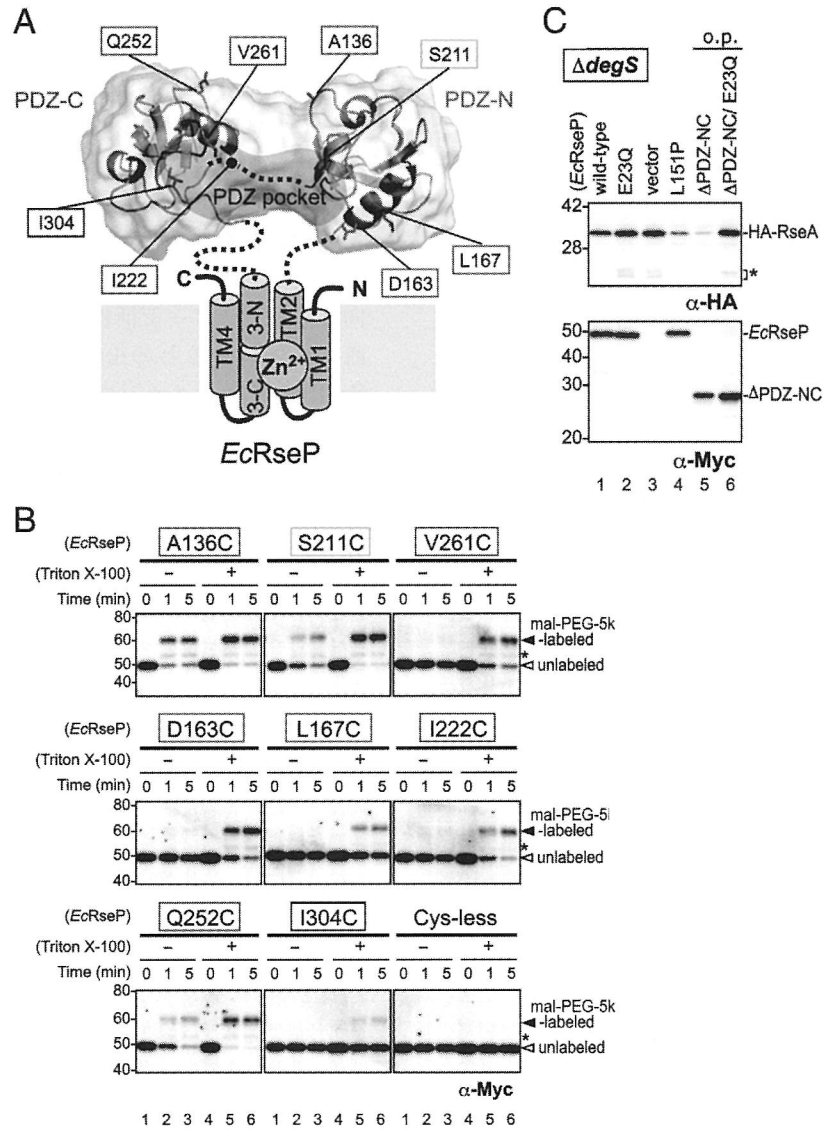
次に内膜に正常に組み込まれた状態の *Ec*RseP において PDZ タンデムがどのような配向をとるかを調べた. これまでに S2P ファミリープロテアーゼとしては, 唯一 *Methanocaldococcus janaschii* のホモログ (*Mj*S2P) の結晶構造が報告されている (Feng *et al.*, 2007). *Mj*S2P は PDZ ドメインを持たないが, プロテアーゼ活性部位モチーフを含む膜内コアドメインのアミノ酸配列は S2P ファミリー間で保存されており (Kinch *et al.*, 2006), *Ec*RseP とも有意な相同性を持つ. これらの配列の比較から, *Ec*RseP の PDZ-N ドメインは 2 番目の膜貫通領域 (TM2) と 8 残基の短いリンカーにより繋がっていることが推測され, PDZ タンデムは膜の直上に位置し, ポケット構造を膜表面側に向けて配置することが推定される. この点について検証するために, サイズの大きな膜不透過性チオール修飾試薬 mal-PEG-5k (分子量約 5,000) を用いた修飾実験を行った. 部位特異的変異導入法により, システイン残基を持たず, C 末端にヘキサヒスチジン-ミックタグ ( $\text{His}_6\text{-Myc}$  タグ) を付加した *Ec*RseP (*Cys-less EcRseP-His<sub>6</sub>-Myc*) の PDZ の種々の位置に 1 つだけシステイン残基を導入することでシングルシステイン (single Cys) 型変異体を作成した (Fig. 3A). これら変異体を発現した細胞からスフェロプラストを調製し, 導入したシステイン残基の mal-PEG-5k 処理による修飾の程度を比較した (Fig. 3B). mal-PEG-5k は比較的大きな分子サイズを持つことから, この試薬による修飾は SDS ゲル電気泳動において顕著に移動度が遅延することを指標に容易に検出ができる. PDZ タンデムのポケット内部に導入したシステイン残基 (V261C, I222C) は mal-PEG-5k による修飾がほとんどみられなかったが, ポケット外部の分子表面に導入したもの (Q252C, A136C) は迅速な修飾を受け, ポケット入り口付近に位置するシステイン残基 (S211C) は相対的にゆっくりと修飾された. いずれの残基も界面活性剤で内膜を可溶化した状態では効率よく修飾を受けた. これらの結果は, 膜に組み込まれた RseP においては, ポケット内部はサイズの大きな mal-PEG-5k は近づけないことを示している. また, D163C 及び L167C は, PDZ タンデムの表面に位置す

るものの, 内膜を可溶化したときにのみ修飾された. このことは, これらの残基の位置が膜表面近傍に位置するため, 分子表面にあるにもかかわらず膜構造が保たれた状態では修飾試薬が近づけないことを示している. I304C は膜可溶化の有無にかかわらず, 修飾を受けなかったが, これは I304C が折りたたまれたドメイン内部に存在されるためであると考えられる. これらの結果は, PDZ タンデムがポケット構造を膜表面側に向けてプロテアーゼ活性部位の存在する膜ドメインの直上に配置するとのモデルを支持するものである. RseP の PDZ ドメインの一次構造が循環配列となっていることは, PDZ タンデムがポケットを膜表面側に向けて配置するのに必須である. 例えば, PSD-95 タンパク質など一般的な一次構造を持つ PDZ ドメインのタンデムでは, 推定リガンド結合領域は一つのポケットを作らず, 膜表面側にも配向しない.

PDZ タンデムが上述のような配置をとるとすれば, 基質が比較的大きなペリプラズムドメインを持つ場合, PDZ タンデムは基質が膜内部の活性部位へと近づくことを妨げる立体障害となるが, ペリプラズム領域が小さければ PDZ ドメインの間を通過して接近可能となると予想される. この可能性を検討するために, PDZ タンデム全体を欠失させた RseP 変異体 (RseP( $\Delta$ PDZ-NC)) による基質 HA-RseA (N 末端にヘマグルチニンタグ (HA タグ) を付加した RseA) の切断を調べた (Fig. 3C). これらのタンパク質を染色体 *rseA/degS/rseP* を欠失した株 (DegS による第 1 段階目の切断が起こらない) で発現したところ, HA-RseA は野生型 RseP による切断は受けなかったが, 予想通り RseP( $\Delta$ PDZ-NC) によっては DegS 非依存的に切断された.

#### PDZ タンデムによる基質選択機構のモデル

以上の結果から, 我々は PDZ タンデムがサイズ排除フィルターとして機能して, 全長 RseA (DegS による切断を受けていない RseA) の RseP 活性部位への接近を阻止するとのモデルを提唱する (Fig. 4). このモデルは過去の多くの知見を説明する. 例えば, ペリプラズムタンパク質 RseB は RseA のペリプラズム領域に結合するが, RseB 欠損下では RseP は僅かながら DegS 非依存的に全長 RseA を切断しうる (Grigorova *et al.*, 2004). RseB が RseA のペリプラズム領域に結合した状態では, PDZ フィルターの働きで RseA は RseP の活性部に近づけないが, DegS により RseA が切断を受けると RseB はもはや RseA に結合できず, RseA 分解中間体は RseP 内部へと到達できる (Fig. 4). RseB が結合していない場合, RseA のペリプラズム領域は



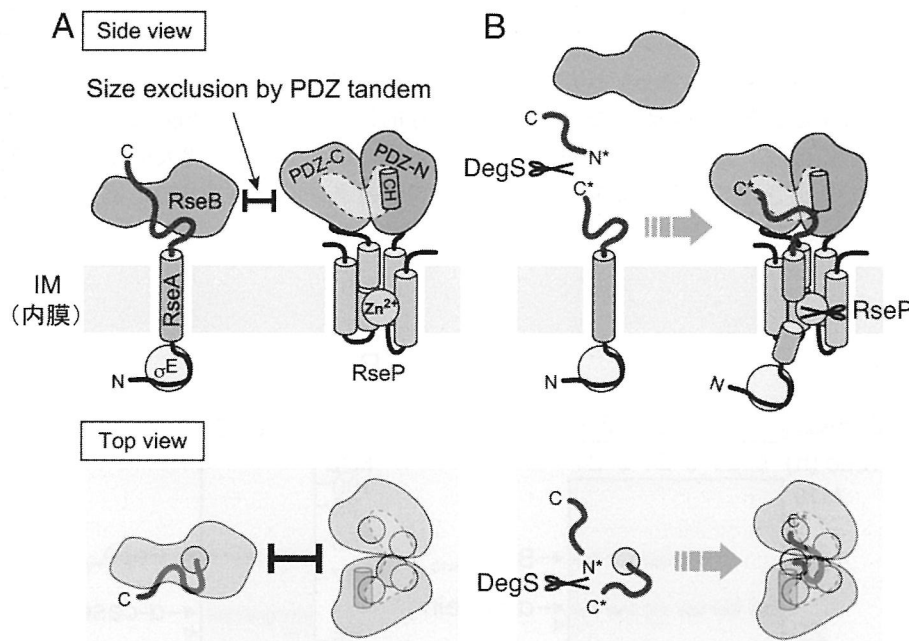
**Fig. 3** Structural model of *EcRseP* and effect of removal of PDZ tandem. (A) Model of the full-length *EcRseP*. The structural model of the *EcPDZ* tandem is represented as in Fig. 2. The PDZ-pocket (as indicated with red in the envelope) is presumed to lie just above the active center constituted by the helix-bundle of the TM domains. The residues replaced with cysteine are highlighted with stick-models in magenta. (B) The mal-PEG-5k modifiability of introduced Cys residues. C-terminally His<sub>6</sub>-Myc-tagged *EcRseP*(Cys-less) or its single cysteine derivatives in *E. coli* spheroplasts were treated with mal-PEG-5k in the presence or absence of Triton X-100 for the indicated times. Trichloroacetic acid (TCA)-precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-Myc monoclonal antibodies. Positions of molecular size markers (in kilodaltons) are indicated on the left. The closed arrowhead indicates the mal-PEG-5k-labeled form of *EcRseP* derivatives. The asterisk indicates *EcRseP* derivatives modified with a minor mal-PEG-5k component with a smaller mass, as reported previously (Koide *et al.*, 2007). The mutations were classified into five categories depending on their location and are indicated with differently colored squares. (C) DegS dependency of RseA cleavage by *EcRseP* derivatives. HA-RseA was expressed in *rseA/rseP/degS*-triple deletion cells together with *EcRseP* or its derivatives; lane 3 is vector control using pTWV228. TCA-precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using anti-HA polyclonal and anti-Myc monoclonal antibodies. The asterisk indicates C-terminally cleaved products of HA-RseA that were produced by the action of an unidentified protease, as reported previously (Kanehara *et al.*, 2003). *EcRseP*(DPDZ-NC) and *EcRseP*(DPDZ-NC/E23Q) were overproduced from pUC-based high copy plasmids (as indicated with "o.p.") due to their lower stability in *E. coli*. (Modified from Hizukuri *et al.*, 2014)

強固な折りたたみ構造をとれず (Walsh *et al.*, 2003), 一部は PDZ フィルターをすり抜けて切断されるのであろう。また, PDZ ドメインのある種のミスセンス変異により, RseP が DegS 非依存的に全長 RseA を切断できるようになるが (Inaba *et al.*, 2008), この場合は変異により PDZ タンデムの構造が変化し, フィルター機能が不全となったものと推測される。

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (サルモネラ) も大腸菌とよく似た  $\sigma^E$  経路表層ストレス応答システムを持つ。サルモネラでは, 酸性ストレス条件下においては, 全長 RseA が DegS 非依存的に RseP による切断を受ける (Muller *et al.*, 2009)。サルモネラは感染時に宿主のマクロファージに貪食されるが, 上記酸性ストレス応答は, ファゴソームの酸性環境におけるサルモネラの生存に貢献しているらしい。酸性ストレスは, RseP PDZ タンデムの構造変化を誘起し, フィル

ター機能が解除されることで DegS 非依存的な RseA の切断が起こるのかもしれない。大腸菌においても, 酸性ストレスを含む何らかのシグナルにより, 同様な DegS 非依存的な  $\sigma^E$  経路の活性化が起こる可能性もあり, 今後検討する必要がある。

PDZ ドメインを持つ S2P ファミリーホモログでは, 基質の大きな非細胞質領域の切断除去は, 膜内切断を起こすために共通して必要とされる。我々は最近分泌タンパク質のシグナルペプチドも RseP の基質となることを見出したが, このシグナルペプチドの切断においても, 先だってシグナルペプチドが分泌タンパク質から切り離される必要がある (Saito *et al.*, 2011)。また, ヒト S2P によるその基質 ATF6 の切断の場合も, ATF6 の非細胞質側領域の大きさが切断効率に影響する (Shen & Prywes, 2004)。ヒト S2P は RseP とは異なり PDZ ドメインを 1 つだけ持つが (Kinch *et al.*,



**Fig. 4** Model for the negative regulation of the intramembrane proteolysis of RseA through the PDZ tandem. (A) Suppression of the intramembrane proteolysis under unstressed conditions. Before the first cleavage by DegS, RseA forms a complex with RseB in the periplasmic region, and its entry into the active center is blocked through the size-filtering function of the PDZ tandem. The combined putative ligand-binding grooves within the PDZ tandem are enclosed within the dotted line. The capping helix (CH) found in the *E. coli* PDZ-N domain is indicated with the orange column. (B) Entry of RseA into the RseP active center under stress conditions. After the first cleavage by DegS, the reduced-size periplasmic region of RseA becomes capable of entering into the PDZ pocket. As a consequence, the TM segment of RseA is susceptible to cleavage by RseP. The upper panels represent side views parallel to the membrane plane, and the lower panels are top views perpendicular to the membrane plane from the periplasmic side. (Reproduced from Hizukuri *et al.*, 2014)

2006), この PDZ ドメインは RseP の PDZ タンデムに匹敵する大きさを持ち, 単独でサイズ排除フィルターを形成できるのかもしれない。

RseP の機能制御機構をさらに詳細に解明するためには, RseP 全長の構造解明が必要となろう。

### BepA 機能の解析

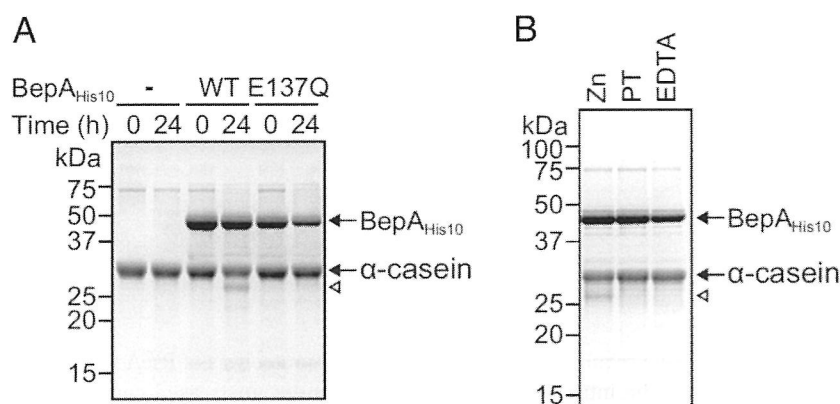
#### BepA (YfgC) の酵素機能: プロテアーゼ活性の検出

BepA は亜鉛メタロプロテアーゼ活性部位モチーフ H<sup>136</sup>EXXH を持つが, 実際にプロテアーゼ活性を持つか否かはこれまで明らかでは無い。BepA 機能の解明のため, まず生化学的にプロテアーゼ活性を検出することを試みた。C 末端にデカヒスチジンタグ (His<sub>10</sub>) を付加した BepA (BepA<sub>His10</sub>) 及び H<sup>136</sup>EXXH モチーフ内にアミノ酸置換を導入した H137Q 変異体を金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。これら精製タンパク質をモデル基質である  $\alpha$  カゼインと混合し 37°C で保温すると, 野生型 BepA を用いたときにのみ弱いながら  $\alpha$  カゼインの分解が確認された (Fig. 5A)。この分解は亜鉛の添加に依存し, キレート剤である EDTA や 1,10-フェナンスロリンにより阻害された (Fig. 5B)。これらの結果から BepA が実際にプロテアーゼ活性を保持することが明らかになった。検出したプロテアーゼ活性は弱いものであったが, 最適条件の検討やこれまで見出されていない促進因子を

同定し添加することでより強い活性を示す可能性も考えられる。

#### *bepA* 欠損変異に対する多コピーサプレッサーの分離

BepA の生理機能に対する手がかりを得るために, BepA 欠損変異 ( $\Delta bepA$ ) に対するマルチコピーサプレッサーの分離を行った。 $\Delta bepA$  株はエリスロマイシンに高感受性を示す (Fig. 6A) が, 外膜タンパク質の合成に関わる BAM 複合体の構成因子 BamE の欠損変異 ( $\Delta bamE$ ) と組み合わせた二重欠損変異 ( $\Delta bepA/\Delta bamE$ ) はより強いエリスロマイシンに高感受性を示した (data not shown) ことからこの二重欠損変異をスクリーニングに用いた。大腸菌の遺伝子ライブラリー (ASKA クローン) (Kitagawa *et al.*, 2005) を用いて, 4,123 個のプラスミドをスクリーニングした結果, *lptE* 遺伝子を持つプラスミドのみが, 野生型 *bepA* 遺伝子を持つプラスミドと同等レベルにエリスロマイシン感受性を回復させた (Fig. 6A and data not shown)。また, *lptE* 遺伝子をプラスミドのアラビノースプロモーター制御下にクローニングし, 培地へのアラビノースの添加により発現を誘導すると,  $\Delta bepA$  株のエリスロマイシン感受性はアラビノース依存的に抑制された (Fig. 6B)。すなわち, LptE の過剰生産により BepA 機能欠損は補われ得る。LptE は外膜のリポタンパク質であり,  $\beta$  バレル型外膜タンパク質



**Fig. 5** Protease activity of BepA. (A) Degradation of  $\alpha$ -casein.  $\alpha$ -casein (400  $\mu$ g/mL) was incubated without (-) or with His<sub>10</sub>-tagged wild-type BepA (WT) or its E137Q derivative (E137Q) (200  $\mu$ g/mL) at 37°C for 0 or 24 h. Proteins were separated by SDS/PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250. Proteolytic product of  $\alpha$ -casein is indicated by an open arrowhead. Migration positions of molecular weight markers are shown on the left. (B) Effects of metal chelators on the BepA protease activity. Protease activity of C-terminally His<sub>10</sub>-tagged wild-type BepA was analyzed as in A except that the reaction mixture contained 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (Zn), 250  $\mu$ M 1,10-phenanthroline (PT), or 250  $\mu$ M EDTA. (Partially reproduced from Narita *et al.*, 2013)

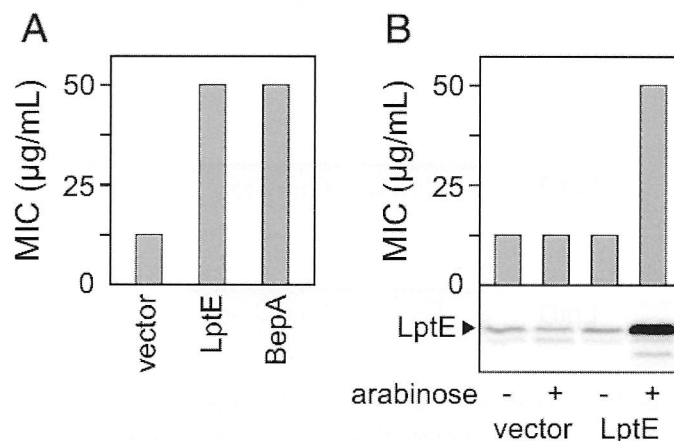


LptD と複合体を形成してリポ多糖の外膜外葉への輸送に働く (Polissi & Sperandio, 2014). また, LptE は LptD の生合成・機能を補助することも知られている (Polissi & Sperandio, 2014). これらのことは, BepA が機能的な LptD の形成に関与する可能性を示唆している.

**BepA は正しい分子内ジスルフィド架橋を持つ LptD の形成を促進する**

LptD は 4 つのシステイン残基を持ち, 外膜に正常に組み込まれた機能的 LptD においては, N 末端側から数えて 1 番目 ( $C_{31}$ ) と 3 番目 ( $C_{724}$ ), 2 番目 ( $C_{173}$ ) と 4 番目 ( $C_{725}$ ) のシステイン残基間でジスルフィド結合が形成 (native 結合) されている (Fig. 7C, LptD<sup>NC</sup>) (Ruiz *et al.*, 2010). 最近, LptD は, 上記とは異なり 1 番目と 2 番目, 3 番目と 4 番目のシステイン残基の間でのジスルフィド架橋 (non-native 結合) を持つ中間体 (Fig. 7C, LptD<sup>C</sup>) を経て正しいジスルフィド結合を持つ成熟体として外膜へのアセンブリーすることが示された (Chng *et al.*, 2012). 以下, 正しいジスルフィド結合を持つ LptD 分子を LptD<sup>NC</sup>, 中間体型のジスルフィド結合を持つ LptD 分子を LptD<sup>C</sup> と呼ぶ (NC 及び C は, それぞれ “non-consecutive”, “consecutive” なシステイン残基間の架橋を示す). BepA が LptD の成熟化に関わる可能性を検討するため, パルス・チェイス実験により LptD<sup>C</sup> から LptD<sup>NC</sup> へ

の変換過程に対する *bepA* 変異の影響を調べた (Fig. 7A). [<sup>35</sup>S]-メチオニンで 1 分間標識し, 非標識メチオニンを加えてチェイスすると, 野生株ではまず LptD<sup>C</sup> が形成され, 大部分は半減期約 10 分で LptD<sup>NC</sup> へと変換した. これに対し,  $\Delta$ *bepA* 株ではこの変換は著しく遅延していた (半減期 80 分以上).  $\Delta$ *bepA* 株で野生型 BepA をプラスミドから発現すると変換速度は回復したのみならず, 野生株より速度が上昇した (Fig. 7B). LptD<sup>C</sup>, LptD<sup>NC</sup> ともに還元剤 2-メルカプトエタノール (ME) を加えて電気泳動を行うと還元型 LptD (LptD<sup>RED</sup>) になることから, これらが異なるジスルフィド結合を持つことが確認される (Fig. 7A). これらの結果は, BepA が LptD<sup>C</sup> から LptD<sup>NC</sup> への変換を促進すること, この変換過程は LptD の成熟化において律速となっていることを示している. LptE の過剰生産によっても,  $\Delta$ *bepA* 株中における LptD 成熟化が野生株並みに回復する (data not shown) ことから, LptE 過剰生産による  $\Delta$ *bepA* 変異の抑制は, LptD 成熟化の回復によるものと示唆される. なお, パルス標識時に僅かに検出されるシグナルペプチドの切断を受けていない LptD 前駆体の移動度も還元剤の添加により変化する (Fig. 7A). ジスルフィド結合形成は, ペリプラズムの酵素 DsbA により触媒される (Ito & Inaba, 2008). LptD 前駆体が膜透過をする途上で, 隣り合うシステイン残基ペア ( $C_{31}$  と  $C_{173}$ ,  $C_{724}$  と  $C_{725}$ ) がペリプラズムへと移行するつど, それらの間でジスルフィ



**Fig. 6** Overexpression of LptE suppresses the drug sensitivity of the  $\Delta$ *bepA* strain. (A) Erythromycin sensitivity of the  $\Delta$ *bepA* strain transformed with an ASKA clone carrying *lptE*. For comparison, the MIC of the  $\Delta$ *bepA* strain transformed with pTH-*bepA*-his<sub>10</sub> encoding wild-type BepA<sub>His10</sub> is shown. (B) LptE was overexpressed from pMAN-*lptE* carrying *lptE* under the control of the *araBAD* promoter. Expression of *LptE* was confirmed by SDS/PAGE of total cellular proteins followed by anti-LptE immunoblotting. (Reproduced from Narita *et al.*, 2013)

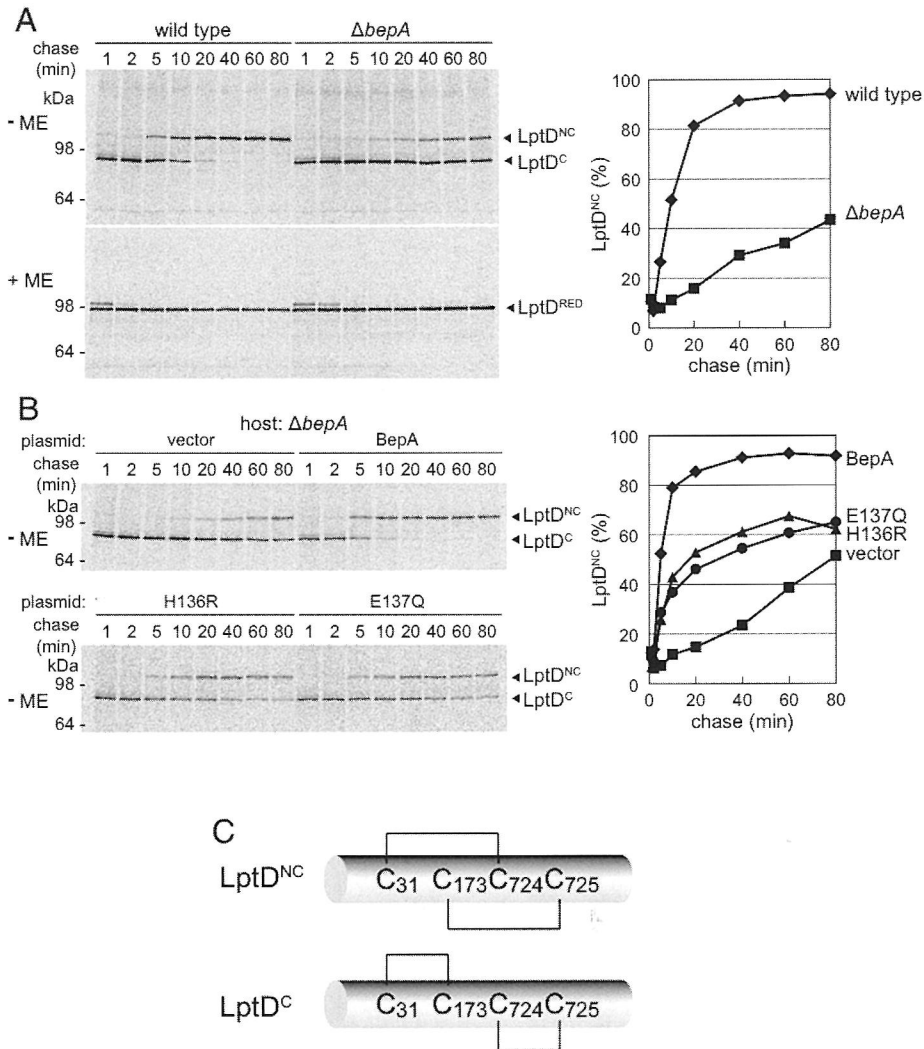
ド架橋が順次形成されることにより LptD<sup>C</sup>が生成するものと考えられる。

$\Delta bepA$  株でプロテアーゼ活性モチーフ変異型 BepA (H136R 及び E137Q) を発現すると、野生型 BepA 発現時よりは効率化が悪いものの、有意に成熟化が促進された (Fig. 7B)。このことは、BepA はそのプロテアーゼ活性とは独立に LptD の成熟化を促進する能力を持つこと、その一方、プロテアーゼ活性モチーフまたは

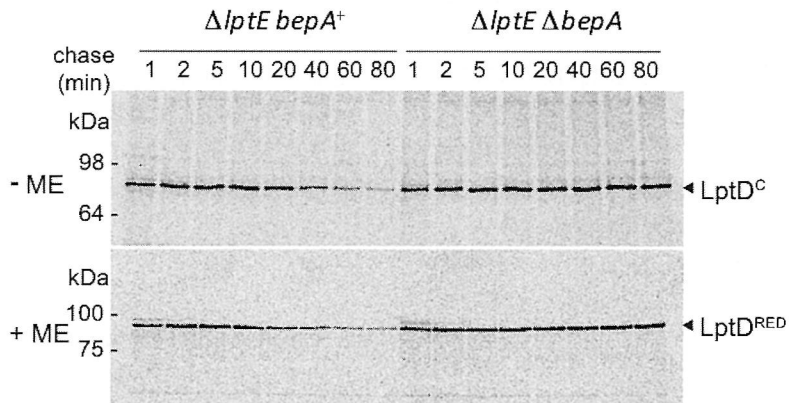
プロテアーゼ活性自体が BepA が完全に機能するために必要であることを示唆している。

**BepA は成熟化に失敗した LptD の分解に関わる**

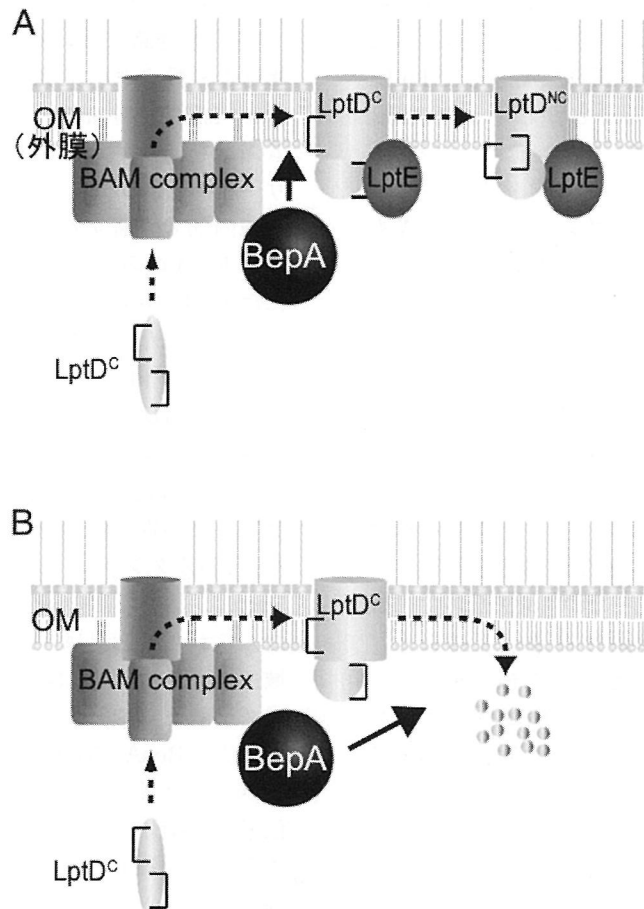
最近報告された結果 (Chng *et al.*, 2012) と一致して、LptE 欠損 (枯渇) 株では LptD<sup>C</sup> から LptD<sup>NC</sup> への変換がほぼ完全に起こらなくなるが、これに加えて LptD<sup>C</sup> の分解が起こることを見出した (Fig. 8)。しか



**Fig. 7** BepA facilitates disulfide isomerization in LptD. (A) Wild-type and  $\Delta bepA$  cells were labeled with [<sup>35</sup>S]-methionine for 1 min and chased for the indicated durations at 30°C. Acid-precipitated proteins were subjected to immunoprecipitation with anti-LptD antiserum and were analyzed by non-reducing (-ME) or reducing (+ME) SDS/PAGE followed by phosphorimaging. Migration positions of molecular weight markers are shown on the left. (B) Oxidative folding of LptD was monitored as in A using  $\Delta bepA$  cells transformed with empty vector or either of the plasmids encoding C-terminally His<sub>10</sub>-tagged wild-type BepA or its H136R or E137Q derivative. LptD<sup>NC</sup> (%) in right was calculated by dividing the band intensity of LptD<sup>NC</sup> by the sum of those of LptD<sup>C</sup> and LptD<sup>NC</sup>. (C) Schematic representation of disulfide bonds in LptD<sup>NC</sup> and LptD<sup>C</sup>. (Modified from Narita *et al.*, 2013)



**Fig. 8** BepA destabilizes LptD in LptE-limiting conditions. LptE-depleted cells (GC187) carrying *bepA* (*bepA*<sup>+</sup>) or its disruptant were pulse-labeled and analyzed as described in the legend to Fig. 7A. (Partially reproduced from Narita *et al.*, 2013)



**Fig. 9** A model for BepA function in the assembly/ degradation of the OM LPS translocon. (A) BepA promotes disulfide rearrangement of LptD<sup>c</sup> that is triggered by association of LptD<sup>c</sup> with LptE. BepA may directly assist LptD-LptE interaction or act indirectly to facilitate formation of the productive LptD-LptE complex. Square brackets represent disulfide bonds. (B) In the absence of LptE, BepA acts to proteolytically eliminate accumulated LptD<sup>c</sup>. (Modified from Narita *et al.*, 2013)

しながら, LptE が欠損した条件においても, *bepA* 遺伝子を欠損させると LptD<sup>c</sup> の分解は抑制された (Fig. 8). LptE 欠損株での  $\Delta$ *bepA* 変異による LptD<sup>c</sup> の安定化は, プラスミドから野生型 BepA を発現させるとみられなくなったが, プロテアーゼモチーフ変異型 BepA の発現はそのような効果を示さなかった (data not shown). これらの結果は, BepA が細胞内において, LptE と複合体を形成できず蓄積した LptD のアセンブリー中間体 LptDC の分解に関わることを強く示唆している.

### BepA の機能モデル

本研究において, 我々は BepA が有意な  $\alpha$  カゼイン分解活性を持つことを生化学的に示した (Fig. 5). BepA は M48 ファミリー亜鉛メタロプロテアーゼと相同性を持つが, 実際にプロテアーゼ活性が HEXXH モチーフと亜鉛依存的に検出されたことは, BepA が亜鉛メタロプロテアーゼであることを示している. さらに, *in vivo* においても, LptD 枯渇株で蓄積した LptD<sup>c</sup> が BepA 依存的な分解を受けることがわかった (Fig. 8). また, 外膜タンパク質のフォールディング/外膜へのアセンブリーに関わるペリプラズムの分子シャペロン SurA の欠損株では, 外膜タンパク質 BamA も BepA に依存した切断を受けることも見出している (data not shown). これらの結果は, 折りたたみや複合体形成の不全により機能的構造をとれなかった LptD 等の外膜タンパク質を分解除去することで, BepA が外膜タンパク質の品質管理に関わることを示している. 一方, BepA 欠損株では LptD<sup>c</sup> から LptD<sup>nc</sup> への変換が遅延し, 逆に BepA の過剰生産により促進される (Fig. 7). これらの知見は, ジスルフィド結合の掛け替えを含む LptD の成熟化に BepA が関与することを示している. 興味深いことに, この LptD 成熟化の促進には BepA のプロテアーゼ活性は必須ではなく, BepA がプロテアーゼ活性とは独立した機能を持つことが示唆される. *bepA/bamB* 二重欠損変異株は SDS への感受性を示すが, BepA 活性部位変異体はある条件下ではこれを回復する (data not shown) こともこの考えを支持する. さらに, BepA が外膜タンパク質のアセンブリーに働く BAM 複合体と相互作用することを示唆する結果も得ている (data not shown). 我々は, BepA が基質となる外膜タンパク質の状態に応じて 2 種類の働きをなし得るのでは無いかと考えている (Fig. 9). BepA は, 通常では分子シャペロンとして外膜タンパク質の成熟化や外膜へのアセンブリーにはたらし, それらが失敗した時には迅速に分解することで異常外膜タンパク質の蓄積を防ぐ機能をもつのでは

ないだろうか. さらに多くの外膜タンパク質の生合成や分解過程における BepA の機能を調べることで, 上記モデルを検証していく必要がある. BepA の機能欠損が種々の抗生物質や化学薬品への大腸菌の感受性を上昇させることから, BepA を標的とした新規薬剤開発も可能かもしれない.

### 要 約

大腸菌は細胞表層構成因子の異常を感知し対応するための表層ストレス応答システムを複数持っている. その中でも, 転写因子  $\sigma^E$  の関わる  $\sigma^E$  応答経路は唯一生育に必須であり, 細胞表層におけるタンパク質の品質管理に重要な役割を果たす. しかしながら,  $\sigma^E$  応答経路の制御機構や,  $\sigma^E$  により発現制御を受ける遺伝子の働きは十分解明されていない. 本研究は, プロテアーゼ機能に注目してこれらの問題に取り組んだ.

$\sigma^E$  応答経路においては, 膜プロテアーゼ DegS が, 異常な外膜タンパク質の蓄積よって活性化されて, まず 1 回膜貫通型 anti- $\sigma^E$  タンパク質 RseA のペリプラズム領域を切断する. これが引き金となり, S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP が RseA をその膜貫通領域内部で切断する. RseP は, DegS により切断を受けた RseA のみを切断することができるが, この制御には RseP のペリプラズム領域に存在する 2 つの PDZ ドメインが関わることを示唆されている. 我々は, 連結した 2 つの PDZ ドメイン (PDZ タンデム) の構造を決定し, PDZ ドメインが推定リガンド結合領域を向かい合わせて 1 つのポケット構造を形成しており, このポケット構造が RseP 膜ドメイン内部に存在するプロテアーゼ活性部位の直上に位置することを明らかにした. PDZ タンデムを完全に欠失させると, RseP は DegS による最初の切断に依存せずに RseA を切断した. これらの知見は, PDZ タンデムがペリプラズム領域で切断を受けた RseP のみ活性部への近接を許すサイズ排除フィルターとして働くことを示唆している.

一方, BepA (YfgC) は,  $\sigma^E$  により発現制御を受けるペリプラズムプロテアーゼホモログである. *bepA* 遺伝子の欠損により大腸菌が種々の薬剤に感受性となることから, BepA は外膜の維持に関わるものと推定されている. しかしながら, BepA の具体的な機能については明らかになっていない. 我々は, BepA が, 外膜リポ多糖の輸送に関わる外膜タンパク質 LptD の分子内ジスルフィド結合の掛け替えを伴う成熟化を促進することを見出した. さらに BepA はプロテアーゼ活性を持ち, 機能的構造をとれない LptD を分解することもわかった. *bepA* 変異による LptD の成熟化の遅延

は、プロテアーゼ活性を持たない BepA 変異体により部分的に回復した。このことは、BepA がプロテアーゼ活性とは独立な機能を持つことを示唆する。これらの知見から、BepA が外膜タンパク質のアセンブリーを促進し、またそれがうまくいかないときに分解するという二面的役割をはたすことで外膜の機能の維持に働くことが推測される。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Narita, S.-i., and Akiyama, Y.: Characterization of YfgC, a protease homolog involved in assembly of the *Escherichia coli* outer membrane proteins. Gordon Research Conference on Bacterial Cell Surfaces, West Dover, VT, USA, June 24–29, 2012
- 2) 檜作洋平, 禾 晃和, 田畑早苗, 川上-田村恵子, 小田隆, 佐藤 衛, 高木淳一, 秋山芳展: 大腸菌表層ストレス応答に関与する膜内切断プロテアーゼ RseP の PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム. 第6回細菌学若手コロッセウム, 八王子, 2012年8月8日-10日
- 3) 檜作洋平, 秋山芳展: Analysis of a regulatory mechanism of the proteolytic function of RseP by the PDZ domains in extracytoplasmic stress response. 日本生物物理学会第50回年会, 名古屋, 2012年9月22日-24日
- 4) 成田新一郎, 秋山芳展: 大腸菌外膜タンパク質の品質管理にかかわる新規プロテアーゼホモログ BepA の解析. 2012年度国立遺伝学研究所研究会「代謝, 増殖, 分裂研究会」, 三島, 2012年12月8日-9日
- 5) 檜作洋平, 禾 晃和, 田畑早苗, 川上-田村恵子, 小田隆, 佐藤 衛, 高木淳一, 秋山芳展: 大腸菌 RIP プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる新たな機能制御メカニズム. 第85回日本生化学会大会, 福岡, 2012年12月14日-16日
- 6) 成田新一郎, 鈴木健裕, 堂前 直, 秋山芳展: 大腸菌  $\beta$  バレル型膜タンパク質の生合成に関わる BepA (YfgC) の機能解析. 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台, 2013年3月27日
- 7) 成田新一郎, 秋山芳展: 大腸菌  $\beta$  バレル型タンパク質の品質管理に関わるプロテアーゼホモログ BepA (YfgC) の機能解析. 2012年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの構築とその維持機構の研究」, 三島, 2013年3月28日-29日
- 8) 檜作洋平, 小田 隆, 田畑早苗, 川上-田村恵子, 佐藤 衛, 高木淳一, 禾 晃和, 秋山芳展: 膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインが介する切断基質選別機構. 第10回 21世紀大腸菌研究会, 伊豆, 2013年6月20日-21日
- 9) 舛井千草, 成田新一郎, 秋山芳展: 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による大腸菌ペリプラズムタンパク質 BepA (YfgC) の近接因子探索. 第10回 21世紀大腸菌研究会, 伊豆, 2013年6月20日-21日
- 10) Nogi, T., Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-

Kawakami, K., Sato, M., Takagi, J., and Akiyama, Y.: Structural analysis of the PDZ tandem fragment of the bacterial intramembrane-cleaving protease RseP. International Conference on Structural Genomics 2013, Sapporo, Japan, July 29–August 21, 2013

- 11) 檜作洋平, 禾 晃和, 小田 隆, 田畑早苗, 川上-田村恵子, 佐藤 衛, 高木淳一, 秋山芳展: 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質認識における PDZ ドメインの役割. 第86回日本生化学会大会, シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応: 膜内部でのタンパク質切断」, 横浜, 2013年9月11日-13日
- 12) 成田新一郎, 舛井千草, 鈴木健裕, 堂前 直, 秋山芳展: 大腸菌プロテアーゼ BepA は外膜タンパク質の組立と分解を促進する. 日本農芸化学会東北支部第148回大会, 盛岡, 2013年10月26日
- 13) 秋山芳展: 膜内部でのタンパク質切断による表層ストレス応答制御機構. 京都大学微生物科学寄付研究部門主催第二回シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」, 京都, 2013年11月8日
- 14) 檜作洋平, 小田 隆, 田畑早苗, 川上-田村恵子, 佐藤 衛, 高木淳一, 禾 晃 和, 秋山芳展: 立体構造解析に基づく大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP のタンデム PDZ ドメインによる切断基質選別機構モデル. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3日
- 15) 秋山芳展: 膜内部でのタンパク質切断による表層ストレス応答制御機構. 分子遺伝学シンポジウム「新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜」, 京都, 2014年3月1日
- 16) 檜作洋平, 秋山芳展: 膜内切断プロテアーゼ RseP による大腸菌  $\sigma^E$  経路表層ストレス応答の制御機構. 2013年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」, 三島, 2014年3月25日-26日

### 原著論文・総説

- 1) Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y. & Nogi, T. (2014). A structure-based model of substrate discrimination by a non-canonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. *Structure* **22**: 326–336.
- 2) Narita, S.-i., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N. & Akiyama, Y. (2013). Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of  $\beta$ -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: E3612–E3621.
- 3) Kroos, L. & Akiyama, Y. (2013) Biochemical and structural insights into intramembrane metalloprotease mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**: 2873–2885.
- 4) Hizukuri, Y., Ito, K. & Akiyama, Y. (2013). RseP Peptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes* 3rd ed. (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Elsevier Ltd. pp1546–1550.
- 5) Hizukuri, Y. & Akiyama, Y. (2012) PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced  $\sigma^E$  activation *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **86**: 1232–1245.

## 保存機関に寄託した菌株

無し

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、2年間にわたり研究助成を頂きました公益財団法人発酵研究所に心から感謝いたします。また、貴重なアドバイスを頂いた京都大学ウイルス研究所の森博幸博士に御礼を申し上げます。

## 文 献

- Ades, S.E. (2008). Regulation by destruction: design of the  $\sigma^E$  envelope stress response. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 535–540.
- Akiyama, Y., Kanehara, K. & Ito, K. (2004). RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *EMBO J.* **23**: 4434–4442.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**: 2006.0008.
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. & Boulloc, P. (2009). Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5**: e1000651.
- Chng, S.S., Xue, M., Garner, R.A., Kadokura, H., Boyd, D., Beckwith, J. & Kahne, D. (2012). Disulfide rearrangement triggered by translocon assembly controls lipopolysaccharide export. *Science* **337**: 1665–1668.
- Feng, L., Yan, H., Wu, Z., Yan, N., Wang, Z., Jeffrey, P.D. & Shi, Y. (2007). Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. *Science* **318**: 1608–1612.
- Grigorova, I.L., Chaba, R., Zhong, H.J., Alba, B.M., Rhodius, V., Herman, C. & Gross, C.A. (2004). Fine-tuning of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  envelope stress response relies on multiple mechanisms to inhibit signal-independent proteolysis of the transmembrane anti-sigma factor, RseA. *Genes Dev.* **18**: 2686–2697.
- Hashimoto-Gotoh, T., Yamaguchi, M., Yasojima, K., Tsujimura, A., Wakabayashi, Y. & Watanabe, Y. (2000). A set of temperature sensitive-replication/-segregation and temperature resistant plasmid vectors with different copy numbers and in an isogenic background (chloramphenicol, kanamycin, *lacZ*, *repA*, *par*, *polA*). *Gene* **241**: 185–191.
- Hizukuri, Y. & Akiyama, Y. (2012). PDZ domains of RseP are not essential for sequential cleavage of RseA or stress-induced  $\sigma^E$  activation *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **86**: 1232–1245.
- Hizukuri, Y., Oda, T., Tabata, S., Tamura-Kawakami, K., Oi, R., Sato, M., Takagi, J., Akiyama, Y. & Nogi, T. (2014). A structure-based model of substrate discrimination by a noncanonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. *Structure* **22**: 326–336.
- Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K. & Akiyama, Y. (2008). A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**: 35042–35052.
- Ito, K. & Inaba, K. (2008). The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**: 450–458.
- Jeleń, F., Oleksy, A., Smietana, K. & Otlewski, J. (2003). PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochimica Polonica* **50**: 985–1017.
- Kanehara, K., Akiyama, Y. & Ito, K. (2001). Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene* **281**: 71–79.
- Kanehara, K., Ito, K. & Akiyama, Y. (2002). YaeL (EcfE) activates the  $\sigma^E$  pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- $\sigma^E$ , RseA. *Genes Dev.* **16**: 2147–2155.
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K. (1996). A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* **15**: 6122–6131.
- Kinch, L.N., Ginalski, K. & Grishin, N.V. (2006). Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci.* **15**: 84–93.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. & Mori, H. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**: 291–299.
- Koide, K., Maegawa, S., Ito, K. & Akiyama, Y. (2007). Environment of the active site region of RseP, an *Escherichia coli* regulated intramembrane proteolysis protease, assessed by site-directed cysteine alkylation. *J. Biol. Chem.* **282**: 4553–4560.
- Kroos, L. & Akiyama, Y. (2013). Biochemical and structural insights into intramembrane metalloprotease mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**: 2873–2885.
- Laubacher, M.E. & Ades, S.E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**: 2065–2074.
- Li, X., Wang, B., Feng, L., Kang, H., Qi, Y., Wang, J. & Shi, Y. (2009). Cleavage of RseA by RseP requires a carboxyl-terminal hydrophobic amino acid following DegS cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 14837–14842.
- Lima, S., Guo, M.S., Chaba, R., Gross, C.A. & Sauer, R.T. (2013). Dual molecular signals mediate the bacterial response to outer-membrane stress. *Science* **340**: 837–841.
- Liu, A., Tran, L., Becket, E., Lee, K., Chinn, L., Park, E., Tran, K. & Miller, J.H. (2010). Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1393–1403.
- Muller, C., Bang, I.S., Velayudhan, J., Karlinsey, J., Papenfort, K., Vogel, J. & Fang, F.C. (2009). Acid stress activation of the  $\sigma^E$  stress response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **71**: 1228–1238.

- Narita, S., Masui, C., Suzuki, T., Dohmae, N. & Akiyama, Y. (2013). Protease homolog BepA (YfgC) promotes assembly and degradation of  $\beta$ -barrel membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: E3612–3621.
- Nichols, R.J., Sen, S., Choo, Y.J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K.M., Lee, K.J., Wong, A., Shales, M., Lovett, S., Winkler, M.E., Krogan, N.J., Typas, A. & Gross, C.A. (2011). Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* **144**: 143–156.
- Oh, E., Becker, A.H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., Gloge, F., Nichols, R.J., Typas, A., Gross, C.A., Kramer, G., Weissman, J.S. & Bukau, B. (2011). Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor *in vivo*. *Cell* **147**: 1295–1308.
- Polissi, A. & Sperandio, P. (2014). The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Mar. Drugs* **12**: 1023–1042.
- Ruiz, N., Chng, S.S., Hiniker, A., Kahne, D. & Silhavy, T.J. (2010). Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 12245–12250.
- Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K. & Akiyama, Y. (2011). Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 13740–13745.
- Schneider, J.S. & Glickman, M.S. (2013). Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**: 2808–2814.
- Shen, J. & Prywes, R. (2004). Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J. Biol. Chem.* **279**: 43046–43051.
- Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**: 339–347.
- Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A. & Sauer, R.T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**: 61–71.
- Wolfe, M.S. (2009). Intramembrane proteolysis. *Chem. Rev.* **109**: 1599–1612.
- Yakushi, T., Tajima, T., Matsuyama, S. & Tokuda, H. (1997). Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2857–2862.

## 平成20年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：平成20年4月～平成26年3月



# 新規微生物機能の探索を基盤とした環境保全技術の開発

島 純

京都大学微生物科学寄附研究部門  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

## Construction of environmental conservation systems based on exploration of novel microbial functions.

Jun Shima

Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University  
Kitashirakawa Oiwake-Cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

To construct sustainable society, it is important to improve food chain. Effective systems for food production and recycling of food wastes including food losses are required for the improvement. To contribute the construction of sustainable society, Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University carried out the microbial studies described as follows.

1) Analysis of tolerant mechanisms to environmental stresses in yeast and application to molecular breeding of industrial yeast.

We found that modification in metabolisms of protective molecules and function of vacuolar proton pump increased tolerance levels to environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Stress tolerant strains derived from brewer's yeast and baker's yeast were successively constructed.

2) Analysis of organic acids tolerance in yeast and its application to bioethanol production.

Organic acids tolerant yeasts are useful for the construction of bioethanol production process which eliminates bacterial contamination. We found that overexpression of the *HAA1* gene in bioethanol yeasts, which encodes a transcriptional activator, could be a useful molecular breeding method for acetate-tolerant yeast strains.

3) Exploration for useful yeast strains from collection of non-conventional yeasts and application to biolipid production.

It has been reported the great taxonomic diversity of the yeasts in Japan. We performed a comprehensive screening of the yeast strains collected by Takashima *et al.* in order to identify a strain that produces lipid with high productivity. *Cryptococcus terricola* has suitable characteristics for lipid production from soluble starch through CBP (consolidated bio-processing) with high lipid content.

4) Analysis of nitrifying bacteria and construction of novel solution culture system using food wastes.

To construct solution culture system using food wastes, it is required for enrichment of nitrifying bacteria. We successively enriched nitrifying bacteria from soil by monitoring of changes in bacterial flora and showed that the enriched nitrifying bacteria are suitable for solution culture system using food wastes.

### はじめに

多方面の研究から地球環境に大きな変化が生じはじめていることが指摘されており、その影響が負の効果

---

E-mail: shima@agr.ryukoku.ac.jp

教員：小川 順（現 京都大学大学院農学研究科）、安藤晃規（現 京都大学学際融合教育推進センター）、田中晃一

として人類に降り注いでいる。地球環境変化の重要な要因が二酸化炭素等の温暖化効果ガスの増加であることが示唆されており、ほぼ共通的な認識となっている。そのため、低炭素・循環型社会の構築に向けて、太陽エネルギー利用技術や蓄電デバイスの開発等を含めた様々な取り組みが進められている。微生物工学的な観点からは、バイオエタノールやバイオディーゼルをはじめとしたバイオ燃料生産の試みが精力的に進め

られている。第一世代バイオ燃料生産においては、トウモロコシ等の食料や飼料と競合する資源が原料として用いられてきたが、原料の高騰や食料不足に繋がる。そこで、第二世代バイオ燃料生産では、食料として利用される可能性の低い原料を用いることが試みられている。具体的には、イナワラ等の農作物の未利用部分やネピアグラス等の非可食植物を原料としようとする考え方である。しかし、第二世代バイオ燃料では、生産コストが化石燃料と比較して高くなることも要因となり、広範な普及には繋がっていない。また、非可食植物の大規模な栽培は、作物栽培との耕作地の奪い合いといった観点では競合関係ともなり得る。

以上、述べたように、バイオテクノロジーを基盤とする環境保全技術は、フードチェーン（一次栽培から最終消費までの一連のプロセス）と密接に関連している。このような状況認識のもと、京都大学微生物科学寄附研究部門では、フードチェーンの健全化の観点から、新規微生物機能の探索を基盤とした環境保全技術の開発に取り組んだ。本稿では、本寄附講座が行った研究の全体像をまとめたい。

## フードチェーンの健全化を介した環境保全技術の開発

一般に、フードチェーンは、一次栽培から最終消費までの一連のプロセスを指す場合が多い。本稿では、消費後の廃棄及び再利用も含め、食の循環全体をフードチェーンとして捉えたい。思想家レスターブラウンは、フードセキュリティとは、健康で活動的な生活をおくるために、全ての人々が安全かつ十分な食料を手に入れる状態と述べている。さらに、自然環境の変化、世界規模でみた人口の増加、食の嗜好の変化等の複雑な要因により、フードセキュリティが崩壊に近づいているとの指摘もある。発展途上国では、食料の不足に伴う栄養不足の慢性化や飢餓等の深刻な問題に直面している。一方で、我が国を含めた先進国では、膨大な食品廃棄物や食品ロス（食べられる状態にありながら廃棄されている食品）の問題が顕在化している。我が国では、年間約1,700万トンにもおよぶ廃棄物が生じ、そのうち、約800万トンが食品ロスであると考えられている。また、その食品廃棄物のほとんどは焼却や埋め立て処分されているため、フードチェーン全体のコスト増に繋がる。さらに、温室効果ガスの発生を加速させるため、自然環境への悪影響も甚大である。

このような背景から、本研究では、微生物機能探索によるフードチェーンの健全化を介した環境保全技術

の開発を基本的な理念として研究を行った。すなわち、食品製造プロセスの効率化による食品ロスの低減及び食品廃棄物等からのバイオエネルギー製造の両面からの研究を進めた。

食品製造プロセスの効率化においては、発酵食品製造及び醸造プロセスの高効率化に向けて、産業酵母の環境ストレス耐性の向上に関する研究を中心に行った。発酵や醸造において中心的な役割を果たす酵母には、発酵・醸造プロセスにおいて過酷な環境ストレスが負荷される。具体例を挙げると、製パン用酵母には冷凍、高濃度ショ糖、乾燥などの環境ストレスが負荷される。また、ビール等の醸造の効率化に繋がる高密度醸造では、エタノールストレスや高浸透圧ストレスがビール酵母に負荷される。したがって、環境ストレスに高度な耐性を有する酵母株の育種は、発酵・醸造プロセスの効率化に直結する。このような背景から酵母の環境ストレス耐性機構に関する解析を行い、産業酵母の分子育種への応用をはかった。「酵母の環境ストレス耐性機構の解析と食品製造への応用」において、その概要を後述する。

また、食品廃棄物や食品ロスを再生エネルギー、特に液体燃料資源として再利用することは極めて重要な技術であると考えられる。しかし、食品廃棄物等からエネルギーを効率的に抽出する際の阻害要因として、廃棄物の完全な分別が困難なことや腐敗雑菌による汚染の進行が挙げられる。これに対して、有機酸ストレス耐性酵母と有機酸の活用による雑菌汚染回避戦略の構築に関する研究を行った。また、食品廃棄物からのバイオ燃料の製造では、エネルギー収支のアンバランスやコスト高も懸念される。これに対して、担子菌酵母の機能探索により、バイオ一貫プロセス（CBP）による油脂製造に取り組んだ。これらの研究の概要を「有機酸ストレス耐性機構の解明と新規バイオ燃料生産プロセスの構築」及び「ノンコンベンショナル酵母の機能探索と油脂等の有用物質生産への応用」において、後述する。

また、窒素の物質循環の視点に立った場合には、食品廃棄物に含まれる窒素を一次生産に環流していくことが重要であると考えられる。そのためには、食品廃棄物に含まれるアミノ態窒素を硝酸態窒素に効率よく酸化することが必要となり、硝化細菌群の機能開拓が必要となる。水耕栽培では、微生物群衆の細胞レベルでの解析が可能であるとともに、実用的な側面から新たな農業技術として価値が高い。そこで、窒素循環に関する硝化細菌群の機能開拓を水耕栽培の実用プロセスに即して行った。本研究の概要は、「有機栄養液栽培に寄与する微生物群の解析とその応用」において後

述する。

### 酵母の環境ストレス耐性機構の解析と食品製造への応用

発酵食品や酒類の製造プロセスは、発酵に寄与する酵母にとって過酷なストレス環境と言える。したがって、環境ストレス耐性を有する酵母の開発は製造プロセスの高度化に直結する。そこで、環境ストレス耐性機構の解明及びストレス耐性酵母の開発を行った。酵母は環境ストレスに適応するためにトレハロースや遊離アミノ酸等の細胞保護物質を蓄積することが知られている。まず、芳香族アミノ酸に着目し合成欠損株等の解析を行い、トリプトファンは冷凍耐性に、チロシンはエタノールや有機酸への耐性に寄与することを見出した。さらに、トレハロースや遊離アミノ酸の代謝制御を産業用パン酵母で行ったところ、製パンに関連する環境ストレス（Baking-associated stresses；冷凍、高ショ糖及び乾燥ストレス）に対する耐性が著しく向上したパン酵母が構築できた。また、現在までに、液胞型プロトンポンプ（V-ATPase）の環境ストレス耐性における重要性を示してきた。そこで、V-ATPaseのアセンブリや機能制御に関わる因子をコードする遺伝子を網羅的に過剰発現させ、V-ATPaseの機能修飾の可能性を検討した。その結果、V-ATPaseのV<sub>1</sub>サブユニットをリン酸化する可能性が指摘されているタンパク質キナーゼDbf2をコードする遺伝子を過剰発現させた場合に、ビール酵母（*Saccharomyces pastorianus*）において、高度なエタノールストレス耐性の獲得が観察された。DBF2遺伝子過剰発現株ではエタノールストレス条件下における細胞内活性酸素種レベルの低下が観察された。液胞を含む画分のプロテオーム解析を行ったところ、DBF2遺伝子過剰発現株においては、V<sub>0</sub>セクターを構成するタンパク質が高頻度に検出された。DBF2遺伝子過剰発現のV-ATPaseに与える影響については、さらなる詳細な解析が必要であると考えている。また、DBF2遺伝子を過剰発現したビール酵母株では、高密度醸造における発酵特性が有意に向上した。したがって、V-ATPaseのアセンブリや機能制御に関わる因子をコードする遺伝子は、産業酵母の分子育種の標的となり得る可能性が考えられた。

### 有機酸ストレス耐性機構の解明と新規バイオ燃料生産プロセスの構築

食品廃棄物等からのバイオ燃料生産過程では著しい

細菌汚染が想定される。そこで、有機酸耐性酵母を開発構築し、有機酸を使用した細菌汚染抑制技術の構築を検討した。まず、有機酸ストレス耐性を有する*S. cerevisiae*株の探索を行った。その結果、酢酸耐性を有する*S. cerevisiae* ATCC 38555株を見出した。DNAマイクロアレイ解析により、ATCC 38555株では酢酸応答に寄与する転写活性化因子をコードするHAA1遺伝子の高度な発現上昇が観察された。そこで、代表的なバイオエタノール生産用酵母であるEthanol Red株において、構成的発現プロモーターを用いてHAA1を過剰発現させたところ、Haa1で発現誘導される下流遺伝子の発現上昇を伴った著しい酢酸ストレス耐性の向上が観察された。さらに、サトウキビ糖蜜をモデルバイオマスとして、エタノール発酵試験を行った。酢酸添加条件においては、野生型株の発酵能は著しく阻害されたが、HAA1過剰発現株では高い発酵力が維持された。これらの結果から、酢酸添加により細菌汚染を有意に抑制できることが明らかになった。

### ノンコンベンショナル酵母の機能探索と油脂等の有用物質生産への応用

担子菌酵母を含むノンコンベンショナル酵母では、炭素源の資化性、環境ストレス耐性、油脂等の有用物質生産能が極めて多様であり、食品廃棄物や食品ロスの資源化に有用である可能性が想定された。そこで、理化学研究所の高島昌子博士らが利尻島及び西表島から収集した担子菌酵母を中心とする酵母ライブラリーの網羅的な特性評価を行った。特に、環境保全に寄与し得るバイオディーゼルへの変換が可能なバイオリピッド（油脂）に着目した。バイオリピッドの実生産に向けて高い生産性を有する酵母が必要とされていることから、培養時間あたりの生産性に着目した探索を行った。その結果、代表的な油糧酵母である*Lipomyces starkeyi*等と比較して、*Cryptococcus musci*やその近縁種がより高度なりピッド生産性を有していることが明らかになった。また、担子菌酵母は多様な糖資化性を有していることから、食品廃棄物等の主要成分であるデンプンから直接、バイオリピッドが一貫生産できる可能性を考え検証を行った。その結果、*Cryptococcus terricola*に属する酵母はCBPによりデンプンからリピッドを効率的に生産可能であることが示された。

### 有機栄養液栽培に寄与する微生物群の解析とその応用

有機栄養液栽培は、食品廃棄物等の有機物を直接裁

培液に添加し、有用微生物機能により硝化を促進しながら作物の栽培を行う化学肥料非依存的な新規栽培手法である。しかし、硝化工程に1ヶ月にも及ぶ期間を要することが、本栽培法の導入の障害になっていた。そこで、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動解析による硝化菌群の視覚的な菌相遷移の観察系を駆使し、効率的な硝化反応を行う微生物群の集積を可能とした。さらに、微生物群のスケールアップ調製及び乾燥化法の構築に成功し、微生物製剤を開発した。有機栄養液栽培により葉菜類や果菜類の栽培試験を行ったところ、表現型、可取収量、糖度、味等が良好な作物が栽培できることが明らかになった。さらに、微生物製剤の病原性細菌の試験を行い、病原性細菌の濃縮、混入がないことを確認し、農林水産省の実用化技術開発事業にて新規技術として認定された。

### おわりに

本稿では、フードチェーンの健全化を介した環境保存技術の開発に向けて取り組んだ研究の概要について述べた。具体的には、食品製造技術の高度化による食

品ロスや食品廃棄物の縮減及び不可避免的に生じる食品廃棄物をバイオマス資源として活用したバイオ燃料等の有用物質生産技術に焦点を絞って研究推進をはかった。

その結果、環境ストレス耐性が増強された酵母株が酒類やパン類の製造の効率化に有効であることが示された。また、食品廃棄物からエタノールを生産するプロセスにおいて問題となる雑菌汚染に対して、有機酸と有機酸耐性酵母の使用による新たなプロセスを提唱した。さらに、ノンコンベンショナル酵母の機能探索を行い、高温発酵が可能なキシロース発酵性酵母、油脂高生産性酵母及びでんぷん資化性油脂蓄積性酵母を見出すことに成功した。また、新たな有機栄養液栽培系の確立に成功した。各研究項目の検討結果については、他稿に詳述した。

今後、得られた知見を発展させ、環境保全に資する技術として実用化に向けた取り組みを進めていきたい。また、各々の技術を洗練した技術に高度化するとともに、統合した技術へと発展させていきたいと考えている。

## 酵母の環境ストレス耐性機構の解析と食品製造への応用

島 純, 田中晃一, 安藤晃規<sup>1)</sup>, 小川 順<sup>2)</sup>

京都大学微生物科学寄附研究部門  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Environmental stress tolerance in yeast and its application to fermentation processes.

Jun Shima, Koichi Tanaka, Akinori Ando<sup>1)</sup>, Jun Ogawa<sup>2)</sup>

Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University  
Kitashirakawa Oiwake-Cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

A yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most important microorganisms for human being, because this yeast is necessary for production of almost all fermentation foods including bread, and alcohol beverages. During industrial processes using *S. cerevisiae*, cells are exposed to numerous environmental stresses, such as oxidation, ethanol, freezing/thawing, hyperosmolarity, and drying. To improve the industrial processes of fermentation, yeast cells should have higher level of environmental stress tolerance.

We have proposed that function of vacuolar ATPase is one of the most important in environmental stress tolerance. We show that overexpression of Dbf2 protein kinase, which putatively phosphorylates V-ATPase subunit, enhances ethanol stress tolerance in brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus*. Reactive oxygen species (ROS) level of *S. pastorianus* overexpressing *DBF2* after ethanol challenge was significantly lower than that of parental strain. We also show strategies for molecular breeding of baker's yeast by self-cloning method.

Key words: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, environmental stress, fermentation foods, alcohol beverage.

### 緒 言

酵母が介在する食品・飲料は、パン類、酒類、味噌・醤油をはじめとして極めて多岐にわたる。そこで、本研究では、酵母を利用した食品・醸造産業の効率化に向けて研究を行った。

一般に、産業プロセスの発酵生産はきわめて過酷なストレス環境下であり、高温、冷凍乾燥、高浸透圧、高濃度アルコールなど多種多様なストレスが負荷される (Attfield, 1997; Shima & Takagi, 2009)。これらの環

境ストレスの負荷に伴い、活性酸素種 (ROS) が細胞に障害を与える (Attfield, 1997)。他の生物と同様に、酵母は環境ストレスに应答して、ある程度適応する能力を備えている。しかし、適応能力を超えた過酷なストレス環境下では、その有用機能は著しく制限される。また、多くの産業プロセスでは単一の環境ストレスばかりではなく、複合的および連続的に環境ストレスが負荷される。そのため、産業微生物である酵母を食品製造に応用する場合に鍵となるのが、製造プロセスで負荷される環境ストレスに対する耐性である。環境ストレスに耐性を有する酵母の開発及び利用は、食品製造技術の高度化や低コスト化に直結する。製パン、清酒醸造及びワイン醸造に用いられる酵母の実用菌株は、出芽酵母の1種である *Saccharomyces cerevisiae* に分類される。ビール醸造には、*S. cerevisiae* と *Saccharomyces bayanus* の雑種である *Saccharomyces pastorianus* が下面発酵酵母として使用されている。

産業的には、近年普及が進んでいる冷凍生地製パン

E-mail: shima@agr.ryukoku.ac.jp, ktanaka@kais.kyoto-u.ac.jp, aando@kais.kyoto-u.ac.jp, ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

<sup>1)</sup> 現 京都大学学際融合教育推進センター

<sup>2)</sup> 現 京都大学大学院農学研究科

共同研究者：岡田奈津実，長谷川園子，灰谷 豊 (京都大学微生物科学寄附研究部門)，高木博史，渡辺大介 (奈良先端科学技術大学院大学)，下飯 仁 (酒類総合研究所)，中村敏英，安藤 聡 (農研機構食品総合研究所)，尾形智夫 (前橋工科大学)

法との関連から、冷凍ストレス耐性は製パン用酵母にとって極めて重要な形質と考えられる (Shima & Takagi, 2009). この製パン法からは焼き立てパンの提供や労働力の軽減など多くのメリットが生まれる. しかし、冷凍プロセスで冷凍ストレスが酵母細胞に負荷され、解凍後の製パンプロセスに障害が生じる場合が多い.

また、醸造分野では、発酵プロセスの効率化の観点から、高濃度で酒類の仕込みが行われているため、もろみに含まれる糖質原料や発酵産物であるエタノールなどにより、極めて高い浸透圧ストレスが負荷される (Hasegawa *et al.*, 2012). したがって、産業用酒類酵母には、エタノール耐性及び高浸透圧耐性を有する株が必要とされる.

以上の背景から、酵母機能の利用による食品製造の高度化には、環境ストレス耐性を向上させることが重要である. このことにより、食品製造プロセスの効率化及び食品保存期間の延長が期待できる. これらの背景から、環境ストレス耐性を有する酵母の構築及び発酵産業へ資することを目的に研究を行い、現在までに、主に表現型解析 (フェノミクス) や分子・細胞生物学的な手法により指摘してきた (Ando *et al.*, 2007; Ando *et al.*, 2006; Shima *et al.*, 2008). 環境ストレス耐性に関する液胞プロトンポンプ (V-ATPase), トレハロース等の細胞保護物質, 環境ストレス応答に寄与する転写因子について、分子レベルでの改変により環境ストレス耐性が向上した産業酵母の構築を行った. さらに、産業プロセスに即した手法で特性評価を行った.

## 材料および方法

### 菌株及び培地

実験室酵母株として、*S. cerevisiae* S288C 株および BY4741 株を用いた. また、酸化ストレス耐性に関する遺伝子の網羅的な探索においては、EUROSCARF より入手した *S. cerevisiae* BY4743 株に由来する各遺伝子ヘテロ破壊株コレクションを用いた.

ビール酵母としては、*Saccharomyces pastorianus* Weihenstephan 34/70 から、Ogata らが単離したウラシル要求性半数体株 W34:70-1B 株を用いた (Iijima & Ogata, 2010). 実用パン酵母系統株としては、農研機構食品総合研究所より提供された *S. cerevisiae* 3346 株 (*MATa*) 及び3347株 (*MATa*) を用いた.

酵母の培養には、特記しない場合には、YPD 培地 (2% グルコース, 1% 酵母エキス, 及び2% ペプトン) を用いた. 固体培養する際には、YPD 培地に2%

の寒天を添加した. ビール酵母の高密度醸造条件における発酵試験には、YPM 培地 (20% マルトース, 1% 酵母エキス, 2% ペプトン) を用いた. サトウキビ糖蜜培地 (16% 糖: グルコース, フルクトース及びビシヨ糖を加算して算出, 0.046%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及び0.225% 尿素) は、製パン発酵試験に用いる酵母株の培養に用いた.

### 酸化ストレス耐性に関する酵母必須遺伝子群の網羅的探索

二倍体出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4743 株に由来する各遺伝子ヘテロ破壊株コレクションを用いてストレス応答に関する遺伝子の網羅的表現型解析を行った. 3mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在条件下で、野生株と比較して著しく増殖能が低下した破壊株を酸化ストレス感受性株とした. 同定した酸化ストレス耐性に関すると考えられた必須遺伝子を対象として *Saccharomyces* Genome database (<http://www.yeastgenome.org/>) もしくは MIPS *Saccharomyces cerevisiae* genome database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/index.jsp>) に基づき機能や局在性による分類を行った.

### 遺伝子過剰発現方法

遺伝子の過剰発現には2種の方法を用いた. 各遺伝子のプロモーター部分を含む配列を多コピーベクターである pRS426 に連結して導入する手法と染色体上の標的遺伝子プロモーターを強力な構成発現プロモーターである *TDH3* プロモーターに置換する方法を用いた (Hasegawa *et al.*, 2012).

### パン酵母における遺伝子破壊

パン酵母系統の一倍体株からウラシル要求性株を取得した. 遺伝子破壊用の断片を常法により作成し、相同組み換えにより遺伝子破壊を行った (Sasano *et al.*, 2012b).

### スポット法による環境ストレス耐性の定性的評価

YPD 培地を用いて、酵母株を対数増殖期まで生育させた. 10段階ごとの希釈系列を調製し、YPD 寒天培地または酢酸等を含む YPD 寒天培地に4  $\mu\text{l}$  スポットした. スポット後、寒天培地を30°C で24時間または48時間培養した (Hasegawa *et al.*, 2012).

### 定量 PCR による発現量の評価

ストレス環境下で酵母株を対数増殖期まで培養し、集菌した細胞からホットフェノール法によりトータル

RNAを抽出した。逆転写酵素を用いて合成したcDNAを鋳型として、SYBR Greenを指示薬として伸長したPCR産物量を定量した (Tanaka *et al.*, 2012)。

#### ビール酵母の醸造特性の評価

高密度醸造を模した発酵試験は、YPM培地を用いて行った。YPM培地に、 $2 \times 10^7$ /mLになるように細胞を接種し、25°Cで発酵を行った。10mLの試料を一日ごとにサンプリングし、遠心分離により細胞を除いた後、Density/Specific Gravityメーター (Kyoto Manufacturing) を用いて、残存する糖量を apparent extract として評価した (Iijima & Ogata, 2010)。

実際の高濃度密度ビール醸造に即した試験では、麦汁 (10°P) にマルトースを添加して、22°Pになるように調整した高密度麦汁を用いた。 $2 \times 10^7$ /mLになるように細胞を接種し、25°Cで発酵を行った。apparent extractの測定はYPM培地を用いた場合と同様である。

#### 細胞内 ROS レベルの評価

細胞内 ROS レベルを測定するために、酸化プローブとして 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA, SIGMA-ALDRICH) を用いた (Du & Takagi, 2007)。200 mL の YPD 液体培地に OD<sub>600</sub>=0.02 になるよう前培養液を添加し、25°C で OD<sub>600</sub>=1.0 になるまで振とう培養した。10 mL 培養液から遠心分離で得られた細胞を YPD 培地に懸濁し、H<sub>2</sub>DCFDA を終濃度 10 mM になるよう添加した。25°C, 30 分間、遮光条件下で反応を行った後、集菌し、10 mL の YPD または 9% エタノールを添加した YPD 培地に懸濁した。25°C, 48 時間、80 rpm で振とう培養し、遠心分離で集菌した。10 mL の滅菌水で洗浄した後、沈殿を 500 μL の滅菌水に懸濁した。ガラスビーズを加え、マルチビーズショッカーを用いて菌体を破碎し、遠心分離を行い、上清を回収した。この上清 50 μL を滅菌水 450 μL で希釈した後、485 nm の励起波長を照射し、放出された蛍光波長 (538 nm) を蛍光プレートリーダーで測定した。細胞内 ROS レベルを、抽出タンパク質 (mg) あたりの蛍光強度として算出した。

#### 細胞内 pH の測定

細胞内 pH を測定するために、蛍光プローブとして 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (SIGMA-ALDRICH) を用いた (Imai *et al.*, 1994)。YPD および 9% エタノールを添加した YPD 液体培地に OD<sub>600</sub>=1.0 になるよう植菌し、25°C, 48 時間、80 rpm で振とう培養した。2 mL の培養液を遠心分離で集菌した。得られた菌体を

MES バッファー (pH 6.2, 50 mM 2-N-(morpholino) ethanesulfonic acid, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) で 2 回洗浄した。菌体を 3 mL の MES バッファーで懸濁後、終濃度 1 mM 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate を添加し、30 分間、氷冷した。MES バッファーで 3 回洗浄した後、4 mL の MES バッファーで懸濁し、そのうち 0.3 mL を 10 mL のクエン酸/リン酸バッファー (pH 3.0, 50 mM citrate disodium hydrogen phosphate, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) に再懸濁した。遠心分離した後、沈殿を 2 回、クエン酸/リン酸バッファーで洗浄し、10 mL のクエン酸/リン酸バッファーに懸濁した。これを 90 分間氷冷した後、遠心分離 (3,000 x g, 5 分間, 2°C) し、沈殿を 3 mL のクエン酸/リン酸バッファーに懸濁した。この懸濁液の 2 波長の励起光 441, 488 nm に対する 517 nm における蛍光強度を蛍光プレートリーダーで計測し、その蛍光強度の比をとり、あらかじめ作成した検量線より細胞内 pH を求めた。

#### 1,000 x g 画分のプロテオーム解析

ビール酵母を対数増殖期まで生育させた。OD<sub>600</sub>=200 に相当する細胞からスフェロプラストを調製し、300 mM ソルビトールを含む緩衝液中でスフェロプラストを破裂させた。デブリスを取り除いた後、1,000 x g 画分を得た。1,000 x g 画分のタンパク質溶液をトリプシンで酵素消化した。消化後のペプチドを nanoUPLC (nanoACQUITY UPLC, ウォーターズ社) で分離し、Q-Tof micro (ウォーターズ社) を用いて解析した。MS/MS 解析により得られたデータは、MassLynx (マイクロマス社) によりデコンボリューション処理を行った。得られたピークリストファイル (pkl ファイル) に対して、Mascot (マトリックスサイエンス社) を用いて、Swiss-Prot または NCBI のデータベース内で一致するタンパク質の検索を行った。

#### パン酵母の発酵特性の評価

試験する酵母菌株は、糖蜜培地を用いて定常期まで生育させた。遠心分離により集菌し、蒸留水で 2 回洗浄した。洗浄菌体を吸収板 (ニッカー) の上で 1 時間、4°C に放置し、余剰の水分を取り除き、圧搾状酵母を得た。

低糖パン生地の組成は、生地を模して、100 g 小麦粉、5 g ショ糖、2 g NaCl、及び 4 g 圧搾状酵母とした。高糖パン生地の組成は、100 g 小麦粉、30 g ショ糖、0.25 g NaCl、6 g 圧搾酵母とした。適当な加水量の条件で、Swanson タイプのミキサーを用いて 2 ないし 3 分間のミキシングを行った。その後、40 g の生地に

切り分けた後, Fermograph II (ATTO 社) を用いて, 炭酸ガス発生量を経時的に測定した (Tanaka-Tsuno *et al.*, 2007).

## 結 果

### *S. cerevisiae* における V-ATPase 関連遺伝子の網羅的過剰発現

現在までに, 各遺伝子がホモザイガスに破壊された遺伝子破壊株セットを用いて, 環境ストレス耐性に寄与する遺伝子の同定を行い, V-ATPase の機能の環境ストレス耐性における重要性を示してきた. しかし, ホモザイガスの破壊株を用いた場合には, 生育に必要な遺伝子の評価ができない. そこで, 二倍体出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4743 株に由来する各遺伝子ヘテロ破壊株コレクションを用いてストレス応答に関与する遺伝子の網羅的表現型解析を行った. また, 環境ストレスが負荷された場合に副次的に生成する ROS に起因する酸化ストレス耐性が酵母の産業利用において重要と考え, 酸化ストレスに対して, haploinsufficiency を示す株を同定した. その結果, haploinsufficiency を示す 331 遺伝子を同定した. また, 著しい酸化ストレス感受性を示す破壊株において, 破壊されている遺伝子とその機能及び細胞局在性により分類した (Fig. 1). その結果は, ホモザイガスの破壊株を用いた解析で得られた結果を支持して, V-ATPase を含む transport

ATPase の重要性が示唆された (Fig. 1A). また, 細胞局在性で分類したところ, 核に局在し転写などに関わる遺伝子に加えて, 液胞局在性を示すタンパク質が重要であることが示された (Fig. 1B).

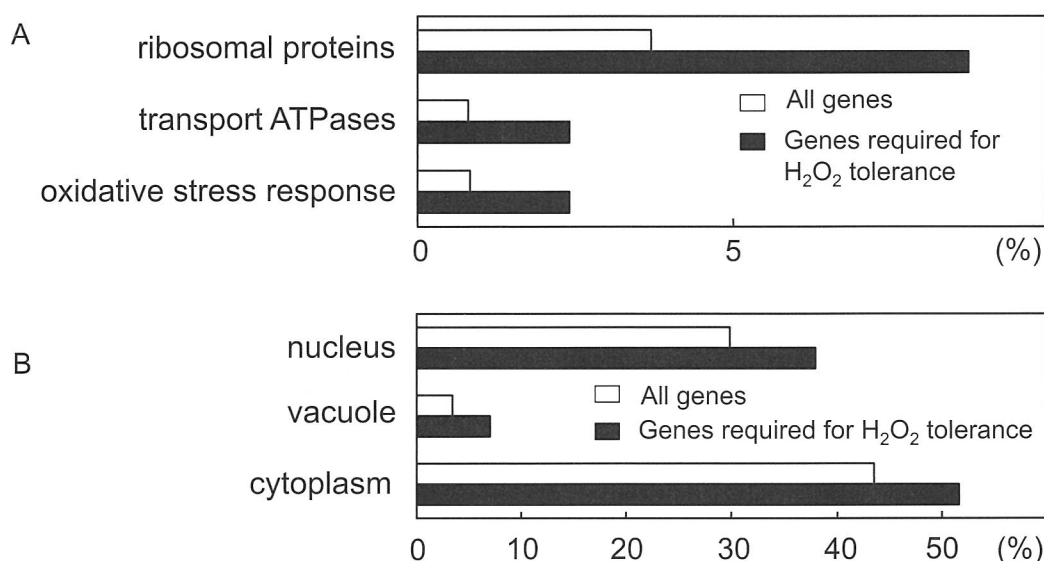
### *S. cerevisiae* における V-ATPase 関連遺伝子の網羅的過剰発現

上記の結果から, V-ATPase が酵母の産業利用における重要な因子であることが示唆されたため, V-ATPase の機能修飾が可能であるか検討を行った. V-ATPase は複数のサブユニットからなる構造体であるため, V-ATPase のコンポーネントをコードする遺伝子ではなく, その機能調節及びアッセムブリに寄与することが示唆されている遺伝子を網羅的に過剰発現させた.

*DBF2*, *RAV1*, *RAV2*, *SKP1*, *VMA12*, *VMA22*, *VMA41*, *VMA45* 及び *VOA1* 遺伝子を多コピープラスミドである pRS426 を用いて *S. cerevisiae* BY4741 株に導入した. その結果, *DBF2* 遺伝子を多コピーで導入した場合に, エタノールストレス及び過酸化水素による酸化ストレスに対して顕著な耐性を示した (Fig. 2).

### *S. pastorianus* における V-ATPase 関連遺伝子の過剰発現株の構築

実験室酵母で蓄積された知見を元に, ビール酵母,



**Fig. 1** MIPS classification of the total genes required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance. The 331 essential and nonessential genes whose heterozygous deletions conferred H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hypersensitivity are shown. All *S. cerevisiae* genes were classified based on function (A) and subcellular localization (B), using the MIPS database.



パン酵母等の産業用酵母において、構成発現プロモーターの制御下で V-ATPase 関連遺伝子を過剰発現させた。その結果、ビール酵母において、*DBF2*、*VMA41* 及び *RAV2* を過剰発現させた場合に、エタノール耐性の有意な向上が観察された (Fig. 3)。パン酵母にこれらの遺伝子を過剰発現させた場合には、有意なストレス耐性の変化は観察されなかった。

***S. pastorianus* の V-ATPase 関連遺伝子過剰発現株のビール醸造特性**

エタノール耐性の向上が観察された *DBF2*、*VMA41* 及び *RAV2* を過剰発現させたビール酵母の高濃度密度ビール醸造における特性の評価を行った。まず、YPM 培地を用いて、発酵特性を調べた (Fig. 4)。その結果、解析した 3 株のうち、*DBF2* が最も優れた発酵特

性を示し、エタノール生産性に優れていた (Fig. 4A)。他の *VMA41* 及び *RAV2* 過剰発現株も野生株と比較した場合には、発酵特性の向上が観察された (Fig. 4B 及び C)。

最も優れた発酵特性を示した *DBF2* 過剰発現株について、麦汁を用いて高密度醸造に適するか、実用に即した検討を行った (Fig. 5)。その結果、野生株と比較して、*DBF2* 過剰発現株は、糖の資化性に優れていることが示唆された。また、発酵後の細胞の生存率を調べたところ、*DBF2* 過剰発現株の生存率は有意に野生型株よりも高いことが示された。

***S. pastorianus* の *DBF2* 過剰発現株の特性評価**

*DBF2* 過剰発現株のエタノールストレス耐性の機構に関する知見を得るために、細胞内 ROS レベル (Fig.

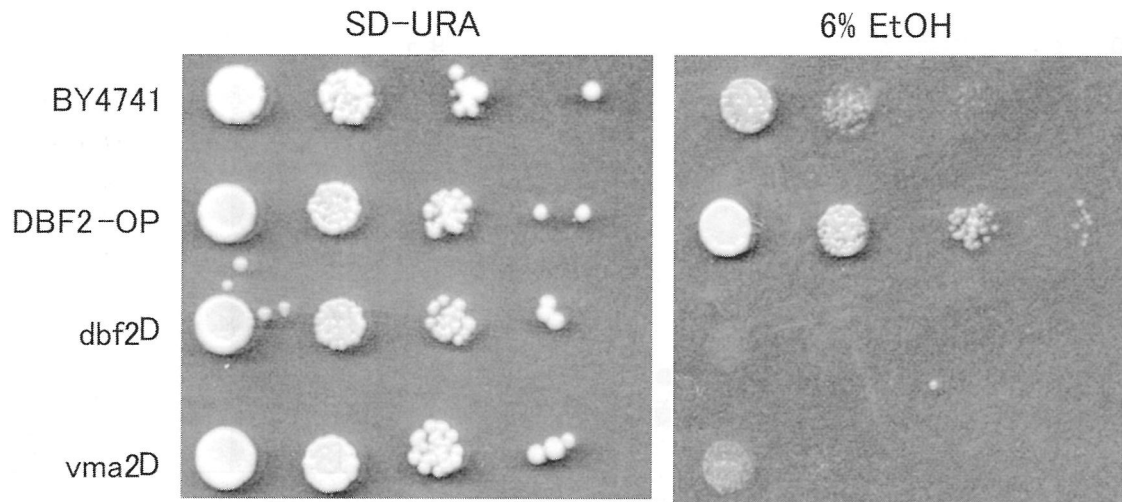


Fig. 2 Ethanol tolerance of *S. cerevisiae* BY4741 overexpressing *DBF2*.

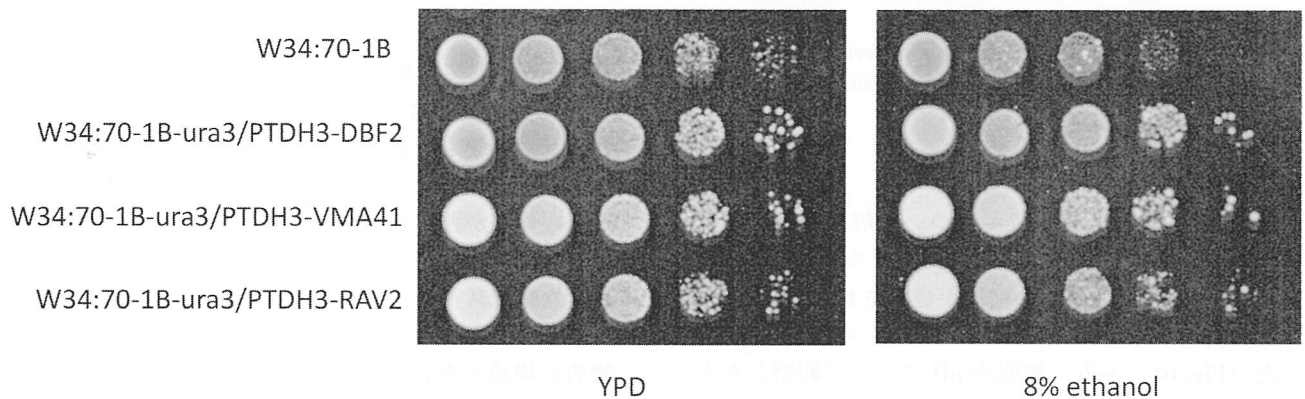


Fig. 3 Growth of the *DBF2*, *VMA41/CYS4/NHS5*- and *RAV2*-overexpressing yeast strains and the parent strain, W34:70-1B-ura3.

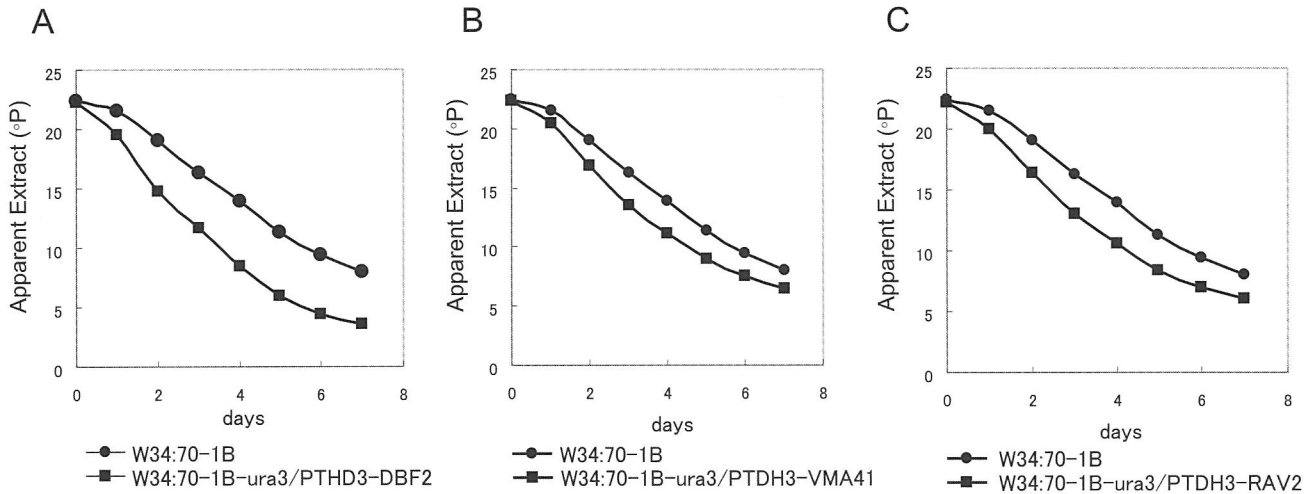


Fig. 4 Time course of high-gravity broth YPM20 fermentation using the *DBF2*- (A), *VMA41/CYS4/NHS5*- (B) and *RAV2*- (C) overexpressing yeast strains and the parent strain.

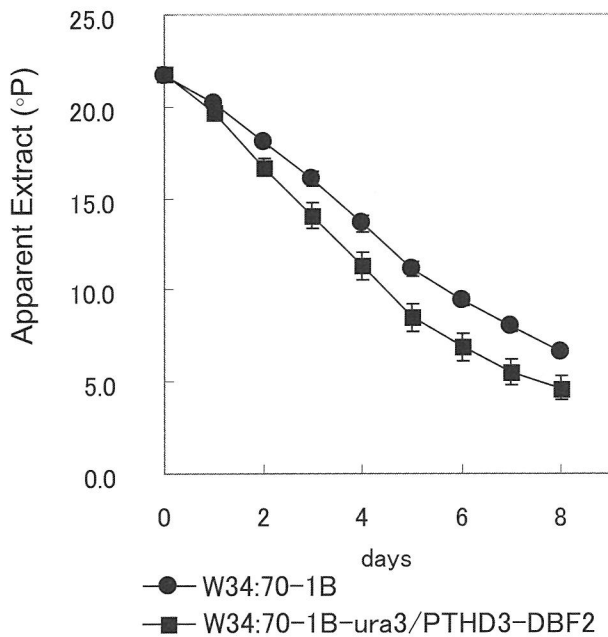


Fig. 5 Time course of high-gravity wort fermentation using the *DBF2*-overexpressing yeast strain and the parent strain.

6) 及び細胞内 pH (Fig. 7) について解析を行った。その結果, 野生型株では, エタノールストレス負荷により ROS レベルの著しい増加が観察されたが, *DBF2* 過剰発現株では ROS レベルの増加が有意に抑制されていた (Fig. 6)。一方, 細胞内 pH について観察したところ, 野生株と比較して, *DBF2* 過剰発現株では細胞内 pH の低下抑制の傾向が観察されたが, 有意差のあ

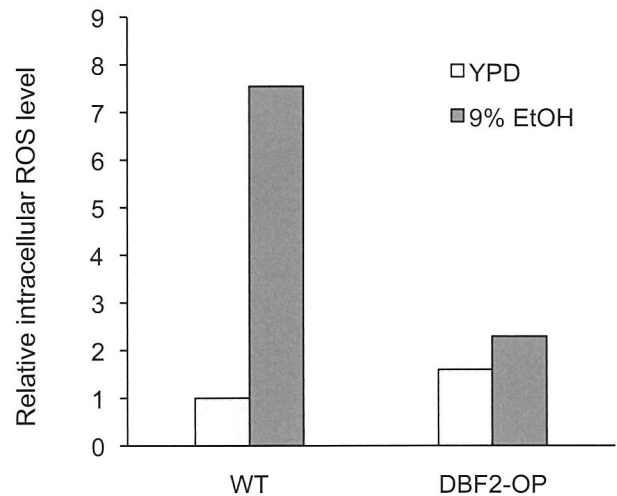


Fig. 6 ROS level after ethanol challenge in *DBF2*-overexpressing yeast strain and the parent strain.

るデータとしては取得できなかった (Fig. 7)。

また, 液胞を含む 1,000 x g 沈殿画分の解析を行った。有意差をもったデータとしては取得できなかったが,  $V_0$  サブユニットを構成するタンパク質の検出頻度が高い傾向が観察された。

高度な環境ストレス耐性を有する実用パン酵母の開発

現在までに, トレハロースやプロリン等の細胞保護物質が環境ストレス耐性に重要であり, その代謝調節により環境ストレス耐性を向上させ得ることを示してきた (Shima & Takagi, 2009)。そこで, トレハロース

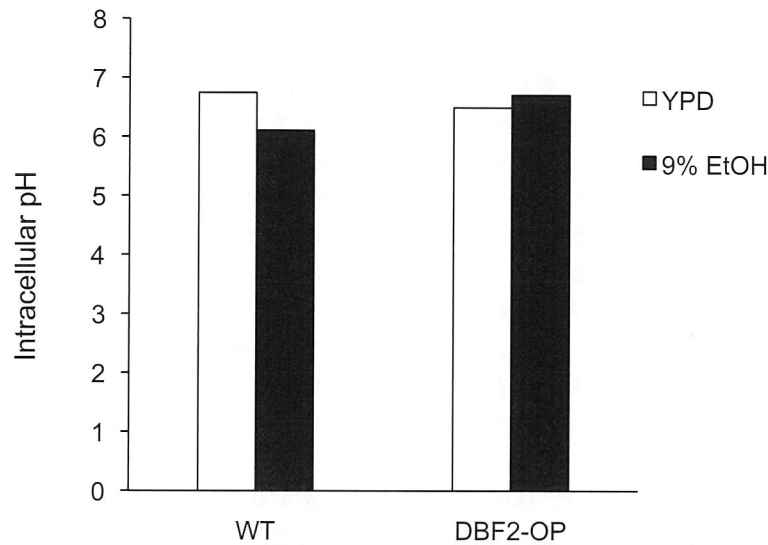


Fig. 7 Intracellular pH after ethanol challenge in *DBF2*-overexpressing yeast strain and the parent strain.

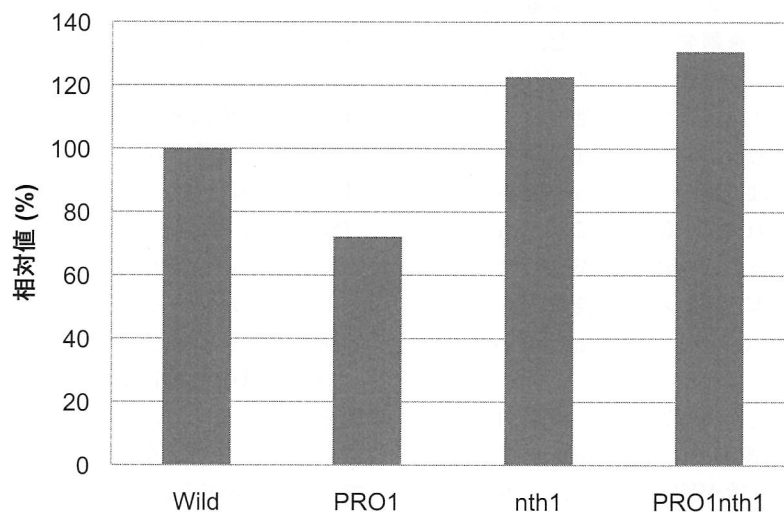


Fig. 8 Fermentation ability of baker's yeast strains in doughs. Frozen doughs were prepared by using WT, PRO1-I150T,  $\Delta$ nth1, and PRO1-I150T/ $\Delta$ nth1.

とプロリンを同時に高度に蓄積するパン酵母株 (PRO1 nth1) を構築し、実用上有用な冷凍耐性を評価した (Fig. 8). その結果、トレハロースとプロリンを同時に蓄積する株では、野生型よりも有意に高い冷凍耐性を示した (Fig. 8).

また、その他に、プロリンと一酸化窒素の蓄積株では、製パン過程で負荷される様々な環境ストレスに対して耐性を示すことを明らかにした。さらに、環境ストレス耐性に関与する可能性が指摘されている転写因子 Pog1 をコードする遺伝子の改変によりパン酵母の

環境ストレス耐性を向上させることが可能であった。また、ストレス適応において重要な役割を果たす転写因子 Msn2 の過剰発現によりストレス耐性が向上することも示唆された (Sasano *et al.*, 2012a).

## 考 察

本研究では、酵母 *S. cerevisiae* の発酵機能により製造される食品や酒類の製造プロセスの高度化を目指して、環境ストレス耐性を有する産業用 *S. cerevisiae* 株

の構築を試みた。

本研究グループのフェノミクス等のオミックス解析により V-ATPase が環境ストレス耐性に重要な役割を果たすことを示してきた (Shima & Takagi, 2009)。まず、二倍体株において、1 コピーの遺伝子が破壊されたヘテロ破壊株コレクションを用いてストレス応答に関与する遺伝子の網羅的表現型解析を行った。この解析により、haploinsufficiency を指標として、生育に必須な遺伝子群から環境ストレス耐性に寄与する遺伝子を抽出可能であると考えた。特に、核に局在し転写・翻訳に関わる遺伝子の重要性を指摘することができた。一方で、V-ATPase をコードする遺伝子に関するヘテロ破壊株も酸化ストレスに対して、haploinsufficiency を示すことが指摘できた (Okada *et al.*, 2014)。これらの結果から、V-ATPase をストレス耐性向上に関する標的として再確認した。

V-ATPase は複数のサブユニットからなることから (Kane, 2007)、V-ATPase を構成するタンパク質ではなく、その機能調節やアセンブリに関わる遺伝子に注目し、網羅的に遺伝子の過剰発現を行った。まず、実験室株を用いて解析を行ったところ、タンパク質キナーゼをコードする *DBF2* 遺伝子の過剰発現により、エタノールストレスや酸化ストレスが有意に向上することが示唆された。Dbf2 は、有糸分裂からの遷移に寄与していることが示されている一方で (Toyn & Johnston, 1994)、V-ATPase の Vma1 及び Vma2 サブユニットのリン酸化により V-ATPase の機能調節にも関与する可能性が示唆されている (Makrantonis *et al.*, 2007)。

様々な産業酵母において、*DBF2* 遺伝子の過剰発現を行ったところ、ビール酵母 *S. pastorianus* において、エタノールストレス耐性が観察された。一方で、*S. cerevisiae* に属する産業酵母では、このような現象は観察されなかった。この原因としては、産業用 *S. cerevisiae* 株は高い環境ストレス耐性を有しているため表現型として観察できなかった可能性や *S. pastorianus* の遺伝的背景においてのみ生じる現象である可能性などが考えられる。多面的な角度から検証を続け、バイオエタノール酵母や醸造酵母の分子育種に適用できる技術に発展させたいと考えている。*S. bayanus* における検討は行っていないが、*S. cerevisiae* の V-ATPase 関連遺伝子の過剰発現により、環境ストレス耐性を獲得する可能性も考えられる。

*DBF2* 過剰発現株では、エタノールストレス負荷に起因する細胞内 ROS レベルの上昇が有意に抑制されていた。また、有意差を有するデータとしては取得できなかったが、細胞内 pH の低下の抑制傾向が観察され

た。これらの要因が *DBF2* 過剰発現株の高度なエタノールストレス耐性に寄与しているものと考えられる。V-ATPase の  $V_0$  サブユニットと  $V_1$  サブユニットのアセンブリに関わる RAVE コンプレックスを構成する Rav2 タンパク質をコードする遺伝子の過剰発現株は、*DBF2* 遺伝子過剰発現株と部分的に類似した表現形質を示した。これらのことから、*DBF2* は  $V_1$  と  $V_0$  サブユニットのアセンブリに寄与している可能性も想定される。

また、細胞生物学的な細胞分画手法とプロテオーム解析を組み合わせ、液胞を含む画分のプロテオーム解析を試みた。解析手法として、再現性の確保が十分とは言えないが、*DBF2* 過剰発現株では、 $V_0$  セクターを構成するタンパク質が高頻度に検出される傾向が観察された。V-ATPase の構造・機能変化の詳細な分子メカニズムには言及できないが、*DBF2* の過剰発現により、V-ATPase の機能修飾がなされたものと推測している。また、実用パン酵母株において、トレハロース及びプロリンの同時蓄積により、製パンに関与する環境ストレス (Baking-associated stresses) の向上が図れることが明らかになった。これらの知見は、パン酵母の分子育種に極めて有効な手法であることを示唆する。また、機能が明らかになっていない *POG1* 遺伝子は、転写因子をコードすることが推測されている (Sasano *et al.*, 2013)。これらの遺伝子の高発現や遺伝子の改変もパン酵母のストレス耐性向上に有用であることが明らかになった。今後、Pog1 の機能についても知見を蓄積していきたいと考えている。

パン酵母の育種においては、消費者心理や環境安全性を考慮に入れて、外来遺伝子が導入されないセルフクローニング手法を主に用いた。セルフクローニングでは、*S. cerevisiae* が本来有していない機能の付与は難しいと言わざるを得ないが、環境ストレス耐性の改善には極めて有効な手法であると考えている。今後、これらの手法の有用性や安全性に関する解析を展開していく。

本研究では、酵母の機能を利用した食品製造技術の高度化を目標とした。高密度醸造により醸造の効率化が図れれば、製造コストやエネルギーの削減に繋がるものと考えられる。また、製パン分野では、極めて高度な冷凍耐性を有するパン酵母の開発により、製品の長期保存が可能になり、食品ロスの低減にも繋がることを想定している。また、飛躍的な乾燥ストレス耐性の向上が可能になれば、ドライイーストのシェルフライフの延長が期待でき、我が国の優れたパン酵母産業の海外進出にも貢献可能であると考えている。

バイオマス利用などの環境保全技術は、フードチェ

ーンと切り離して論議することはできないと考えている。そのためには、食品製造に要するエネルギーを縮減していくことが重要である。また、製品のシェルフライフの延長等により食品ロスの縮減も必要である。特に、*S. cerevisiae* は食品製造において、最重要な微生物の1種であり、基礎科学で膨大に蓄積された知見を産業用 *S. cerevisiae* の開発に有効活用していく必要性がある。

## 要 約

発酵食品や酒類の製造プロセスは、発酵に寄与する *S. cerevisiae* にとって過酷なストレス環境と言える。したがって、環境ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の開発は製造プロセスの高度化に直結する。そこで、環境ストレス耐性機構の解明及びストレス耐性酵母の開発を行った。

現在までに、液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) の環境ストレス耐性における重要性を示してきた。V-ATPase のサブユニットをリン酸化する可能性が指摘されているタンパク質キナーゼ Dbf2 をビール酵母 (*S. pastorianus*) において過剰発現させた場合に、エタノールストレス耐性が著しく向上した。DBF2 過剰発現株ではエタノールストレス条件下における細胞内活性酸素種レベルの低下が観察された。

さらに、トレハロースの代謝制御や転写因子の改変を産業用パン酵母で行ったところ、製パンに関連する環境ストレス (Baking-associated stresses; 冷凍, 高シヨ糖及び乾燥ストレス) が著しく向上したパン酵母が構築された。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 原著論文

- 1) Okada, N., Ogawa, J. & Shima, J. (2014). Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. . FEMS Yeast Res. **14**: 425-434.
- 2) Hasegawa, S., Ogata, T., Tanaka, K., Ando, A., Takagi, H. & Shima, J. (2012). Overexpression of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates under high-gravity fermentation. J. Inst. Brewing **118**: 179-185.
- 3) Sasano, Y., Haitani, Y., Ohtsu, I., Shima, J. & Takagi, H. Proline accumulation in baker's yeast enhances high-sucrose stress tolerance and fermentation ability in sweet dough. Int. J. Food Microbiol. **152**: 40-43 (2011).
- 4) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. & Takagi, H. (2012). Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability

under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. Microb. Cell Fact. **11**: 40.

- 5) Sasano, Y., Watanabe, D., Ukibe, K., Inai, T., Ohtsu, I., Shimoi, H. & Takagi, H. (2012). Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. J. Biosci. Bioeng. **113**: 451-455.
- 6) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. & Takagi, H. (2012). Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances the fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**: 624-627.
- 7) Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Oshiro, S., Shima, J. & Takagi, H. (2013). Improvement of fermentation ability under baking-associated stress conditions by altering the *POG1* gene expression in baker's yeast. Int. J. Food Microbiol. **165**: 241-245.

### 総説

- 1) 島 純, 安藤 聡, 中村敏英. (2010). シリーズ「酵母のストレス耐性」(第一回) 酵母の環境ストレス耐性: 産業利用における重要性和分子機構. 日本食品科学工学会誌, **57**, 16-21.
- 2) 中村敏英, 安藤 聡, 島 純. (2010). シリーズ「酵母のストレス耐性」(第二回) パン酵母遺伝子発現プロフィール: 製パンストレス環境下におけるパン酵母の遺伝子発現プロフィール. 日本食品科学工学会誌, **57**: 321-325.
- 3) 安藤 聡, 中村敏英, 島 純. (2010). シリーズ「酵母のストレス耐性」(第三回) 網羅的表現型解析と分子育種: ストレス環境下における網羅的表現型解析とストレス耐性酵母の分子育種. 日本食品科学工学会誌, **57**: 367-371.
- 4) 島 純, 小松崎典子, 吉田綾子, 安藤 聡, 中村敏英. (2013). 「特集: 美味しい健康生活は微生物が作る ~ 作物生産, 食品素材開発, 健康支援~」パンづくりを支える微生物機能 - 酵母と乳酸菌を中心にして -. 生物工学会誌, **91**: 618-620.
- 5) 島 純 パンと微生物機能 温故知新 (秋田今野商店), **51**: 63-67 (2014).

### 著書

- 1) 島 純. (2010). 第4章食品分野への応用. 第7節 「パン酵母遺伝子データベース」. バイオチップ実用化ハンドブック, エヌ・ティー・エス, pp.353-359.
- 2) Shima, J. & Nakamura, T. Environmental stresses that yeast cells are exposed to during bioethanol production from biomass. *Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation* (Takagi, H & Kitagaki, H.) (eds.) Springer (印刷中)
- 3) Takagi, H. & Shima, J. Stress tolerance of baker's yeast during bread-making processes. in *Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation* (Takagi, H & Kitagaki, H.) (eds.) Springer (印刷中)

### 特許

- 1) 高木博史, 笹野 佑, 島 純, 灰谷豊 (2011): 機能未

知タンパク質 Pog1 の高発現により高糖生地耐性が向上したパン酵母 特願 2011-269051 (2011年12月8日出願) (出願人: 奈良先端科学技術大学院大学)

- 2) 高木博史, 笹野 佑, 島 純, 灰谷豊 (2011): 機能未知タンパク質 Pog1 の遺伝子破壊により冷凍耐性が向上したパン酵母 特願 2011-274519 (2011年12月15日出願) (出願国: 日本) (出願人: 奈良先端科学技術大学院大学)

#### 受賞

- 1) 島 純 (2011): 産業酵母における環境ストレス耐性機構の解明と食品・環境分野への応用 バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究奨励金 (賞)

#### 保存機関に寄託した微生物株

該当なし.

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり, 寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します.

#### 文 献

- Ando, A., Nakamura, T., Murata, Y., Takagi, H. & Shima, J. (2007). Identification and classification of genes required for tolerance to freeze-thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res.* **7**: 244–253.
- Ando, A., Tanaka, F., Murata, Y., Takagi, H. & Shima, J. (2006). Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 249–267.
- Attfield, P.V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* **15**: 1351–1357.
- Du, X. & Takagi, H. (2007). N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 1343–1351.
- Hasegawa, S., Ogata, T., Tanaka, K., Ando, A., Takagi, H. & Shima, J. (2012). Overexpression of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates under high-gravity fermentation. *J. Inst. Brewing* **118**: 179–185.
- Iijima, K. & Ogata, T. (2010). Construction and evaluation of

- self-cloning bottom-fermenting yeast with high *SSU1* expression. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1906–1913.
- Imai, T., Nakajima, I. & Ohno, T. (1994). Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular pH. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**: 5–8.
- Kane, P.M. (2007). The long physiological reach of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**: 415–421.
- Makrantonis, V., Dennison, P., Stark, M.J. & Coote, P.J. (2007). A novel role for the yeast protein kinase Dbf2p in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase function and sorbic acid stress tolerance. *Microbiology* **153**: 4016–4026.
- Okada, N., Ogawa, J. & Shima, J. (2014). Comprehensive analysis of genes involved in the oxidative stress tolerance using yeast heterozygous deletion collection. *FEMS Yeast Res.* **14**: 425–434.
- Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. & Takagi, H. (2012a). Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances the fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 624–627.
- Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Oshiro, S., Shima, J. & Takagi, H. (2013). Improvement of fermentation ability under baking-associated stress conditions by altering the *POG1* gene expression in baker's yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **165**: 241–245.
- Sasano, Y., Watanabe, D., Ukibe, K., Inai, T., Ohtsu, I., Shimoi, H. & Takagi, H. (2012b). Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 451–455.
- Shima, J., Ando, A. & Takagi, H. (2008). Possible roles of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and mitochondrial function in tolerance to air-drying stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *Yeast* **25**: 179–190.
- Shima, J. & Takagi, H. (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **53**: 155–164.
- Tanaka-Tsuno, F., Mizukami-Murata, S., Murata, Y., Nakamura, T., Ando, A., Takagi, H. & Shima, J. (2007). Functional genomics of commercial baker's yeasts that have different abilities for sugar utilization and high-sucrose tolerance under different sugar conditions. *Yeast* **24**: 901–911.
- Tanaka, K., Ishii, Y., Ogawa, J. & Shima, J. (2012). Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 8161–8163.
- Toyn, J.H. & Johnston, L.H. (1994). The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition. *EMBO J.* **13**: 1103–1113.

## 有機酸ストレス耐性機構の解明と新規バイオ 燃料生産プロセスの構築

島 純, 田中晃一, 安藤晃規<sup>1)</sup>, 小川 順<sup>2)</sup>

京都大学微生物科学寄附研究部門

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Organic acids tolerance in yeast and its application to bioethanol production

Jun Shima, Koichi Tanaka, Akinori Ando<sup>1)</sup>, Jun Ogawa<sup>2)</sup>

Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University

Kitashirakawa Oiwake-Chō, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Bacterial contamination is known as a major cause of the reduction in ethanol yield during bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Organic acids including acetate and lactate are effective agents for the prevention of bacterial contamination, but it negatively affects the fermentation ability of *S. cerevisiae*. We are proposing that the combined use of organic acids and yeast strains tolerant to organic acids may be effective for the elimination of principally lactic acid bacterial (LAB) contamination.

In the present study, we focus on the acetate-tolerant strain of *S. cerevisiae*, which is useful for the construction of fermentation systems for bioethanol production under acetate addition conditions. A massive screening was performed to identify an acetate-tolerant strain of *S. cerevisiae*. We found that *S. cerevisiae* ATCC 38555 is acetate-tolerant, with a fermentation profile indicating that it has a high level of acetate adaptation. The global gene expression analysis indicated that *HAA1*- and *AFT1*-regulated genes are clearly up-regulated.

We show that overexpression of the *HAA1* gene in laboratory *S. cerevisiae* strains, which encodes a transcriptional activator, could be a useful molecular breeding method for acetate-tolerant yeast strains. Furthermore, we constructed a *HAA1*-overexpressing diploid strain (*MAT a/a*, named ER HAA1-OP) derived from the industrial bioethanol strain Ethanol Red (ER). ER HAA1-OP showed tolerance not only to acetate but also to lactate, and this tolerance was dependent on the increased expression of *HAA1* gene. The ethanol production ability of ER HAA1-OP was almost equivalent to that of the parent strain during the bioethanol production process from sugarcane molasses in the absence of acetate. The addition of acetate at 0.5% (w/v, pH 4.5) inhibited the fermentation ability of the parent strain, but such an inhibition was not observed in the ethanol production process using ER HAA1-OP.

We also show that trehalose confers protection against various environmental stresses on yeast cells. Trehalase gene deletion mutants that accumulate trehalose at high levels showed significant stress tolerance to acetic acid. The enhancement of trehalose accumulation can thus be considered a target in the breeding of acetic acid-tolerant yeast strains.

Key words: organic acid stress; acetic acid; bacterial contamination; stress tolerant yeast; bioethanol production

E-mail: shima@agr.ryukoku.ac.jp, ktanaka@kais.kyoto-u.ac.jp,  
aando@kais.kyoto-u.ac.jp, ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

<sup>1)</sup> 現 京都大学学際融合教育推進センター

<sup>2)</sup> 現 京都大学大学院農学研究科

共同研究者：吉山洋子，稲葉拓也（京都大学微生物科学寄附研究部門），高木博史，渡辺大介（奈良先端科学技術大学院大学），下飯 仁（酒類総合研究所），中村敏英，安藤 聡（農研機構食品総合研究所）

### 緒 言

酵母は発酵食品や酒類の製造に必須な産業微生物であり，基礎研究分野においても長年にわたり酵母を題材とした研究が精力的に展開されてきた．近年では，バイオマスの有効利用の観点から，バイオエタノールの生産微生物として，酵母はきわめて重要な位置を占

めている (Antoni *et al.*, 2007).

発酵食品の製造や醸造プロセスと同様に, バイオエタノール製造プロセスは, 酵母にとって過酷なストレス環境であると考えられる。したがって, 酵母をバイオエタノール製造に利用する場合に鍵となるのが環境ストレスに対する耐性と考えられる。環境ストレス耐性を有する酵母の開発および利用は, プロセスの高度化や低コスト化に直結すると期待できる。バイオエタノール製造プロセスでは, 原料に由来する化学物質や高温が同時に負荷されるケースが多い。したがって, 酵母の産業利用を高度化するうえで, 環境ストレス応答・耐性メカニズムを科学的に理解し, その知見を活用することはきわめて重要である。

バイオエタノール製造の発酵プロセスにおいて, 細菌や野生酵母の生産する酢酸や乳酸等の有機酸が発酵液中に高度に蓄積されると, 糖類からエタノール変換を触媒する酵母の発酵能が阻害される (Beckner *et al.*, 2011; Skinner & Leathers, 2004)。特に, 発酵液への乳酸菌の混入が問題となっており, 汚染例が報告されている (Beckner *et al.*, 2011)。それに加えて, 第二世代バイオエタノール製造の主要原料に想定されているリグノセルロース系バイオマスの前処理・糖化工程では, アセチル化されたヘミセルロース等から酢酸が遊離し, 発酵阻害の要因となり得る (Olsson & HahnHagerdal, 1996)。このような背景から, 有機酸耐性を有する酵母の構築及びその利用は, 発酵不良によるエタノール収量の低下防止に繋がることが想定できる。

さらに, 高度な有機酸耐性を有する酵母を育種することが可能になれば, 有機酸をむしろ積極的に使用し, 有機酸耐性酵母との組合せにより雑菌汚染を排除できることが考えられる。抗生物質の添加により細菌汚染の抑制は可能であるが, 廃棄物を飼料や肥料として再利用する場合には好ましい方法とは言えない。また, バイオ燃料生産では低コスト化及びエネルギー収支の適正化が望まれている現状であり, こういったコンセプトの延長線上に, 高エネルギープロセスである加熱殺菌を省いたプロセスの構築も視野に入る可能性も想起される。したがって, 高度な有機酸ストレス耐性を有する酵母株の開発はグリーンバイオにおけるキーテクノロジーの一つと考えられる。

現在までに, 様々な酵母種から構成される農研機構食品総合研究所微生物バンクの所有する酵母ライブラリーを用いて有機酸ストレス耐性酵母の探索を行った。その結果, 乳酸に高度な耐性を有する *Candida glabrata* (Watanabe *et al.*, 2008) 及び酢酸耐性を有する *Schizosaccharomyces pombe* (Saithong *et al.*, 2009)

を分離した。バイオエタノール製造プロセスで汚染の報告がある *Lactobacillus* 属乳酸菌をモデル汚染菌として検証した結果, 有機酸を適正な濃度で添加すると, *Lactobacillus* 属乳酸菌の増殖が有意に阻害され, エタノール収率を高く維持できることが可能であった (Saithong *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2008)。

一方, 六炭糖を基質にして高効率でエタノールを生産することができる *S. cerevisiae* は, 古くから発酵食品や酒類の製造に使用されてきた。豊富な食経験を背景として, *S. cerevisiae* は安全性の高い GRAS (generally recognized as safe) 微生物としての位置を占めている。したがって, *S. cerevisiae* をバイオエタノール製造に応用した場合には, 製造廃棄物を DDGS (distiller's dried grains with solubles) などとして活用する場合に有利な要素となる。

以上述べた背景から, 酢酸などの有機酸に高度な耐性を有する *S. cerevisiae* 株を取得し, バイオマス利用の可能性を検証することを目的として本研究を行った。本研究において, 酢酸応答に関与する転写活性化因子をコードする *HAA1* の過剰発現が酢酸ストレス耐性酵母の分子育種に適することを示した。また, 酵母の細胞保護物質として機能するトレハロース等と酢酸ストレス耐性についての検討を行った。

## 材料および方法

### 菌株, 培地, 及び培養条件

実験室酵母株として, *S. cerevisiae* S288C 株および BY4741 株を用いた。バイオエタノール生産用酵母としては, Le Saffre 社より提供を受けた Ethanol Red 株 (ER) を用いた。遺伝子の過剰発現株の構築にあたって, ER 株由来の一倍体株及びそのウラシル要求株を取得した (Inai *et al.*, 2013)。また, バイオエタノール生産株のコントロール株として, *S. cerevisiae* NBRC 0224 株を用いた。

酵母の培養には, 特記しない場合には, YPD 培地 (2% グルコース, 1% 酵母エキス, 及び 2% ペプトン) を用いた。固体培養する際には, YPD 培地に 2% の寒天を添加した。

YP5D 培地は, YPD 培地のグルコース量を 5% に増量した培地である。サトウキビ糖蜜培地 (16% 糖: グルコース, フルクトース及びシュクロースを加算して算出, 0.046%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及び 0.225% 尿素) は, 発酵試験に用いた。

### スポット法によるストレス耐性の評価

YPD 培地を用いて, 酵母株を対数増殖まで生育させ



た。10段階ごとの希釈系列を調製し、YPD 寒天培地または酢酸等を含む YPD 寒天培地に 4  $\mu$ l スポットした。スポット後、寒天培地を 30°C で 24 時間または 48 時間培養した。

#### 酢酸耐性 *S. cerevisiae* 株の探索

農研機構食品総合研究所微生物バンクに保存されている約 500 株の *S. cerevisiae* 株を対象に酢酸耐性株の探索を行った。0.8% の酢酸を含む液体 YPD 培地における生育を指標として探索を行った。生育は 600 nm における濁度として評価した。

#### RNA の抽出及び DNA マイクロアレイ解析

酢酸を含まない YPD 培地で、酵母株を対数増殖期まで培養し、0.6% の酢酸を添加し 30 分間培養を続けた。その後、集菌した細胞からホットフェノール法によりトータル RNA を抽出した。Poly (A)<sup>+</sup>RNA 画分を濃縮した後、Affymetrix 社のキットを用いてラベリングを行った。Yeast Genome 2.0 array を用いてハイブリダイゼーションを行った。取得したデータは、GeneSpring ver. 11.5.1 を用いて解析を行った。

#### 遺伝子過剰発現株の構築

過剰発現株の構築は、染色体上の標的遺伝子プロモーターを強力な構成発現プロモーターである *TDH3* プロモーターに置換することにより行った (Hasegawa *et al.*, 2012)。

#### 遺伝子発現量の解析

特定の遺伝子の発現レベルの評価は、定量 PCR 法を用いて行った。YPD 培地を用いて、対数増殖期まで細胞を生育させ、遠心分離により細胞を回収した。細胞からホットフェノール法によりトータル RNA を抽出した。逆転写酵素を用いて合成した cDNA を鋳型として、SYBR Green を指示薬として伸張した PCR 産物量を定量した (Hasegawa *et al.*, 2012)。

#### エタノール、酢酸及びグルコースの定量

培養上清中のエタノール、酢酸及びグルコースの濃度は、高速液体クロマトグラフィー (Prominence series, Shimadzu) により、発酵モニタリングカラム (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。各濃度は、外標準から得た検量線から決定した (Tanimura *et al.*, 2012)。

#### トレハロースの定量

酵母細胞から熱水を用いてトレハロースを抽出し

た。抽出物中のトレハロース濃度は、高速液体クロマトグラフィー (Prominence series, Shimadzu) により、糖分離カラム (COSMOSIL Sugar-D, Nacal Tesque, Kyoto, Japan) を用いて測定した。各濃度は、外標準から得た検量線から決定した (Shima *et al.*, 1999)。

#### 発酵試験

YPD 培地で前培養を行った後、100 ml の糖蜜培地に  $4.8 \times 10^7$  細胞 ( $OD_{600}=1$  に相当) の密度になるように YPD 培地または YP5D 培地に植菌した。80 rpm の弱い振盪条件で、30°C で 24 時間培養を行い、サンプリングした培養上清のエタノール濃度等の定量を行った。

また、バイオマスモデルとして、サトウキビ糖蜜培地を用いた発酵試験も同様に行った (Inaba *et al.*, 2013)。

#### トレハララーゼ変異株の構築

BY4741 株に由来するトレハロース合成酵素遺伝子 (*TPS1* 及び *TPS2*) 及びトレハロース分解酵素遺伝子 (*NTH1* 及び *NTH2*) の破壊株は EUROSCARF より入手した。

さらに、*HAA1* 遺伝子破壊株の遺伝的背景において、同様にトレハロース合成酵素遺伝子 (*TPS1* 及び *TPS2*) 及びトレハロース分解酵素遺伝子 (*NTH1* 及び *NTH2*) を常法に従い破壊し、多重欠損株を構築した (Shima *et al.*, 1999)。

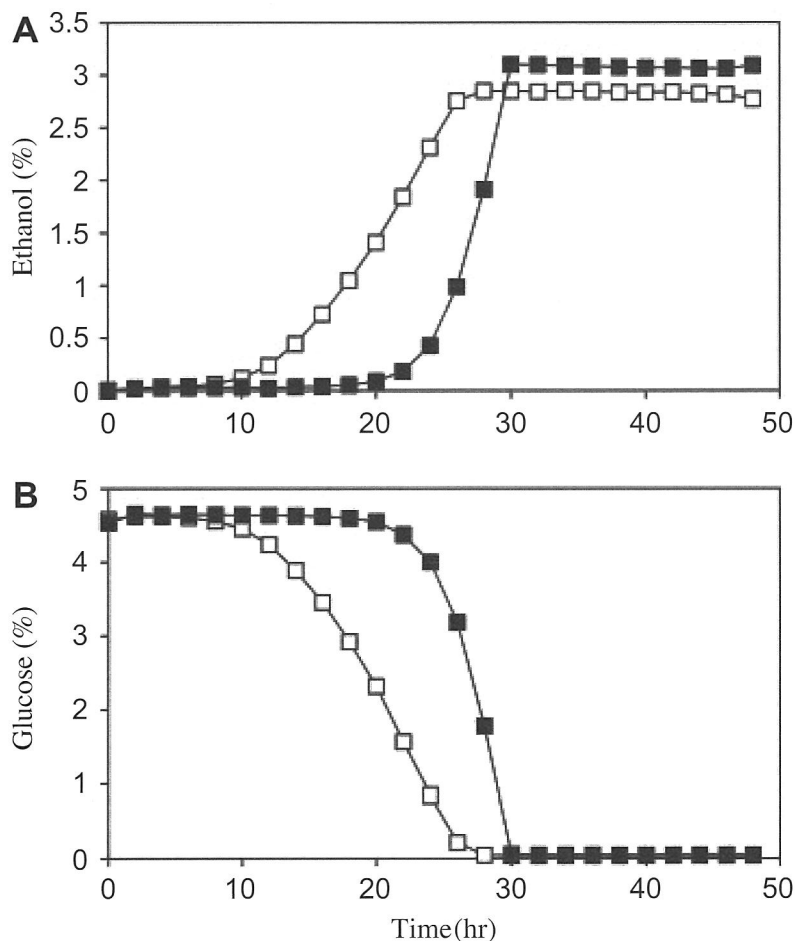
## 結 果

#### 酢酸耐性を有する *S. cerevisiae* 株の探索

農研機構食品総合研究所に保存されている約 500 株の *S. cerevisiae* 株を探索源として、有機酸ストレス耐性酵母の探索を行った。0.6% の酢酸を含む YPD 培地におけるエタノール生産量で評価したところ、酢酸産業用バイオエタノール酵母である *S. cerevisiae* NBRC 0224 株と比較して、有意な酢酸ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* ATCC 38555 株が見出された (Fig. 1)。

#### 酢酸耐性株の遺伝子発現解析

*S. cerevisiae* ATCC 38555 株の酢酸耐性の要因に関する知見を取得するため、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。比較対象としては、産業用バイオエタノール酵母である *S. cerevisiae* NBRC 0224 株を用いた。酢酸添加により顕著に遺伝子発現の上昇が観察された遺伝子 (2 倍以上) について、Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS;



**Fig. 1** Ethanol production (A) and glucose consumption (B) of yeast strains under acetate addition conditions. Cells of NBRC 0224 (closed squares) and ATCC 38555 (open squares) were pre-cultured at 30°C for 12 h in YPD medium and then inoculated into YP5D medium containing 0.6% acetate (pH 4.5) at the final OD<sub>600</sub> = 0.1.

<http://mips.gsf.de/>) のデータベースを活用して、機能分類を行った。その結果、酢酸応答に関して中心的な役割を果たすと考えられている *HAA1* 遺伝子が、*S. cerevisiae* ATCC 38555 株において、高度に発現誘導されていることが明らかになった (Table 1)。また、その他、鉄輸送の調節に関与するタンパク質をコードする *AFT1* や浸透圧適応に関連する *HOG1* の発現上昇も *S. cerevisiae* ATCC 38555 株において顕著であった。

#### 実験室酵母における *HAA1* 遺伝子過剰発現株の構築及び特性

高度な酢酸耐性株の分子育種の基盤的知見の蓄積のため、実験室酵母 S288C の遺伝的背景を有する *S. cerevisiae* 株において、酢酸耐性自然分離株で高レベルの発現誘導が観察された *HAA1* 遺伝子の過剰発現株の

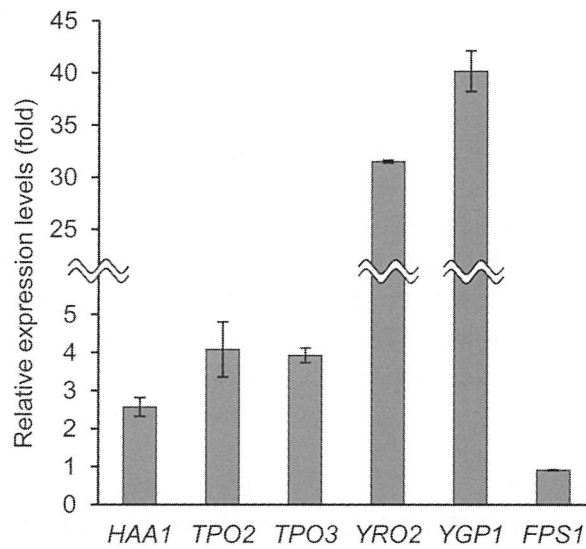
構築を行った。過剰発現に際しては、染色体上の *HAA1* 遺伝子のプロモーター領域を構成的発現プロモーターである *TDH3* プロモーターで置換した。また、*HAA1* 遺伝子及び *Haa1* に発現制御を受ける遺伝子群の発現上昇も検出された (Fig. 2)。得られた株の酢酸耐性をスポット法で調べたところ、著しい酢酸耐性の向上が観察された (Fig. 3)。

#### バイオエタノール用産業酵母における *HAA1* 遺伝子過剰発現株の構築

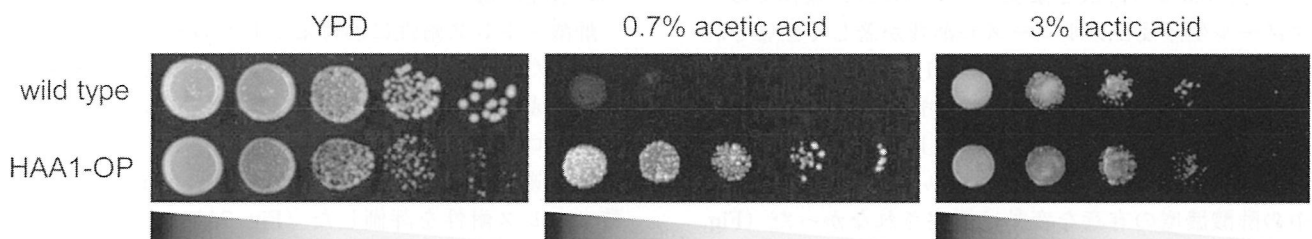
実験室酵母において、*HAA1* 遺伝子の過剰発現が有効であったことから、産業バイオエタノール用 *S. cerevisiae* ER 株の遺伝的背景における *HAA1* 遺伝子過剰発現効果を評価した。まず、ER 株に由来する一倍体 ER-6C (*MAT a*) 及び ER-3a (*MAT a*) において、

**Table 1** Transcriptional changes of *HAA1*-regulated genes in *S. cerevisiae* NBRC 0224 and *S. cerevisiae* ATCC 38555.

Gene name	Description	Transcriptional changes (fold)	
		NBRC 0224	ATCC 38555
<i>HAA1</i>	Transcriptional activator involved in adaptation to weak acid stress	2.1	3.6
<i>INH1</i>	Protein that inhibits ATP hydrolysis by the F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP synthase	1.0	2.0
<i>TPO2</i>	Polyamine transport protein specific for spermine	0.5	1.6
<i>AQR1</i>	Plasma membrane multidrug transporter	0.9	1.5
<i>PFK27</i>	6-phosphofructo-2-kinase	1.2	1.8
<i>STF2</i>	Protein involved in regulation of the mitochondrial F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP synthase	1.0	1.5



**Fig. 2** Expression analysis of *HAA1* and Haa1-regulated genes in the HAA1-OP strain.



**Fig. 3** Growth phenotypes of the wild-type and HAA1-OP strains under conditions of acetic acid stress.

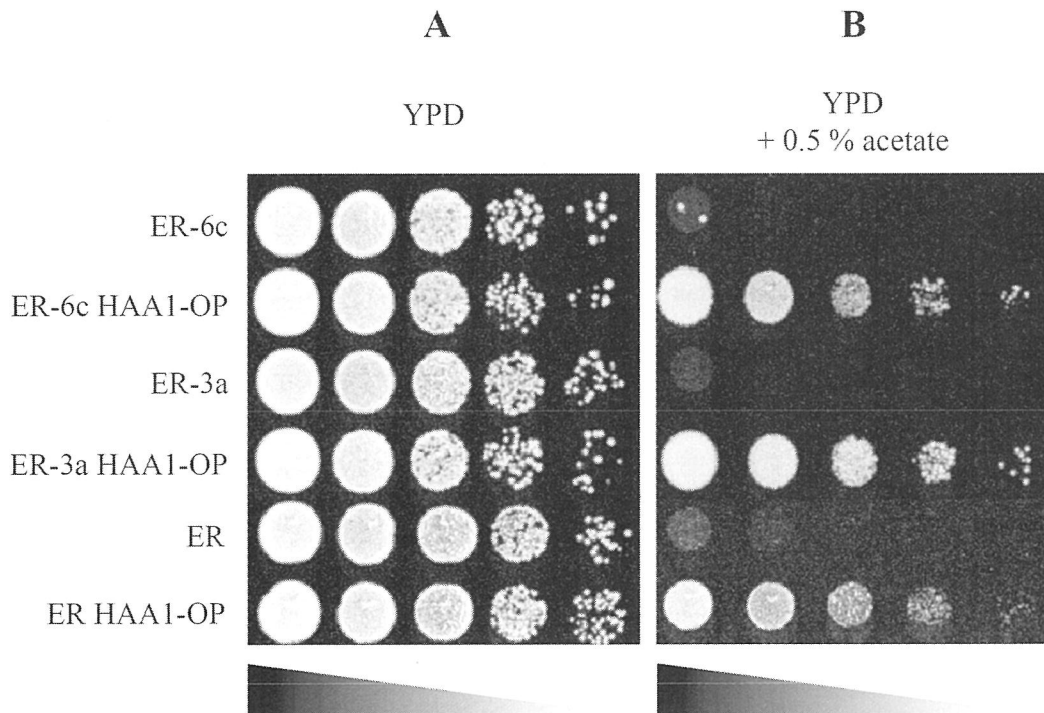


Fig. 4 Acetate stress tolerance test of *HAA1*-overexpressing strains derived from strain ER.

*TDH3* プロモーターの制御下において *HAA1* 遺伝子を過剰発現させたところ、各々の親株と比較して、高い酢酸ストレス耐性を示した (Fig. 4). さらに、各一倍体過剰発現株を交雑し、二倍体の過剰発現株 ER-HAA1OP を得た. ER-HAA1OP は親株と比較して、著しく高い酢酸ストレス耐性を示した (Fig. 4). また、プロピオン酸及び乳酸に対しても高いストレス耐性を示した.

#### *HAA1* 遺伝子過剰発現株の発酵特性評価

YPD 培地を用いて、ER-HAA1OP 株の発酵特性を親株と比較した (Fig. 5). 酢酸を添加してない場合には、ER-HAA1OP 株のエタノール生産量、グルコース消費量は、親株と同等であった (Fig. 5A 及び B).

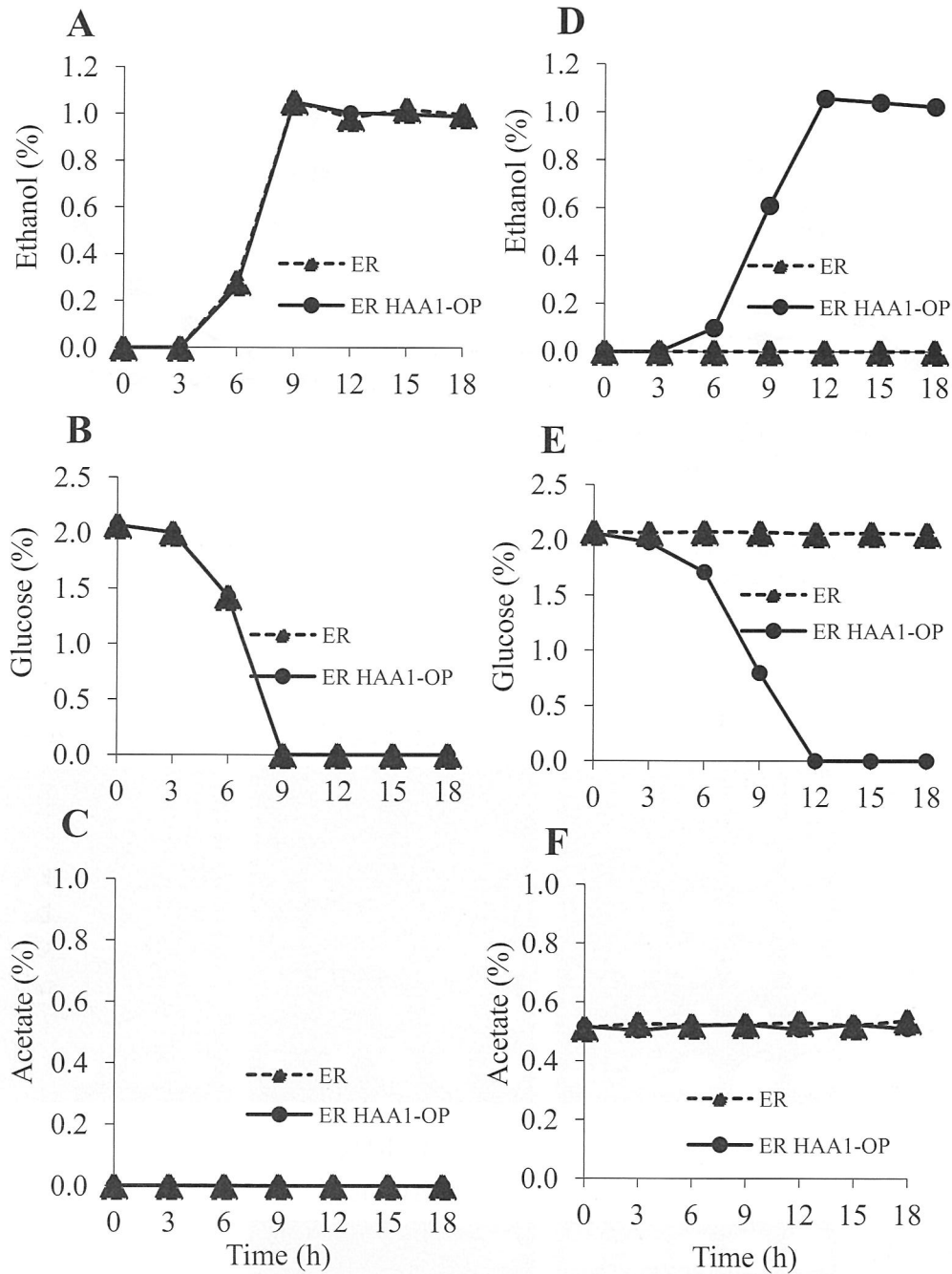
一方、0.5% の酢酸を添加した場合には、親株ではエタノール生産及びグルコースの消費が著しく阻害されていた. それに対して、ER-HAA1OP 株では、12時間後にはグルコースをほぼ完全に消費し、エタノールを生産することが明らかになった (Fig. 5D 及び E). また、ER-HAA1OP 株及び親株を用いた場合にも、培地中の酢酸濃度の有意な変動は観察されなかった (Fig. 5C 及び F).

#### *HAA1* 遺伝子過剰発現株を用いたサトウキビ糖蜜からのエタノール生産

サトウキビ糖蜜を未利用バイオマスのモデルとして捉え、ER-HAA1OP 株の有するエタノール生産性の評価を行った (Fig. 6). 酢酸無添加条件では、親株と ER-HAA1OP 株のエタノール生産速度や最終エタノール濃度に有意な差は観察されなかった (Fig. 6A). 0.5% の酢酸を添加した場合には、親株を用いた場合にはエタノール生産が観察されなかった. ER-HAA1OP 株では、酢酸無添加条件と比較すると、エタノール生産速度の低下は観察されるものの、エタノール生産がなされることが確認できた (Fig. 6B).

#### *S. cerevisiae* の酢酸ストレス耐性におけるトレハロースの機能評価

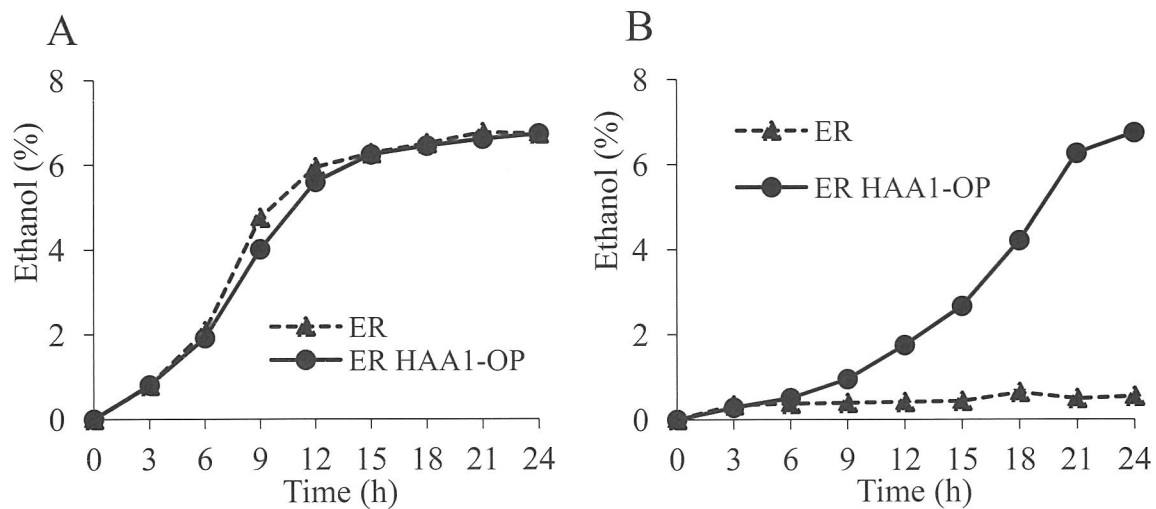
酢酸ストレス耐性におけるトレハロースの機能を解明するために、トレハロースが蓄積されないトレハロース合成酵素遺伝子破壊株 (*tps1Δ* 及び *tps2Δ*) 及び、トレハロースが高度に蓄積するトレハロース分解酵素遺伝子破壊株 (*nth1Δ*, *nth2Δ* 及び *nth1Δ nth2Δ*) の酢酸ストレス耐性を評価した (Fig. 7A). その結果、トレハロース蓄積の欠損に伴い、*tps1Δ* 及び *tps2Δ* は酢酸ストレスに感受性を示した. 一方、トレハロース蓄



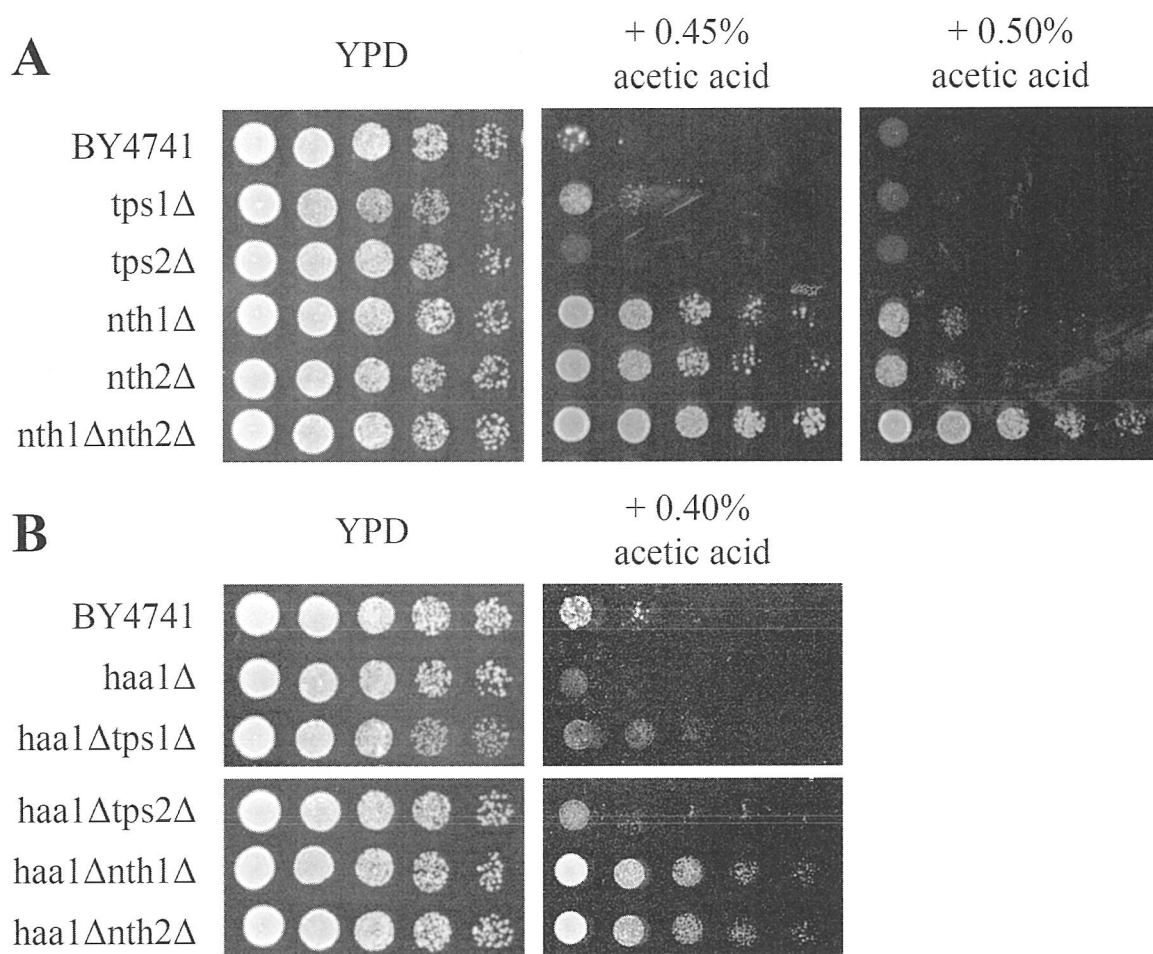
**Fig. 5** Ethanol production, glucose consumption and acetate concentration of *S. cerevisiae* ER and ER HAA1-OP in YPD medium (A, B and C), and YPD medium containing 0.5% acetate (D, E and F).

積量の上昇に伴い、野生株と比較して、*nth1Δ*, *nth2Δ* 及び *nth1Δ nth2Δ* は酢酸ストレス耐性を示した (Fig. 7A). 特に、*nth1Δ nth2Δ* は、高度な酢酸ストレス耐性を示した。以上の結果から、トレハロースの細胞内蓄積は、酢酸ストレスに対して保護効果を有することが示唆された。

また、Haa1 に依存する酢酸応答系との相関を調べるために、*HAA1* の欠損した遺伝的背景において、*TPS1*, *TPS2*, *NTH1* 及び *NTH2* 遺伝子の破壊を行い、酢酸ストレス耐性の評価を行った (Fig. 7B). その結果、*HAA1* と *TPS1* または *TPS2* の二重破壊株は、*HAA1* 単独破壊株と比較して、同等の酢酸ストレス感受性を



**Fig. 6** Ethanol production of *S. cerevisiae* ER and ER HAA1-OP in molasses medium (A) and molasses medium containing 0.5% acetate (B).



**Fig. 7** Organic acid stress tolerance of the mutants of trehalose metabolisms from a wild-type background (A) and the mutants of trehalose metabolisms from a *haa1* background (B).

示した。一方、*HAA1* と *NTH1* または *NTH2* の二重破壊株は、*HAA1* 単独破壊と比較して、高い酢酸ストレス耐性を示した。これからの結果から、*Haa1* 酢酸応答系の欠損による酢酸感受性をトレハロース蓄積により相補できることが示唆された。

## 考 察

本研究では、食品廃棄物や食品ロスからのバイオエタノール生産において、深刻な問題となり得る発酵プロセスへの雑菌汚染に対して、酢酸等の有機酸に対する耐性酵母を用いた汚染防御技術に関する研究を行った。有機酸は細菌の抑制効果を有するが、酵母の発酵能に対する阻害剤として機能する (Olsson & Hahn Hagerdal, 1996)。そこで、有機酸に対して高度な耐性を有する *S. cerevisiae* 株を構築することができれば、有機酸存在下で細菌の生育を抑制しながらも、エタノール発酵を進行させることが可能になると考えた。本研究では、有機酸の中で、酢酸に特に注目した。第二世代のバイオエタノール生産の主要な原料に想定されているリグノセルロースの前処理・糖化工程において、アセチル化されたヘミセルロースが遊離し、発酵阻害が生じることが知られている (Olsson & Hahn Hagerdal, 1996)。したがって、酢酸ストレス耐性酵母株は、リグノセルロースからのバイオエタノール製造への応用の可能性も高い。また、酢酸は、エタノールの酸化により得られるため、比較的安価に調製できる可能性を考えた。

また、本研究では、酢酸ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の構築に焦点を絞った。ノンコンベンショナル酵母の中には、*C. glabrata* 等の高度な有機酸耐性を有する酵母が存在する (Watanabe *et al.*, 2008)。しかし、バイオエタノール製造プロセスで生じる副産物の飼料などへの再利用を想定した場合に、豊富な食経験を有し安全性が確立されている酵母株として、*S. cerevisiae* の応用の可能性が高いと考えたからである。

研究室保存 *S. cerevisiae* 株 500 株を対象に、酢酸ストレス耐性の評価を行った。その結果、*S. cerevisiae* ATCC 38555 株が見出された。本菌株は、腐敗した缶詰から単離されたことが報告されている (Put & De Jong, 1982)。DNA マイクロアレイを用いた発現解析においては、コントロール菌株として、産業用バイオエタノール製造用株である *S. cerevisiae* NBRC 0224 株を用いた。*S. cerevisiae* において、酢酸ストレス反応における中心的な役割を果たす転写活性化因子をコードする *HAA1* 遺伝子及びおよび *Haa1* に制御される遺伝子群の高度な発現上昇が観察された (Haitani *et al.*,

2012)。これらの結果から、*S. cerevisiae* ATCC 38555 株の酢酸ストレス耐性の要因の一つであることが推測された。その他、鉄の細胞内輸送に関連する転写因子をコードする *AFT1* 及び高浸透圧応答の調節に関与する *HOG1* の高発現も観察された。*Aft1* により調節される鉄イオンのホメオスタシスの維持が酢酸ストレス耐性へ寄与している可能性も考えられる。*Hog1* は酢酸チャンネルである *Fps1* の誘導的分解に関与していることが報告されている (Piper, 2011)。

S288C 株の遺伝的背景を有する実験室酵母株において、*HAA1* 遺伝子を過剰発現させたところ、顕著な酢酸ストレス耐性の向上が観察された (Tanaka *et al.*, 2012)。この理由として、*Fps1* タンパク質の分解により、酢酸の細胞内流入が抑制された可能性が考えられる。また、酢酸の細胞への排出ポンプは同定されていないが、排出ポンプの機能が促進された可能性も考えられる。*Tpo2* 及び *Tpo3* はポリアミンの排出ポンプとして同定されているが (Piper, 2011)、酢酸の排出にも寄与している可能性も考えられる。

実験室酵母を用いて取得された知見を基盤として、バイオエタノール生産用酵母 ER 株を用いた酢酸ストレス耐性向上に関する研究を行った。ER 株は、ブラジルにおいて、サトウキビからのバイオエタノール生産に利用されている株である (Inaba *et al.*, 2013)。分子育種に先立って、ER 株から一倍体株及びそのウラシル要求性変異株を取得した (Inai *et al.*, 2013)。これらの株の提供を受けて、ER 株の *HAA1* 過剰発現株の構築を行った。バイオエタノールへの応用を考慮に入れて、2 倍体株 (ER-HAA1OP 株) を構築した。ER-HAA1OP 株においては、酢酸ストレス耐性に加えて、乳酸やプロピオン酸に対しても耐性を示した (Inaba *et al.*, 2013)。実験室の酵母の場合と同様な過剰発現株の構築手法を用いたが、*HAA1* 遺伝子自体の発現上昇レベルが ER 株の遺伝的背景において高いことによることが考えられた。

ER-HAA1OP 株の産業利用の可能性を評価するため、サトウキビ糖蜜をバイオマスモデルとして用いて、エタノール生産性を評価した。糖蜜は液体であるため特性評価に最適であると考えた。酢酸無添加条件において、ER-HAA1OP 株の発酵特性は親株と同等であり、*HAA1* 遺伝子の過剰発現による悪影響は観察されなかった (Inaba *et al.*, 2013)。酢酸添加条件では、無添加条件と比較して、発酵時間の遅延が観察された。しかし、本研究では用いた酢酸添加条件において、親株のエタノール生産能は著しく抑制されており、有意に ER-HAA1OP 株の酢酸ストレス耐性は向上していると判断できた。さらに、糖蜜を用いて、雑菌

汚染抑制試験を行ったが、抑制傾向は観察されたが、現在のところ、有意差を伴うデータは取得できていない。これは、市販の糖蜜には、ホルムアルデヒド等の保存料が添加されているケースが多く、これらの効果の影響があると考えている。

*S. cerevisiae* においては、2糖類の一種であるトレハロースが細胞保護において重要な役割を果たしていることが指摘されている (Shima & Takagi, 2009)。そこで、酢酸ストレス耐性に対するトレハロースの寄与について解析を行った。現在までに、トレハロース合成酵素遺伝子を破壊することにより細胞内トレハロース蓄積量が減少すること、及びトレハロース分解酵素遺伝子を破壊することにより細胞内トレハロース量が增大することが知られている (Shima & Takagi, 2009)。そこで、トレハロース合成酵素遺伝子及び分解酵素遺伝子破壊株の酢酸ストレス耐性を評価した。細胞内トレハロースレベルと相関して酢酸ストレス耐性が向上したことから、細胞内トレハロースが、酢酸ストレスから細胞を保護する機能がある可能性が示唆された (Yoshiyama *et al.*, 2014)。しかし、*S. cerevisiae* 細胞に酢酸ストレスを負荷した後の、トレハロース蓄積量の著しい増大は観察されなかった。これらの結果は、酢酸ストレス応答においては、最初に Haa1 依存の応答システムが機能するのではないかと考えられた (Yoshiyama *et al.*, 2014)。また、本稿では詳述しなかったが、細胞内グリセロールの蓄積も酢酸ストレス耐性に関与する可能性があると考え、検討を行っている。

以上の知見を受けて、Haa1 依存の酢酸応答システムとトレハロースの機能相関に関する解析を行った。すなわち、*HAA1* 遺伝子が破壊された遺伝的背景 (*haa1*) において、トレハロース合成酵素遺伝子及び分解酵素遺伝子破壊株を構築し、酢酸ストレス耐性を評価した。*NTH1* または *NTH2* と *HAA1* の二重破壊株では、野生株と比較して高い酢酸ストレス耐性を示した (Yoshiyama *et al.*, 2014)。これらのことから、*HAA1* 破壊による酢酸感受性は、トレハロース蓄積により相補されると考えることができる。これら2つの酢酸ストレス耐性に関与するシステムが独立して機能しているのか、さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究により、高度な酢酸ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の分子育種手法が構築できたと考えている。構築された産業株を用いて、食品廃棄物や食品ロスからのバイオエタノール生産プロセスの確立に向けて研究の展開をはかる。また、*S. cerevisiae* における酢酸ストレス応答機構の全容の解明に向けて、分子レベ

ル・細胞レベルでの解析を進めたい。

## 要 約

有機酸による発酵阻害の低減化及び有機酸を積極的に使用した細菌汚染抑制技術の構築を検討した。以前の研究において、*Lactobacillus* 乳酸菌を汚染細菌モデルとして用いた解析により、酢酸耐性酵母及び酢酸添加の併用により細菌汚染を有意に抑制できることを明らかにしている。

本研究では、有機酸ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の探索を行ったところ、酢酸耐性を有する *S. cerevisiae* ATCC 38555 株を見出した。DNA マイクロアレイを用いた発現解析により、ATCC 38555 株では酢酸応答に寄与する転写活性化因子をコードする *HAA1* の高度な発現上昇が観察された。代表的なバイオエタノール生産用酵母である Ethanol Red 株において構成的発現プロモーターで *HAA1* を過剰発現させた。その結果、Haa1 で発現誘導される下流遺伝子の発現上昇を伴った著しい酢酸耐性の向上が観察された。サトウキビ糖蜜をモデルバイオマスとして、エタノール発酵試験を行った。酢酸添加条件においては、野生型株の発酵能は著しく阻害されたが、*HAA1* 過剰発現株では高い発酵力が維持された。また、酢酸ストレス耐性にトレハロースが寄与する可能性を指摘した。また、トレハロース蓄積により、*HAA1* 破壊株の酢酸ストレス感受性を相補できることを示した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 原著論文

- 1) Haitani, Y., Tanaka, K., Yamamoto, M., Nakamura, T., Ando, A., Ogawa, J. & Shima, J. (2012). Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 114: 648–651.2.
- 2) Tanaka, K., Ishii, Y., Ogawa, J. & Shima, J. (2012). Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 8161–8163.
- 3) Inaba, T., Watanabe, D., Yoshiyama, Y., Tanaka, K., Ogawa, J., Takagi, H., Shimoi, H. & Shima, J. (2013). An organic acid-tolerant *HAA1*-overexpression mutant of an industrial bioethanol strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express* **3**: 74.
- 4) Inai, T., Watanabe, D., Zhou, Y., Fukada, R., Akao, T., Shima, J., Takagi, H. & Shimoi, H. (2013). Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*



strain PE-2. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 591–594.

- 5) Yoshiyama, Y., Tanaka, K., Yoshiyama, K., Hibi, M., Ogawa, J. & Shima, J. (2014). Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *J. Biosci. Bioeng.* (in press). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.021.

#### 総説

- 1) 島 純, 安藤聡, 中村敏英. (2011). 環境ストレス耐性に着目したバイオエタノール生産酵母開発の試み *日本生物工学会誌* 89: 536–538.
- 2) 島 純, 田中晃一, 中村敏英. (2014). 有機酸ストレス耐性酵母の探索・育種とバイオプロセスへの応用 *化学と生物* 52: 251–352.

#### 受賞

- 1) 田中晃一, 灰谷豊, 吉山洋子, 山本まみ, 中村敏英, 安藤聡, 小川順, 島 純 産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵母の同定と耐性メカニズムの解析 *日本農芸化学会2013年度大会 トピックス賞*
- 2) 田中晃一, 小川順, 島 純 出芽酵母の酢酸耐性はHaa1依存的な細胞内グリセロールの蓄積により増強される *2014年度 日本農芸化学会2014年度大会 トピックス賞*

#### 保存機関に寄託した微生物株

該当なし.

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します。

#### 文 献

- Antoni, D., Zverlov, V.V. & Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 23–35.
- Beckner, M., Ivey, M.L. & Phister, T.G. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letts. Appl. Microbiol.* **53**: 387–394.
- Haitani, Y., Tanaka, K., Yamamoto, M., Nakamura, T., Ando, A., Ogawa, J. & Shima, J. (2012). Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **114**: 648–651.
- Hasegawa, S., Ogata, T., Tanaka, K., Ando, A., Takagi, H. & Shima, J. (2012). Overexpression of vacuolar H-ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates under high-gravity fermentation. *J. Inst. Brewing* **118**: 179–185.
- Inaba, T., Watanabe, D., Yoshiyama, Y., Tanaka, K., Ogawa, J., Takagi, H., Shimoi, H. & Shima, J. (2013). An organic acid-tolerant *HAA1*-overexpression mutant of an industrial bioethanol strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express* **3**: 74.
- Inai, T., Watanabe, D., Zhou, Y., Fukada, R., Akao, T., Shima, J., Takagi, H. & Shimoi, H. (2013). Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *J. Biosci. Bioeng.* **116**: 591–594.
- Olsson, L. & Hahn-Hagerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enz. Microbiol. Technol.* **18**: 312–331.
- Piper, P.W. (2011). Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Adv. Appl. Microbiol.* **77**: 97–113.
- Put, H.M. & De Jong, J. (1982). The heat resistance of ascospores of four *Saccharomyces* spp. isolated from spoiled heat-processed soft drinks and fruit products. *J. Appl. Bacteriol.* **52**: 235–243.
- Saithong, P., Nakamura, T. & Shima, J. (2009). Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *J. Biosci. Bioeng.* **108**: 216–219.
- Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. & Takano, H. (1999). Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2841–2846.
- Shima, J. & Takagi, H. (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **53**: 155–164.
- Skinner, K.A. & Leathers, T.D. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 401–408.
- Tanaka, K., Ishii, Y., Ogawa, J. & Shima, J. (2012). Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 8161–8163.
- Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., J., O. & Shima, J. (2012). Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus* **1**: 27.
- Watanabe, I., Nakamura, T. & Shima, J. (2008). A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 1117–1122.
- Yoshiyama, Y., Tanaka, K., Yoshiyama, K., Hibi, M., Ogawa, J. & Shima, J. (2014). Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *J. Biosci. Bioeng.* (in press). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.021.

## ノンコンベンショナル酵母の機能探索と 油脂等の有用物質生産への応用

島 純, 田中晃一, 安藤晃規<sup>1)</sup>, 小川 順<sup>2)</sup>

京都大学微生物科学寄附研究部門  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Characterization of non-conventional yeasts and their application to biofuel production

Jun Shima, Koichi Tanaka, Akinori Ando<sup>1)</sup>, Jun Ogawa<sup>2)</sup>

Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University  
Kitashirakawa Oiwake-Cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Biofuels including bioethanol and biodiesel have received increasing attention as a result of globally rising crude oil prices, increasing carbon dioxide emissions, and growing expectations that food wastes and food losses will be utilized.

Considering the cost-effectiveness of bioethanol production, there is a need for a yeast strain which can convert glucose and xylose into ethanol at elevated temperatures. We succeeded in isolating a yeast strain, designated strain ATY839, which was capable of ethanolic fermentation at temperatures above those previously reported for yeasts able to ferment both glucose and xylose. Strain ATY839 was capable of producing a substantial amount of ethanol at up to 37°C from 2% glucose or 2% xylose.

Biolipids produced by oleaginous yeasts have been confirmed to be among the most effective raw materials for biodiesel production. The advantages of lipid production by oleaginous yeast include the potential to produce lipids from food waste matter containing various types of polysaccharides, such as starch and cellulose. Because, in general, food wastes contain large amounts of starch, we are focusing on biolipid production from starch through consolidated bioprocessing (CBP) using oleaginous yeasts. A CBP protocol for producing lipids in a single step without the use of amylolytic enzymes from starchy materials would have the advantage of being very cost-effective, since it would eliminate the requirements for enzyme addition, long reaction time, and electricity for heating. *Cryptococcus terricola* could be used for fuel production through consolidated bioprocessing. *C. terricola* JCM 24523 exhibited the highest lipid content of 61.96% on medium with 5% starch on day 10. Fatty acid methyl ester analysis showed that this strain produced high proportions of C16 and C18 fatty acids when grown on starch, which are ideal for use in biodiesel. Considering the yield and cost, lipids derived from starch using *C. terricola* would be a promising alternative source for biodiesel production.

Key words: yeast, *Cryptococcus*, bioethanol, biolipid

### 緒 言

Kurtzman らの 'The YEASTS 第5版' には, 149属 1,500種あまりの酵母種が記載されている (Kurtzman *et al.*, 2010). 子囊菌酵母に加えて, 極めて多様な代謝系を有する担子菌酵母も多く含まれている. ゲノム情報が蓄積され分子細胞生物学的手法が確立されている *Saccharomyces cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe*

E-mail: shima@agr.ryukoku.ac.jp, ktanaka@kais.kyoto-u.ac.jp,  
aando@kais.kyoto-u.ac.jp, ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

1) 現 京都大学学際融合教育推進センター

2) 現 京都大学大学院農学研究科

共同研究者: 谷村あゆみ (京都大学微生物科学寄附研究部門), 高島昌子 (理化学研究所), 杉田隆 (明治薬科大学), 中村敏英 (農研機構食品総合研究所), 櫻谷英治 (京都大学農学研究科)

等に対して, 本稿では, その他の酵母種をノンコンベンショナル酵母と称する. ノンコンベンショナル酵母には, 高度な環境ストレス耐性を有する株が含まれるとともに, 多様な炭素源の資化性及び代謝産物の生成能を有している株が含まれる (Kurtzman *et al.*, 2010). また, 代表的な酵母である *Saccharomyces cerevisiae* を例にみると, 高等生物のモデル細胞としても使用される実験室酵母と発酵・醸造に用いられる産業酵母は, 著しく異なる特性を有している (Shima & Takagi, 2009). また, 今後, 見出されるであろう新たな酵母種も含めて, 酵母の持つ生物学的多様性を踏まえると, その機能性や有用性には計り知れないポテンシャルが存在していると考えられる. 発酵食品等の生産における *S. cerevisiae* の重要性は確固たるものと考えられるが, 食糧廃棄物の有効利用やバイオリファイナリーにおいては, ノンコンベンショナル酵母の機能利用も重要な視点であると考えられる.

バイオマスを再生可能なクリーンエネルギーへ効率的に変換し利用する手法の高度化は, 地球温暖化防止等の観点から人類全体の将来に関わる世界的に最も重要な研究課題の1つである (Balat, 2011; Binod *et al.*, 2010). 米国やブラジルでは, トウモロコシやサトウキビ等の変換プロセスが比較的簡易な生物資源を大量に用いたバイオエタノール等のクリーンエネルギーの生産が推進されている. また, ヨーロッパ諸国では, ナタネを原料としたバイオディーゼルの利用が推進されている. しかし, 食料不足にある国際情勢との関連から, 食料競合型のバイオ燃料生産からの脱却を迫られており, 代替する安価なバイオマス変換技術の高度化が望まれている. しかしながら, 製造コスト, エネルギー収支, 食料との競合などの問題からバイオ燃料の製造・利用は進んでいない現状にあり, このような背景から, 農作物残渣等バイオマスからの一気通貫型の新規なバイオ燃料生産技術の開発に向けて, 本研究を行った.

セルロースなどから派生するグルコース等の六炭糖を用いたエタノール発酵には *S. cerevisiae* がおもに使用されている (Binod *et al.*, 2010). しかし, キシランの分解により生じるキシロースなどの五炭糖に関しては, *S. cerevisiae* が発酵能を持たないことから, *Scheffersomyces stipitis* (以前, *Pichia stipitis* に分類) などの酵母の使用が検討されている (Jeffries & Jin, 2004). また, 一般に五炭糖発酵性酵母は環境ストレス耐性のレベルが低いことから, *S. cerevisiae* をプラットフォームとして, *S. stipitis* のキシロース代謝酵素遺伝子の導入による分子育種手法も用いられている (Kuhad *et al.*, 2011). しかしながら, 五炭糖からのエ

タノール発酵に最適化された酵母株には, さらなる改良が必要であると考えられる.

一方, バイオディーゼルに関しては, ナタネ等の油糧植物をバイオマス資源として生産されるケースが多い. しかし, ノンコンベンショナル酵母の中には, 高度な油脂蓄積能を有する酵母 (油糧酵母) の存在が示されており, 未利用バイオマス等からの高効率な油脂生産技術が期待されている. また, 微細藻による油脂やアルカンの生産にも強い興味を持たれている. 本研究では, 主に担子菌酵母による油脂の生産に着目した. 担子菌酵母は, デンプン, キシラン等のバイオマス由来の多糖類の資化性を有しており, バイオ一貫プロセス (CBP) による油脂生産が可能になることが想定されたためである. また, 微細藻に比較して, 時間あたりの生産性が高いことも油脂生産において有利な点であると考えられる.

最近, 高島らは, 西表島及び利尻島から酵母の収集を行い, その種の多様性を報告した. また, 収集された酵母の過半数が担子菌酵母であることを示した (Takashima *et al.*, 2012). 種の多様性に伴い, 有用物質生産能などの機能性も多様であることを想定して, 高島らの収集した酵母を探索源として, 油脂生産酵母の探索を行った. さらに, 油糧酵母の機能開拓の技術基盤とすべく, 油糧微生物として研究が進展しており分子生物学的手法が確立されている糸状菌 *Mortierella alpin* をモデルとした分子育種に関する研究にも取り組んだ (Sakuradani *et al.*, 2013).

## 材料及び実験方法

### 菌株

環境ストレス耐性を有するキシロース発酵性酵母の探索にあたっては, 自然界から単離した酵母株を探索源とした. 京都大学構内において, 複数回のサンプリングを行った. 土壌, 花卉, 樹皮等を, キシロースを炭素源とする SX 培地 (3% キシロース, 0.67% yeast nitrogen base without amino acid) を用いて集積培養を行い, SX 寒天培地 (3% キシロース, 0.67% yeast nitrogen base without amino acid) でキシロース発酵性酵母を選択的に分離した.

油脂生産性酵母の探索にあたっては, 高島らが西表島および利尻島から収集した酵母を探索源とした (Takashima *et al.*, 2012).

また, 油糧微生物の分子育種基盤とするために, *Mortierella alpina* IS 4 株 (Sakuradani *et al.*, 2013) を用いて分子育種を行った.

### 高温耐性エタノール生産性酵母の選抜

分離した菌株（約550株）は、SG培地（2%グルコース、0.67% yeast nitrogen base without amino acid）およびSX培地を用い、35℃、37℃、38℃および39℃で48時間、120rpmで振とう培養を行い、培地中のエタノール濃度を分析した。

### 糖およびエタノール濃度の測定

糖およびエタノール濃度は、高速液体クロマトグラフィー（Prominence series, Shimadzu）で、発酵モニタリングカラム（Bio-Rad Laboratories）を用いて測定した。各濃度は、外標準から得た検量線から決定した。

### 菌株の同定

選抜した酵母について、Gen とるくん™（酵母用）（タカラバイオ）を用いてゲノムDNAを抽出し、PCRによりDNAを増幅した。PCR産物は、精製及びシーケンス反応を行ったのちシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた26S rDNAの塩基配列を、BLASTのデータベースで相同性を検索することで、酵母の同定を行った。同時に、アピCオクサノグラム（BioMerieux）により、糖の資化性評価を行った。

### 稲わらを用いた同時糖化発酵

稲わら（コシヒカリ）の前処理には、アルカリ法（Park *et al.*, 2010）を用いた。稲わら濃度は、10%とした。稲わら前処理液は、セルラーゼ（Celluclast 1.5L, Novozyme 188, Ultraflo L; いずれも Novozymes Japan）を添加し、50℃で2時間、部分糖化をしたのち、酵母を添加し、37℃で72時間、150rpmで同時糖化発酵を行った。同時糖化発酵は、セルロース等のバイオマスを酵素糖化を行いながら、発酵を行う手法である（Tanimura *et al.*, 2012）。*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0224, *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063, *Scheffersomyces shehatae* ATCC 22984 の3株をコントロールとした。

### 高生産性を有する油脂蓄積酵母の探索

スクリーニングは2段階で行った。1次スクリーニングでは、酵母をSD培地（0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulphate and amino acids, 0.5% 硫酸アンモニウム, 3% グルコース）にて30℃で3日間培養し、菌体内の脂肪酸量を測定した。2次スクリーニングでは、SS2培地（3% グルコース, 0.5% 硫酸アンモニウム, 0.05% 硫酸マグネシウム, 0.01% 塩化ナ

トリウム, 0.01% 塩化カルシウム, 0.01% 酵母エキス）にて27℃で4日間培養し、菌体内の脂肪酸量を測定した。

2次スクリーニングから選抜した菌株は、SS2培地にて27℃で4日間培養し、各日、菌体内の脂肪酸量を測定した。*Lipomyces starkeyi* NBRC 10381 および *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559 をコントロール株として用いた。

### 油脂の抽出と測定

培養液3mLを15,000rpmで5分遠心し、菌体を得た。菌体を水で2回洗浄したのち、凍結乾燥を行い秤量することで、乾燥菌体重量を決定した。メチルエステル化は、市原らの手法を用いた（Ichihara & Fukubayashi, 2010）。得られた脂肪酸メチルエステルは、ガスクロマトグラフィー（GC-2010 Plus; Shimadzu）で測定した。

### デンブン資化性油脂高蓄積酵母の探索

スクリーニングは2段階で行った。1次スクリーニングでは、酵母を10%デンブン寒天培地（0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids, 0.5% 硫酸アンモニウム, 10% 可溶性デンブン）にて25℃で6日間培養した。生育した菌体をループでかき取り、菌体内の脂肪酸量を測定した。2次スクリーニングでは、5%デンブン培地（0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids, 0.5% 硫酸アンモニウム, 5% 可溶性デンブン）にて27℃で6日間培養し、菌体内の脂肪酸量を測定した。

2次スクリーニングから選抜した菌株は、5%デンブン培地および10%デンブン培地（0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids, 0.5% 硫酸アンモニウム, 10% 可溶性デンブン）にて27℃で10日間培養した。1, 2, 4, 7および10日目で培養液を回収し、菌体内の脂肪酸量を測定した。*Lipomyces starkeyi* NBRC 10381 をコントロールとして用いた。

### *Mortierella alpina* IS-4 株における分子育種手法の解析

*M. alpina* における分子生物学的手法については、Andoらの方法に従った（Ando *et al.*, 2009）。ドラフトゲノムデータベースより、構成発現型プロモーター及び誘導発現プロモーターの配列を抽出した。プロモーター配列の下流に、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として連結し、プロモーター活性を測

定した. さらに, 有効と判断されたプロモーターの分子育種における有効性を評価した.

## 結 果

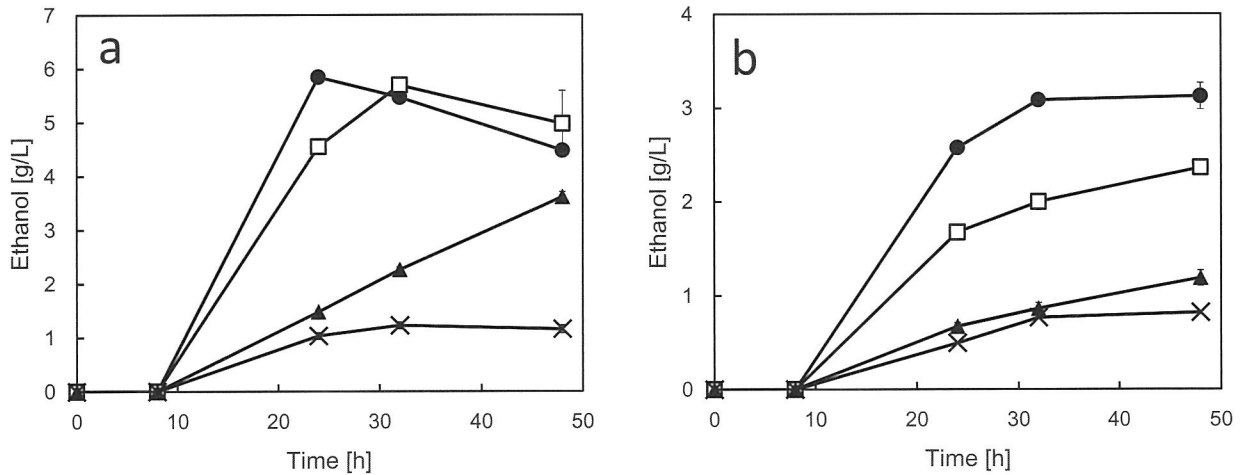
### 高温耐性を有するキシロース発酵性酵母の選抜

分離源から, キシロース資化性酵母72株を分離した. さらに, それらから, 高温耐性を有する酵母 ATY839 株を見出した. 26S rRNA の塩基配列解析および糖資化性試験の結果, ATY839 は, *Scheffersomyces*

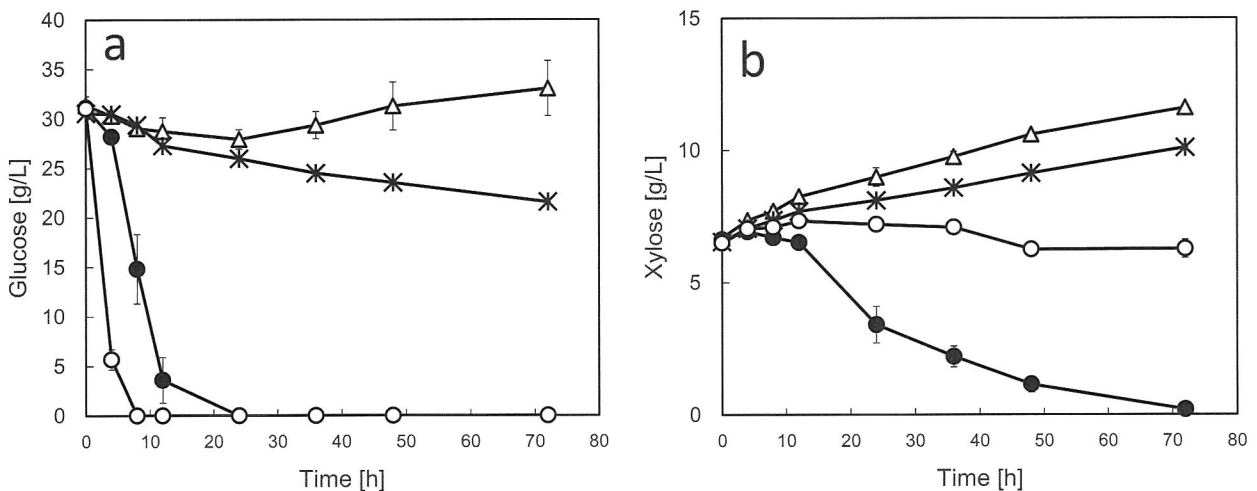
*shehatae* に属する株であることが示された.

### 耐性温度の検討

ATY839 株を 35°C, 37°C, 38°C 及び 39°C で培養した結果, SG 培地, SX 培地どちらの条件においても, 37°C がエタノール生産の上限温度であることが分かった (Fig. 1). 炭素源がグルコースのときは 35°C と 37°C で差がほとんどないにもかかわらず, キシロースのときは 37°C でのエタノール濃度は 35°C のときの 80% に減少していた. このことから, 炭素源の種類によって耐



**Fig. 1** Time course analyses of ethanol formation in SG media (a), and SX media (b) using strain ATY839 at 35°C (filled circle), 37°C (open square), 38°C (filled triangle), and 39°C (cross). Data are mean  $\pm$  std. dev. (error bars) of three assays.



**Fig. 2** Time course analyses of glucose consumption (a), and xylose consumption (b), and in the SSF process of rice straw using *S. cerevisiae* NBRC 0224 (open circle), *S. stipitis* NBRC 10063 (asterisk), *C. shehatae* ATCC 22984 (open triangle), and strain ATY839 (filled circle) at 37°C. Data are mean  $\pm$  std. dev. (error bars) of three assays.



**Table 1** Characteristics of selected 12 oleaginous yeasts

JCM number	Species	Accession number	Source
JCM 24501	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	IPM33-18	Leaf, Iriomote Island
JCM 24502	<i>Cryptococcus</i> sp.	NIS002	Soil, Iriomote Island
JCM 24503	<i>Cryptococcus ramirezgomezianus</i>	NRS132	Soil, Rishiri Island
JCM 24504	<i>Cryptococcus podzoricus</i>	RSM13-3	Soil, Rishiri Island
JCM 24505	<i>Cryptococcus podzoricus</i>	NRS088	Soil, Rishiri Island
JCM 24506	<i>Cryptococcus</i> sp.	IS2-4	Soil, Iriomote Island
JCM 24507	<i>Cryptococcus</i> sp.	NIS004	Soil, Iriomote Island
JCM 24508	<i>Cryptococcus podzoricus</i>	RS051	Soil, Rishiri Island

油脂蓄積量の比較

得られた12株から、特に脂質生産性の高い3株、JCM 24502, JCM 24511, JCM 24512 を選抜した。選

抜した3株とコントロール2株を、SS2培地にて4日間培養した (Fig. 5)。その結果、JCM 24512 が最も高い脂質生産性と生育能を示した。JCM 24512 の最初の

Table 1 continued

JCM number	Species	Accession number	Source
JCM 24509	<i>Cryptococcus</i> sp.	ISM16-1	Soil, Iriomote Island
JCM 24510	<i>Cryptococcus podzoricus</i>	NRS037	Soil, Rishiri Island
JCM 24511	<i>Cryptococcus</i> sp.	NIS008	Soil, Iriomote Island
JCM 24512	<i>Cryptococcus musci</i>	RSM13-2	Soil, Rishiri Island
JCM 24513	<i>Rhodotorula</i> sp.	RS106	Soil, Rishiri Island

2日間の油脂生産性は特に優れており、1日あたり0.66 g/Lであった。この値は、既出のデータよりも高かった (Katre *et al.*, 2012)。このことから、JCM 24512 は、培養時間の短縮とそれに伴うコスト減に資することが示された。

#### デンプン資化性を有する油脂蓄積酵母のスクリーニング

Fig. 6 に示したスキームによる探索を行い、スクリーニングに供した1,200株のうち、85%がデンプン寒天培地上で生育した。そのうち43%は、検出可能な量の脂質を蓄積していた。デンプンから油脂を蓄積した酵母は全て担子菌系酵母に属していた。特に高い脂質生産性を有していた9株は、全て *Cryptococcus terricola* であった (Table 2)。

9株について、油脂含量を計算した結果、JCM 24523 が最も高い値となった (Fig. 7)。同じ *C. terricola* でも油脂含量に株ごとに大きな差が認められた。

#### 油脂蓄積量の比較

特に油脂含量の高い2株、JCM 24518 及び JCM 24523 について、油脂含量とデンプン濃度のタイムコースを調べた。選抜した2株とコントロールを、5%デンプン培地および10%デンプン培地にて10日間培養した (Fig. 8)。その結果、5%デンプン培地において、JCM 24518 と JCM 24523 が10日目それぞれ57.76%、61.96%の油脂含量を達成した。これらの値は、コントロールよりも18%高かった。全ての菌株で、10%デンプン培地の値よりも5%デンプン培地の



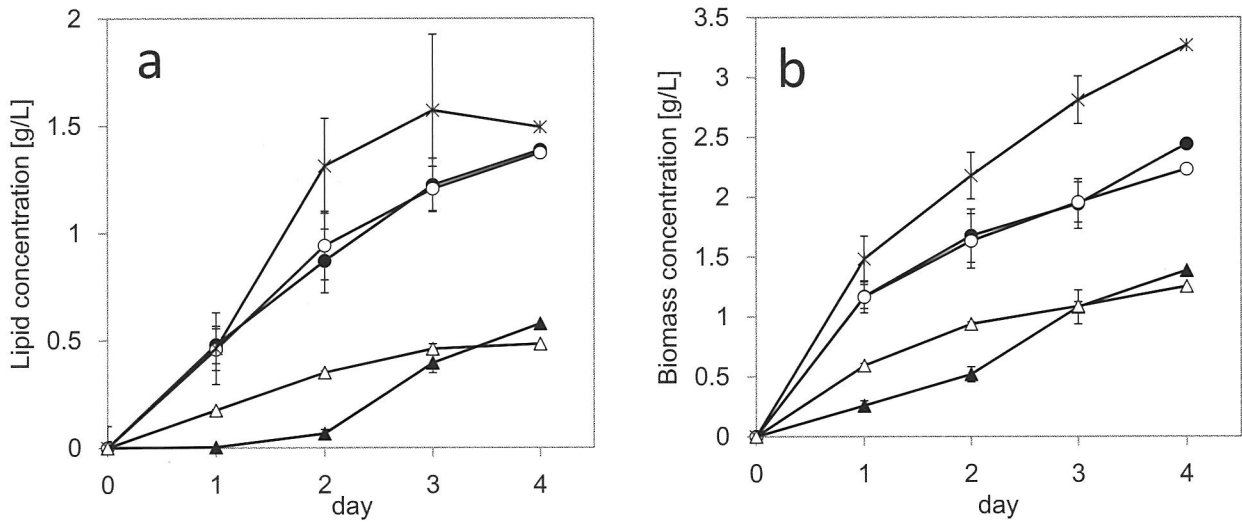


Fig. 5 Time course of lipid concentration (a) and biomass concentration (b) of JCM 24502 (filled circle), JCM 24511 (open circle), JCM 24512 (asterisk), *L. starkeyi* (filled triangle) and *R. toruloides* (open triangle). Data are mean  $\pm$  standard deviation (error bars) of three assays.

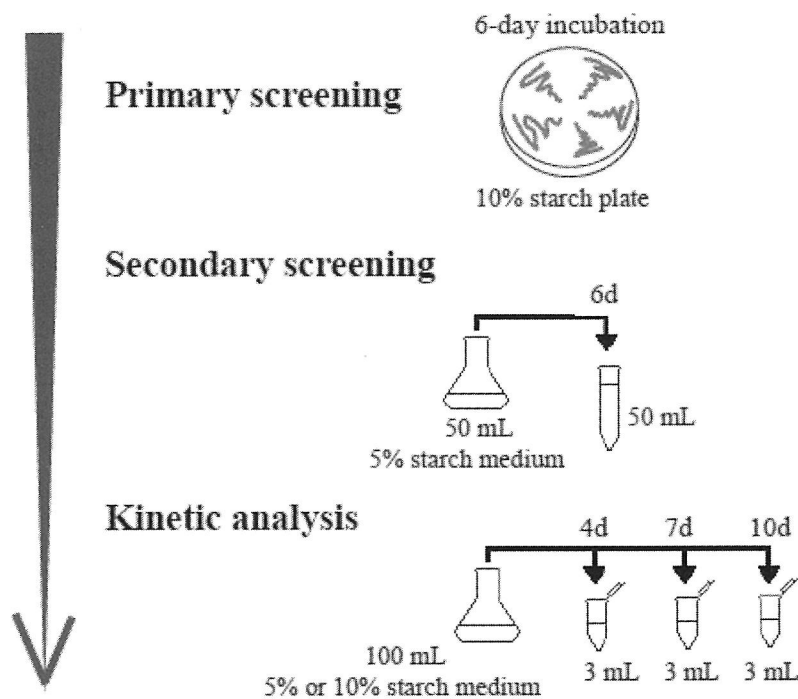


Fig. 6 Screening flow scheme.

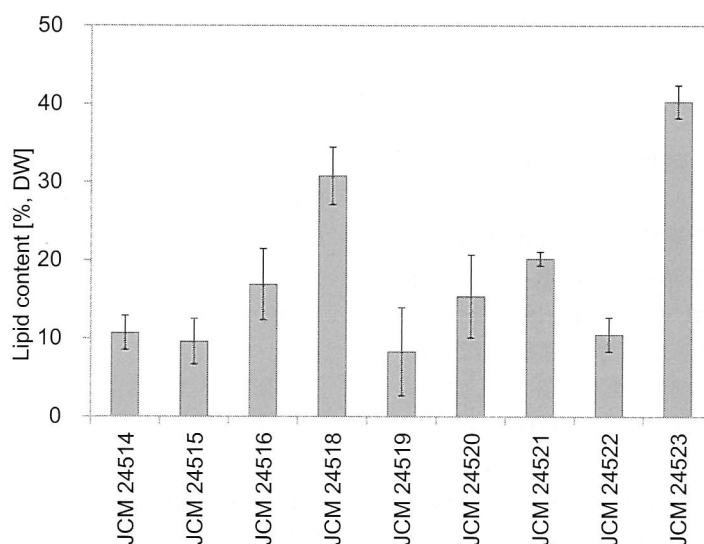
値の方が高かった。これは、デンプン濃度の上昇により培地の粘度も高くなり、アミラーゼの動きが妨げられたためと予想した。デンプンからの油脂蓄積は、Fig. 9a および b の形状から、3つの相に分けられると考えた。0 から 2 日目はデンプンの糖化が、2 から 4

日目は発酵が優勢となり、4 日目から 10 日目で油脂の蓄積が優位になると推定した。

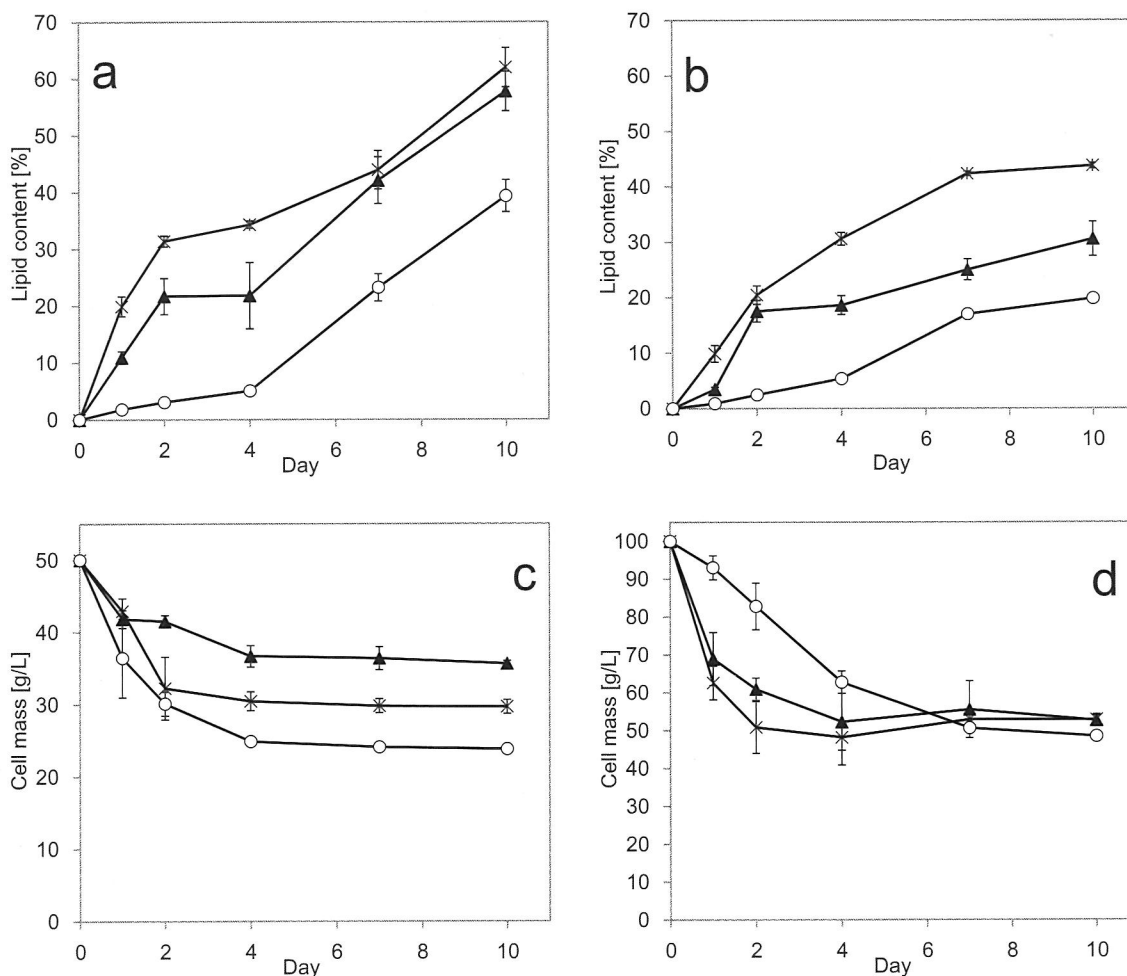
今回の研究により、*C. terricola* は、酵素糖化を経ずに、直接デンプンから油脂を蓄積することが明らかとなった。これにより、*C. terricola* が、製麺工場の廃液

**Table 2** The nine strains of *Cryptococcus terricola*

JCM number	Species	DDBJ accession no.	Source
JCM 24514	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726925	Soil, Rishiri Island
JCM 24515	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726924	Soil, Rishiri Island
JCM 24516	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726973	Soil, Rishiri Island
JCM 24518	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726896	Soil, Rishiri Island
JCM 24519	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726906	Soil, Rishiri Island
JCM 24520	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726970	Soil, Rishiri Island
JCM 24521	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB727265	Soil, Rishiri Island
JCM 24522	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726890	Soil, Rishiri Island
JCM 24523	<i>Cryptococcus terricola</i>	AB726902	Soil, Rishiri Island



**Fig. 7** Comparison of the lipid contents of nine selected *C. terricola* after a 6-day culture. The sole carbon source was 5% starch. Data are the means  $\pm$  standard deviation (error bars) of three assays.



**Fig. 8** Time courses of the lipid contents of JCM 24518 (filled triangle), JCM 24523 (asterisk), and *L. starkeyi* NBRC 10381 (open circle). The sole carbon source was 5% (a) or 10% (b) starch. Time courses of the starch consumption of these strains. The sole carbon source was 5% (c) or 10% (d) starch. Data are the means  $\pm$  standard deviation (error bars) of three assays.

等のデンプン系バイオマスの活用に貢献し得ることが示された。

油糧酵母の分子育種による機能開拓の技術基盤確立に向けて、油糧微生物の中で最も研究が進んでおり分子生物学的ツールが整備されている *M. alpina* を用いた分子育種手法の解析を行った。分子育種のためには、特定の遺伝子の発現増強が必要であるため、効率的な遺伝子発現に有用なプロモーターの探索を行った。その結果、誘導発現プロモーターとしては、ガラクトース誘導性の *GAL10* プロモーターが分子育種に有用であることが示された (図表は示してない)。また、構成発現プロモーターとしては、機能未知タンパク質をコードする *PP6* 及び *PP3* 遺伝子のプロモーターが遺伝子発現に有効なプロモーターであることが示

された。さらに、不飽和脂肪酸の蓄積量を増強するために有効な新規な不飽和化酵素をコードする遺伝子の単離に成功した (図表は示してない)。

## 考 察

本研究では、食品廃棄物や食品ロスを主なバイオマス資源として、ノンコンベンショナル酵母の機能開拓による有用物質生産に関する研究を行った。ノンコンベンショナル酵母は、*S. cerevisiae* や *Sc. pombe* などのコンベンショナル酵母と比較して、ユニークな特性を有している株が存在する。子囊菌に属するノンコンベンショナル酵母には、優れた環境ストレス耐性を有している株が含まれている (Tanimura *et al.*, 2012)。ま

た、担子菌酵母には、様々な炭素源の資化性を有しており、バイオマス利用の観点から魅力を有している (Tanimura *et al.*, 2014a).

食品廃棄物中には、リグノセルロースも含まれていることから、ヘミセルロースの分解により生じるキシロースの有効利用も重要な課題である。また、キシロース発酵性の酵母の多くが環境ストレス耐性のレベルが低いことが指摘されている。そこで、様々な環境ストレスに耐性を有するキシロース発酵性酵母の探索を行った。酸ストレスや化学ストレスに対して、高レベルの耐性を有する株は取得に至らなかった。しかし、代表的なキシロース資化性酵母である *S. stipitis* と比較して、高温に対して耐性を有する ATY839 株を取得することができた。同時糖化発酵 (SSF) プロセスによりエタノール生産を行う場合には、酵素の至適温度と酵母の発酵温度ができるだけ近く、高温であることが望まれている (Doran-Peterson *et al.*, 2009)。ATY839 株を用いることにより、SSF の温度を 7°C 程度上昇させることが可能となることを示した。今後、ATY839 株の育種を行いながら、高効率プロセスを開発していきたいと考えている。また、簡易的な分類により ATY839 株は、*S. shehatae* に属すると考えられた。しかし、タイプ株と比較して特性が異なっていることから、新種に分類される可能性も考慮に入れ、ドラフトゲノム情報 (未発表) を取得した。ゲノム情報の解析を進め、分類学的知見に関する知見を蓄積したいと考えている。また、ドラフトゲノム情報から ATY839 株の有する高温耐性に関する情報を抽出し、理解を深める予定である。

油脂蓄積性の酵母は、子囊菌酵母及び担子菌酵母のいずれから見出され、分類学的な距離と油脂蓄積性には密接な関連はないと考えられている。本研究における油脂蓄積性酵母の探索においても、様々な属の酵母が油脂蓄積性を有していることが明らかになった。一般に、子囊菌酵母と比較して、担子菌酵母は生育が遅いとの印象を与える。しかし、時間あたりの生産性を指標にした探索を行ったところ、代表的な油糧酵母で子囊菌に属する *Lipomyces* 属酵母等と比較して、*Cryptococcus* 属の担子菌酵母はより高い生産性を示すことが明らかになった。

担子菌酵母では、広範な炭素源の資化スペクトルを有している。そこで、食品廃棄物等に含まれるデンプン、キシラン、セルロース等からの CBP による油脂生産が可能な酵母株の探索を行った。その結果、糖化酵素の添加なしに、デンプンから高効率で油脂を生産することが可能な *C. terricola* を見出した。1,000 株の探索源からのスクリーニングであったが、興味深いこ

とに、このような特性を有する株は全て *C. terricola* に属する株であった。以上のことから、デンプンからの油脂生産における重要な種であることが強く示唆された。また、*Candida subhashii* JCM 30101 及び *Schefferomyces* sp. JCM 30102 についても、未利用バイオマスからの燃料生産に有効であることを見出し、Japan Collection of Microorganisms (JCM) に寄託した。

第二世代のバイオ燃料ではセルロースが主なバイオマス資源に設定されている。しかし、現在のところ、セルロースを単一炭素源とした場合には、効率よく油脂を蓄積する株は見出せていない。セロビオースを資化する株は多数見出されることから、外部からのセルロース分解酵素の添加もしくはセルラーゼ遺伝子等の導入による分子育種が必要であると推測された。

食品廃棄物や食品ロスからエネルギーを抽出し利用することは、トウモロコシやサトウキビ等を用いた第一世代バイオ燃料の生産の拡大より前に、取り組むべき課題であると筆者は考えている。食品の廃棄物や食品ロスは、多大なエネルギーや輸送コストをかけて生産されてきており、エネルギー収支のバランスを少しでも改善する必要があると考える。また、比較的利用しやすいデンプンや六炭糖も豊富にふくまれており、良質なバイオマス資源にも位置づけられる。廃棄物の分別、コストやエネルギー収支の問題など、乗り越えるべきハードルは多数存在しているのも事実であるが、栄養不足や飢餓に直面している国も存在しており、食の倫理といった観点からも食品廃棄物の有効利用に関する研究を続けたいと考えている。

## 要 約

担子菌酵母及び子囊菌酵母を含むノンコンベンショナル酵母では、炭素源の資化性、環境ストレス耐性、油脂等の有用物質生産能が極めて多様であり、食品廃棄物や食品ロスの資源化に有用である可能性を想定した。まず、食品廃棄物にも含まれるリグノセルロースから生じるキシロースを高温ストレス環境下でエタノールへ変換する酵母株の探索を行った。その結果、京都大学の構内から分離された ATY839 株を見出した。ATY839 株を用いた場合には、37°C において SSF プロセスによりエタノール生産が可能であった。ATY839 株は *S. shehatae* に属する株であることが示唆された。次いで、理化学研究所の高島らが収集した担子菌酵母を中心とする酵母ライブラリーの網羅的な特性評価を行った。特に、環境保全に寄与し得るバイオディーゼルへの変換が可能なバイオリピッド (油脂) に着目し

た。バイオリピッドの実生産に向けて高い生産性を有する酵母が必要とされていることから、生産性に着目した探索を行った。その結果、代表的な油糧酵母である *Lipomyces starkeyi* 等と比較して、*Cryptococcus musci* 等がより高度なりピッド生産性を有していることが明らかになった。また、担子菌酵母は多様な糖資化性を有していることから、食品廃棄物等の主要成分であるデンプンを直接資化しバイオリピッドが一貫生産できる可能性を検証した。その結果、*Cryptococcus terricola* に属する酵母が一貫プロセスによりデンプンからリピッドを効率的に生産可能であることを示した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 谷村あゆみ, 渡邊樹, 中村敏英, 小川順, 島純. 高温耐性を有するキシロース発酵性酵母の分離およびそのエタノール生産性の評価. 日本生物工学会第64回大会. 要旨集 p. 246, 神戸, 9月, 2012.
- 2) 谷村あゆみ, 高島昌子, 杉田隆, 櫻谷英治, 小川順, 島純. 西表島および利尻島酵母ライブラリーの機能探索: 油脂蓄積能の評価. 日本生物工学会第65回大会. 要旨集 p. 45, 広島, 9月, 2013.

### 原著論文

- 1) Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., J., O. & Shima, J. (2012). Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. SpringerPlus **1**: 27.
- 2) Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J. & Shima, J. (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. Bioresour. Technol. **153**: 230–235.
- 3) Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Ohkuma, M. & Shima, J. (2014). *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. Sci. Rep. **4**: 4776.
- 4) Okuda, T., Ando, A., Sakuradani, E., Kikukawa, H., Kamada, N., Ochiai, M., Shima J. & Ogawa, J. (2014). Selection and characterization of promoters based on genomic approach for the molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. Curr. Genet. (in press). DOI 10.1007/s00294-014-0423-4
- 5) Okuda, T., Ando, A., Sakuradani, E., Kikukawa, H., Kamada, N., Ochiai, M., Shima, J. & Ogawa, J. (2014). Characterization of galactose-dependent promoters from an oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. Curr. Genet. (in press). DOI 10.1007/s00294-014-0422-5
- 6) Kikukawa, H., Sakuradani, E., Kishino, S., Park, S.B., Ando, A., Shima, J., Ochiai, M., Shimizu, S. & Ogawa, J. (2013). Characterization of a trifunctional fatty acid

desaturase from oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 using a yeast expression system. J. Biosci. Bioeng. **116**: 672–676.

## 保存機関に寄託した微生物株

学名	菌株番号	寄託番号
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	AYY839	JCM 18690
<i>Candida subhashii</i>		JCM 30101
<i>Scheffersomyces</i> sp.		JCM 30102

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、寄付講座助成によりご支援頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します。

## 文 献

- Ando, A., Sakuradani, E., Horinaka, K., Ogawa, J. & Shimizu, S. (2009). Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. Curr. Genet. **55**: 349–356.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energ. Convers. Manage. **52**: 858–875.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K. & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresour. Technol. **101**: 4767–4774.
- Doran-Peterson, J., Jangid, A., Brandon, S.K., DeCrescenzo-Henriksen, E., Dien, B. & Ingram, L.O. (2009). Simultaneous saccharification and fermentation and partial saccharification and co-fermentation of lignocellulosic biomass for ethanol production. Methods Mol. Biol. **581**: 263–280.
- Ichihara, K. & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. J. Lipid Res. **51**: 635–640.
- Jeffries, T.W. & Jin, Y.S. (2004). Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. **63**: 495–509.
- Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S. & Ravikumar, A. (2012). Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. AMB Express **2**: 36.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Khata, Y.P., Singh, A. & Zhang, Y.H.P. (2011). Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renew. Sust. Energ. Rev. **15**: 4950–4962.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (2010). The yeasts: a taxonomic study. 5th ed, Elsevier, Amsterdam ; Oxford.
- Park, J.-y., Shiroma, R., Al-Haq, M.I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M. & Tokuyasu, K. (2010). A novel

- lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresour. Technol.* **101**: 6805–6811.
- Sakuradani, E., Ando, A., Shimizu, S. & Ogawa, J. (2013). Metabolic engineering for the production of polyunsaturated fatty acids by oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *J Biosci. Bioeng.* **116**: 417–422.
- Shima, J. & Takagi, H. (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **53**: 155–164.
- Takashima, M., Sugita, T., Van, B.H., Nakamura, M., Endoh, R. & Ohkuma, M. (2012). Taxonomic richness of yeasts in Japan within subtropical and cool temperate areas. *PLoS ONE* **7**: e50784.
- Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., J., O. & Shima, J. (2012). Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus* **1**: 27.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J., Ohkuma, M. & Shima, J. (2014a). *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Sci. Rep.* **4**: 4776.
- Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Sakuradani, E., Ogawa, J. & Shima, J. (2014b). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **153**: 230–235.

## 有機栄養液栽培に寄与する微生物群の解析とその応用

安藤晃規<sup>1)</sup>, 田中晃一, 島 純, 小川 順<sup>2)</sup>

京都大学微生物科学寄附研究部門  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

### Characterization of microbial consortia with high nitrification activity and its application for organic hydroponics

Akinori Ando<sup>1)</sup>, Koichi Tanaka, Jun Shima, Jun Ogawa<sup>2)</sup>

Research Division of Microbial Sciences, Kyoto University  
Kitashirakawa Oiwake-Cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Recently, an enriching method for soil microorganisms with high nitrifying activity by controlling the amounts of organic fertilizer and inoculums under moderate aeration conditions was established. The culture solution containing the enriched nitrifying microorganisms was usable as a hydroponic solution, and organic fertilizer could be directly added to it during vegetable cultivation. This novel and practical organic hydroponic culture method using microorganisms to degrade organic fertilizer in the hydroponic solution attracted some expectations as the one of promising technologies addressing global warming issues of environmental and food problems in the future. The organic hydroponics consists of following two processes i) nitrification process: constructing microbial ecosystem for degrading and nitrifying an organic fertilizer ii) cultivating process: culturing plants with maintaining the nitrifying microbial community. In this study, we screened soils as microbial sources with effective nitrifying ability and applied the culture of a selected microbial source for organic hydroponic cultures. We further investigated the relations between the transition of microbial consortia and nitrogen dynamics by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and chemical analyses. We found that microbial consortia became simpler than that of soil and converged with a certain number of kinds of bacteria through the nitrification process. Especially, nitrifying bacterial consortia including ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria showed reproducible transition well related to nitrogen dynamics. As a result, we revealed that enriched microbial consortia which were subcultured through nitrification process were useful for organic hydroponics as microbial inoculums and could be a subject of scientific analysis supporting reproducible and multi-scalable supply of excellent microbial consortia for organic hydroponics. These results showed the probability that we could design simple microbial consortia for organic hydroponics.

Key words: organic hydroponics, nitrification process, nitrogen circulation, autotrophic bacterium

## 緒 言

生態系における窒素循環の重要過程の一つは、土壌における有機態窒素の無機態窒素への変換過程であ

る。これまで、有機廃棄物中の含窒素有機化合物は土壌微生物の潜在力を頼りに無機化され利用されてきた。これら窒素変換微生物は、培養が困難であることや、複数の微生物が共同して代謝を行う複合系であることから、その理解は進んでいない。一方で、生態系における物質循環、特に炭素循環に大きな役割を果たしているのは植物であり、その生命活動を支える窒素循環を制御することにより健全な物質循環が見込める。したがって、未利用資源である有機廃棄物を循環的に活用し、植物の健全な生育を支援することが、今後、持続的的社会システムを構築する上で重要な技術と

E-mail: aando@kais.kyoto-u.ac.jp, ktanaka@kais.kyoto-u.ac.jp,  
shima@agr.ryukoku.ac.jp, ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

<sup>1)</sup> 現 京都大学学際融合教育推進センター

<sup>2)</sup> 現 京都大学大学院農学研究科

共同研究者：篠原信（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所）

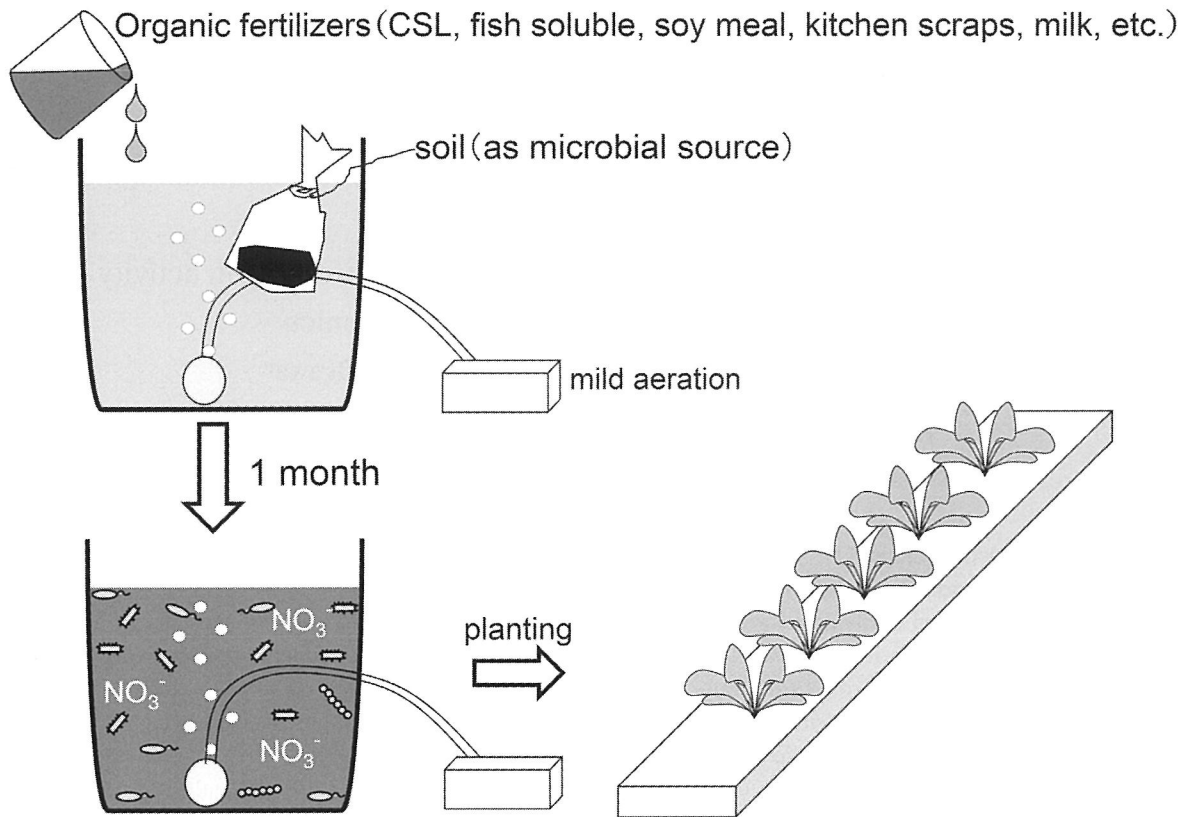


Fig. 1 Method of organic-hydroponics.

なろう。

水耕栽培系は、化学肥料を用いる無菌的な技術であり、栽培系への有機質肥料の直接導入は、有機物の腐敗による作物の根部障害の原因となっていた。我々は、共同研究者らとともに清酒製造における並行複発酵をヒントに、培養が困難とされる高い硝化活性を示す微生物群の集積法を開発するとともに、高硝化複合微生物群の活用により水耕栽培系への直接的な有機物の導入に成功した (Fig. 1) (Shinohara *et al.*, 2011; Kawamura-Aoyama *et al.*, 2014)。

植物が利用できる窒素形態は、主に硝酸であり、有機廃棄物から硝酸への変換、すなわち、硝化反応を担う微生物の解析と制御が重要となる。本研究では、高硝化複合微生物の機能を積極的に利用することで生態系窒素循環の効率化を図るべく、窒素変換微生物の網羅的解析を行った。

## 実験方法

有機養液栽培に有用な微生物源のスクリーニング

微生物源として、入手可能な培養土、肥料、堆肥な

ど約 100 種を用いた。1 L 容ビーカー中の蒸留水 (800 mL) に微生物源として各種土壌 (5 g/L) を不織布で包んだものを浸漬し、1 昼夜通気後 (800 mL/分, GEX, Osaka, Japan), 土壌を取り除いた。続いて、カツオの煮汁 (Cooperatives Yaizu Fisheries Processing Center, Shizuoka, Japan) を 0.5 g/L の濃度にて 5 日間添加し、アンモニア濃度、亜硝酸濃度、硝酸濃度の測定を毎日行った。アンモニア濃度測定は、Ammonium-Test (Merck, Frankfurt, Germany) を、亜硝酸濃度測定は Nitrite-Test (Merck, Frankfurt, Germany) を、硝酸濃度測定には Nitrate-Test (Merck, Frankfurt, Germany) をそれぞれ用いた。

## 微生物源と培地組成

先の検討で良好な硝化特性を示したバーク堆肥 (Sanyo Chip Kogyo, Yamaguchi, Japan) を微生物源として用いた。あらかじめ土壌 (5 g/L) を通気下一昼夜浸漬した水溶液にポリペプトン NF (1 g/L Nippon Seiyaku, Tokyo, Japan), 炭酸カルシウム (1 g/L) を添加後、試験管に各 20 mL ずつ分注し、28°C, 300 rpm にて振盪した。毎日、試験管 5 本分 (計 75 mL) 回収



し、アンモニア濃度、亜硝酸濃度、硝酸濃度を測定した。

#### ゲノムの抽出

試験管 5 本分の培養液を 8,000 rpm にて 10 分遠心し、菌体を回収して ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) にてゲノムを抽出した。

#### PCR 増幅と DGGE 解析

PCR には T-3000 Thermo cycler (Biometra, Göttingen, Germany) を用いた。プライマーは細菌 (Morimoto & Hoshino, 2008), 真核生物 (Morimoto & Hoshino, 2008), アンモニア酸化菌 (AOB) (Rotthauwe *et al.*, 1997), 亜硝酸酸化菌 (NOB) (Wertz *et al.*, 2008) を対象としたものを使用した (Table 1 参照)。GC-クランプが付加したものは DGGE 解析用に、GC-クランプが付加していないものは、簡易同定用に使用した。

細菌相解析には、抽出したゲノム 1  $\mu$ g を鋳型とし、16S rRNA の V6-V8 領域を対象に、984 F GC と 1378 R プライマー (Table 1 参照), KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用し、98°C で 10 秒, 55°C で 30 秒, 68°C で 1 分のプログラムにて 50 サイクル増幅した断片を用いた。AOB (*amoA1F* と *amoA1F GC*), NOB (F1370 F1 *nxrA* と F2842 F1 *nxrA GC*), 真核生物相 (NS1 と GCFung) 解析においては、抽出したゲノムを 1  $\mu$ g 用い、Ex taq HS (TaKaRa-Bio, Shiga, Japan) を使用し、以下の条件にて PCR を行った。AOB; 98°C で 10 秒, 52°C で 30 秒, 72°C で 1 分にて 50 サイクル。NOB; 94°C で 30 秒, 55°C で 45 秒, 72°C で 45 秒にて 50 サイクル。真核生物; 98°C で 10 秒, 50°C で 30 秒, 72°C で 1 分にて 50 サイクル。

DGGE 解析は、PCR 産物の増幅を確認後、High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics, Swiss) にて精製し、精製後の PCR 産物を、Dcode system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に供し、以下の条件にて DGGE 解析を行った (Morimoto & Hoshino, 2008)。細菌, AOB, NOB 解析は、ポリアクリルアミドゲル濃度 6%, 変性濃度勾配 50-70%, 泳動電圧 50 V, 泳動温度 58°C にて 18 時間行った。真核生物相の解析は、ポリアクリルアミドゲル濃度 7%, 変性濃度勾配 20-45%, 泳動電圧 50 V, 泳動温度 60°C にて 20 時間行った。泳動後の DGGE ゲルは、Ez Stain Silver (ATTO, Tokyo, Japan) にて銀染色を行い、セロファン間にゲルを挟み、ゲルドライキット (TEFCO, Japan) により乾燥後、写真用アルバム (FUJIFILM, Japan) に遮光保存した。マーカーは、細菌相解析には DGGE Marker III を、真核生物相解析には DGGE Marker IV (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いた。

#### DGGE バンドに対応する菌種の簡易同定

乾燥したゲルから各バンドを使い捨てメス (FETHER SAFETY RAZOR, Japan) にて切り出し、100  $\mu$ L の TE buffer を加え、滅菌バイオスマッシャー II (Sarstedt K.K., Japan) で破碎後、1  $\mu$ L を PCR のテンプレートとして用いた。PCR は、Ex taq HS (TaKaRa-Bio, Shiga, Japan) を使用し、細菌群の菌種同定には 984F と 1378R (*Tm*; 67°C), AOB 群の菌種同定には *amoA1F* と *amoA2IR* (*Tm*; 58°C), NOB 群の菌種同定には F1370 F1 *nxrA* と F2843 R2 *nxrA* (*Tm*; 58°C), 真核生物相の種同定には NS1 と Fung (*Tm*; 50°C) のプライマーを用い、各々のアニーリング温度にて、PCR 増幅を行った。PCR 増幅産物につき、CEQ 2000XL

Table 1 Primers for PCR-DGGE analysis and sequence analysis

Primer	Nucleotide sequence	<i>Tm</i> (°C)
984F	5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'	
984F GC	5'-CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGCGACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3'	55
1378R	5'-TTCTACTGGTGGT-3'	
<i>amoA1F</i>	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	
<i>amoA1F GC</i>	5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGGGGTTTCTACTGGTGGT-3'	52
<i>amoA2IR</i>	5'-CCCCTCIGIAAAGCCTTCTTC-3'	
F1370 F1 <i>nxrA</i>	5'-CAGACCGACGTGTGCGAAAG-3'	
F2842 F1 <i>nxrA GC</i>	5'-CGCCCCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGCGACGGGGGCGACCGACGTGTGCGAAAG-3'	55
F2843 R2 <i>nxrA</i>	5'-TCCACAAGGAACGGAAGGTC-3'	
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	
GCFung	5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGCCGCCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG-3'	50
Fung	5'-CATTCCCCGTTACCCGTTG-3'	

Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc.) にて解析を行った。

### 結果と考察

有機養液栽培に有用な微生物源のスクリーニング

有機養液栽培法は、スターターとして少量の土壌を

水中に浸漬し、有機物の硝化反応を行う微生物生態系を構築する工程と、作物を栽培する工程とで構成される。本研究では、まず、硝化反応に優れた微生物源の探索を行った。硝化反応中は、pHの推移とともに、有機物の分解に伴うアンモニウムイオンの増加、アンモニウムの酸化による亜硝酸イオンの増加、亜硝酸酸化による硝酸イオンの増加をモニターした。また、こ

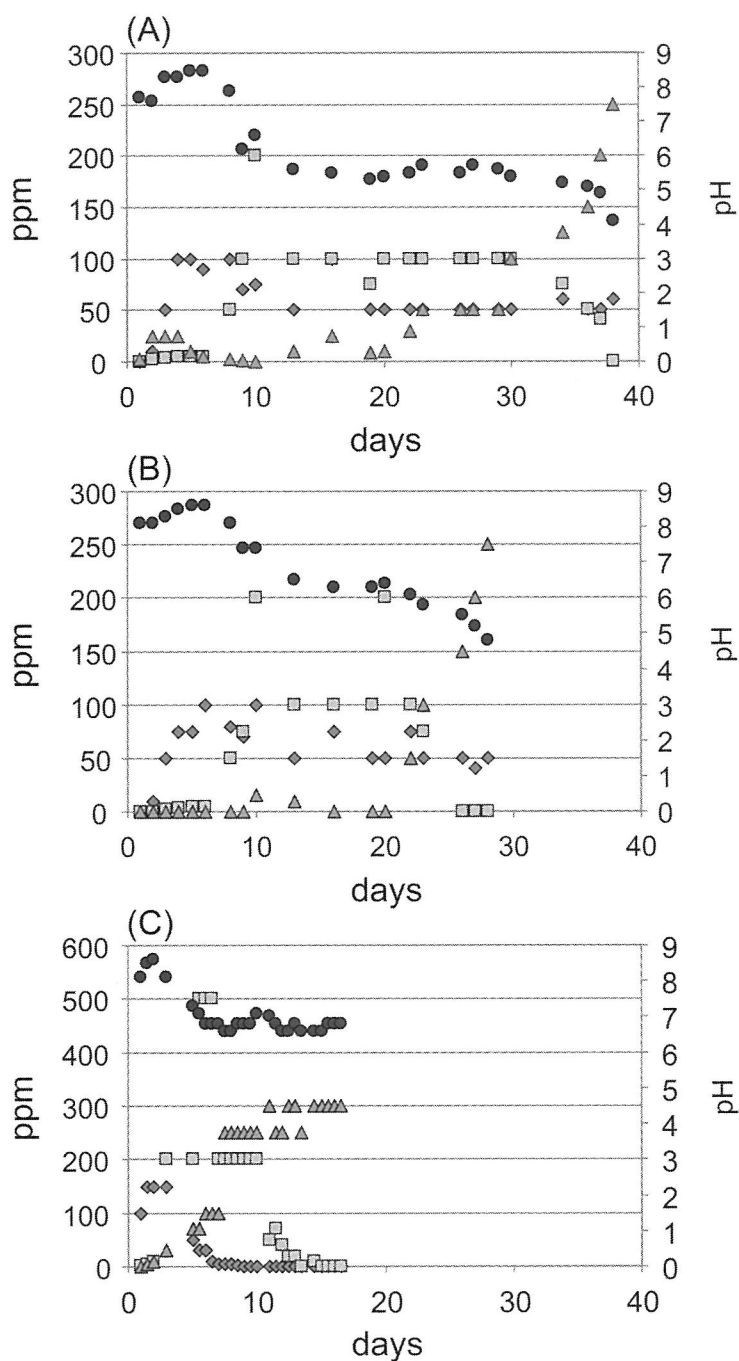


Fig. 2 Screening of useful microbial sources for nitrification process. Transition of nitrogen ion and pH using ordinal soil (A), selected soil (B), enrichment microbial seeds with calcium carbonate (C).  $\diamond$ ,  $\text{NH}_4^+$ ;  $\square$ ,  $\text{NO}_2^-$ ;  $\triangle$ ,  $\text{NO}_3^-$ ;  $\bullet$ , pH

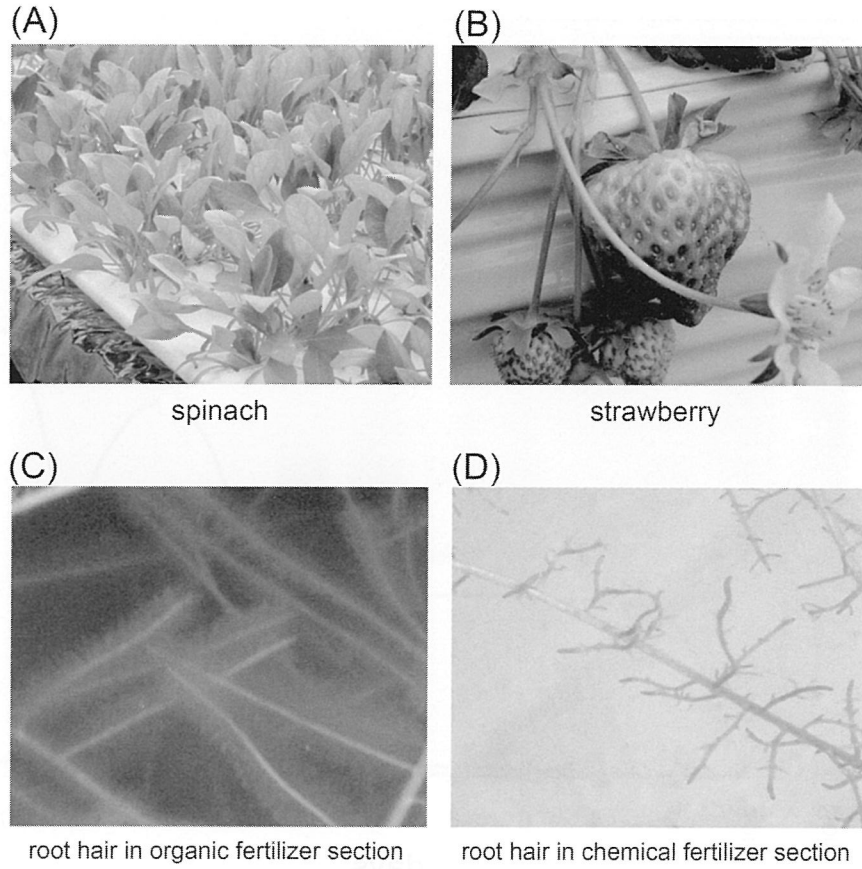


Fig. 3 Cultivation trials of strawberry (A) and spinach (B) using enrichment microbial seeds. Difference of root hair between organic hydroponic (C) and chemical hydroponic section (D).

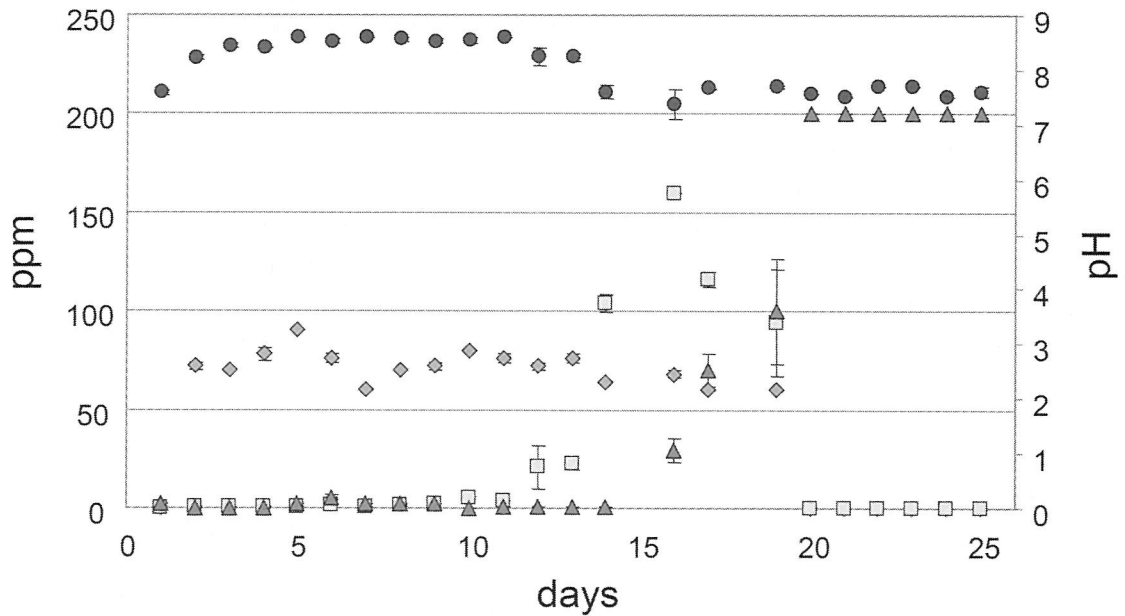
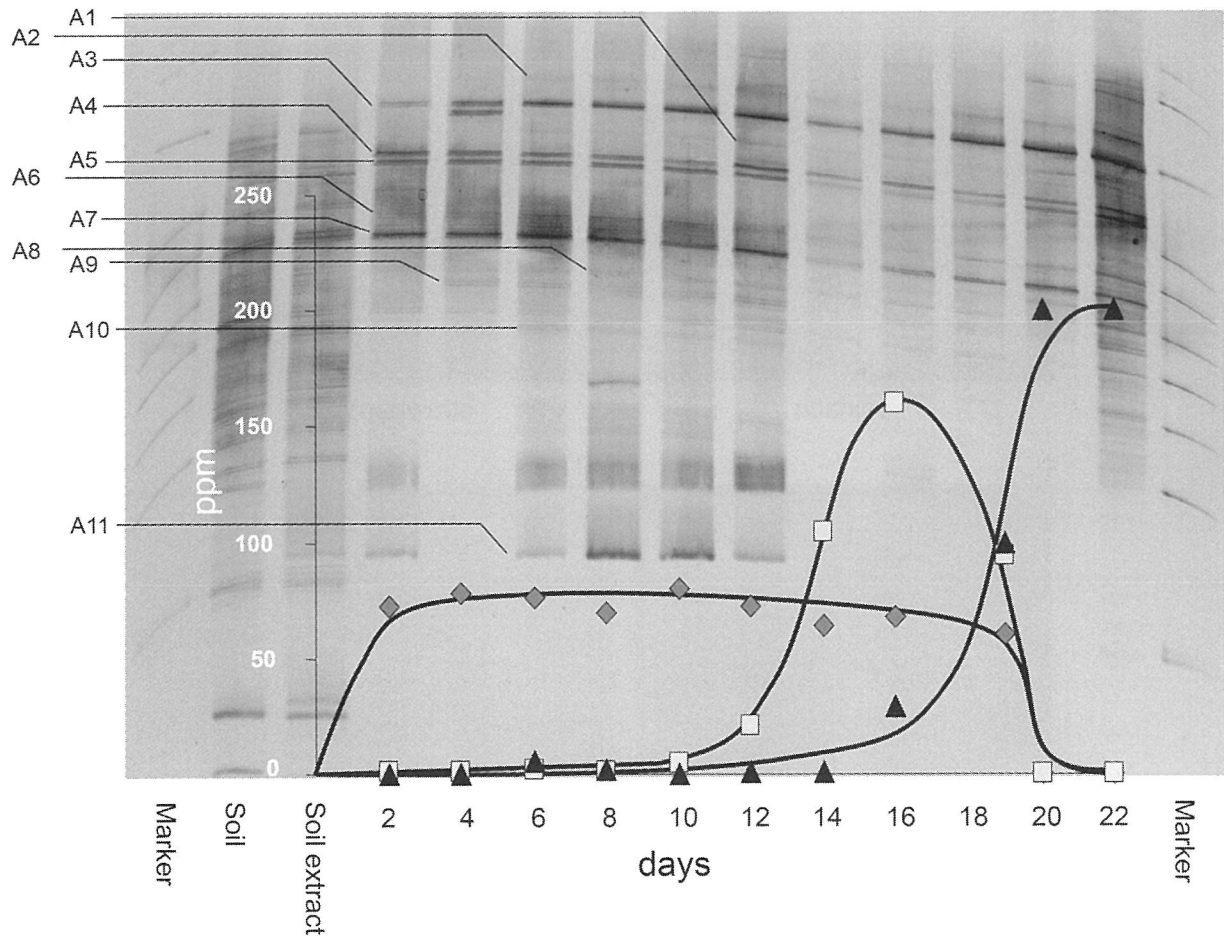


Fig. 4 Measurement of inorganic nitrogen concentration and pH during the nitrification process. Nitrification process was performed in test tubes with fish soluble and soil extract as a microbial source at 28 °C, 300 rpm. ◆, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; ■, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; ▲, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; ●, pH



**Fig. 5** DGGE analysis of prokaryote community transition during nitrification process. DGGE analysis was performed using 16S rRNA gene V6 to V8 region primer, f984 GC and r1378. Bands A1 to A10 were cut off from the gel and used as a PCR template for sequence analysis. ◆,  $\text{NH}_4^+$ ; ■,  $\text{NO}_2^-$ ; ▲,  $\text{NO}_3^-$

ここでは亜硝酸が完全に酸化され硝酸へと変換された時点で硝化反応の完了とした。約100種類の様々な土壌を微生物源として用いた硝化反応を行い、硝化完了までの日数を基準にスクリーニングを行った結果、一般的な土壌を微生物源として使用した時 (Fig. 2A) よりも、硝化工程を1週間程度短縮できる微生物源を選抜した (Fig. 2B)。引き続き検討には、選抜した土壌を用いた。

#### 多様な有機物を用いた硝化反応

スクリーニングの際には、カツオの煮汁を有機物源として用いた。そこで、多様な有機物源 (牛乳, おから, 野菜ジュース, ヨーグルトなど, C/N比の高いもの) を用いて硝化反応を評価した。結果、すべての有機物に対して硝化能を示し、カツオの煮汁を有機物として用いた時と同様の窒素代謝物の推移が観察でき

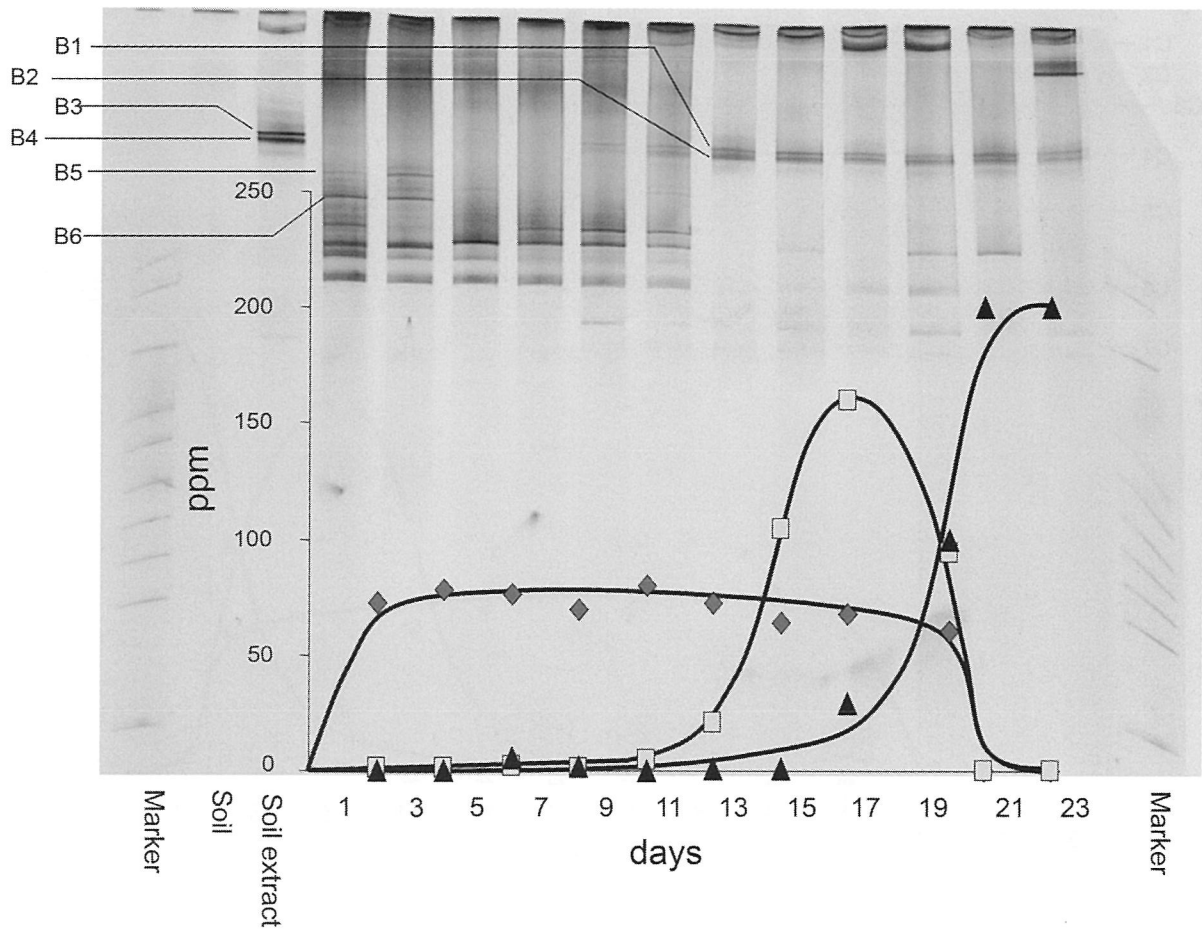
た。

#### 硝化反応に適した微生物群集の集積化

硝化終了後の菌群を回収し、再度硝化反応を繰り返した。約40回硝化反応を繰り返した結果、初回集積時と同様の窒素代謝物の推移を示すことが明らかになった。また、pHの変化を低減すべく、炭酸カルシウムを1g/Lの濃度にて、硝化反応液中に供したところ、速やかな硝化反応が確認できた (Fig. 2C)。

#### 集積した微生物群を用いた栽培試験

硝化工程終了後、回収した菌群集を用い、各県の農業試験場と共同で、葉菜類や、果菜類の試験栽培を行い、土壌栽培と遜色のない健全な植物の生育を確認した (Fig. 3A, B)。その際、葉菜類の栽培では化学肥料区に比べ、含有硝酸量の低減が観察できた。また、有



**Fig. 6** DGGE analysis of ammonia-oxidizing bacterium community transition during nitrification process. DGGE analysis was performed using *amoA* (alpha subunit of ammonia monooxygenase) gene primer, *amoA* 1F GC and *amoA*2IR. Bands A1 to A10 were cut off from the gel and used as a PCR template for sequence analysis. ◆, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; ■, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; ▲, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

機肥料区では土壌用の根毛の発達も確認できた (Fig. 3C, D). さらには、植物病原菌を硝化反応中や栽培系に接種した場合に、時間の経過と共に病原菌が検出限界以下になる現象が観察された (Fujiwara *et al.*, 2012, 2013).

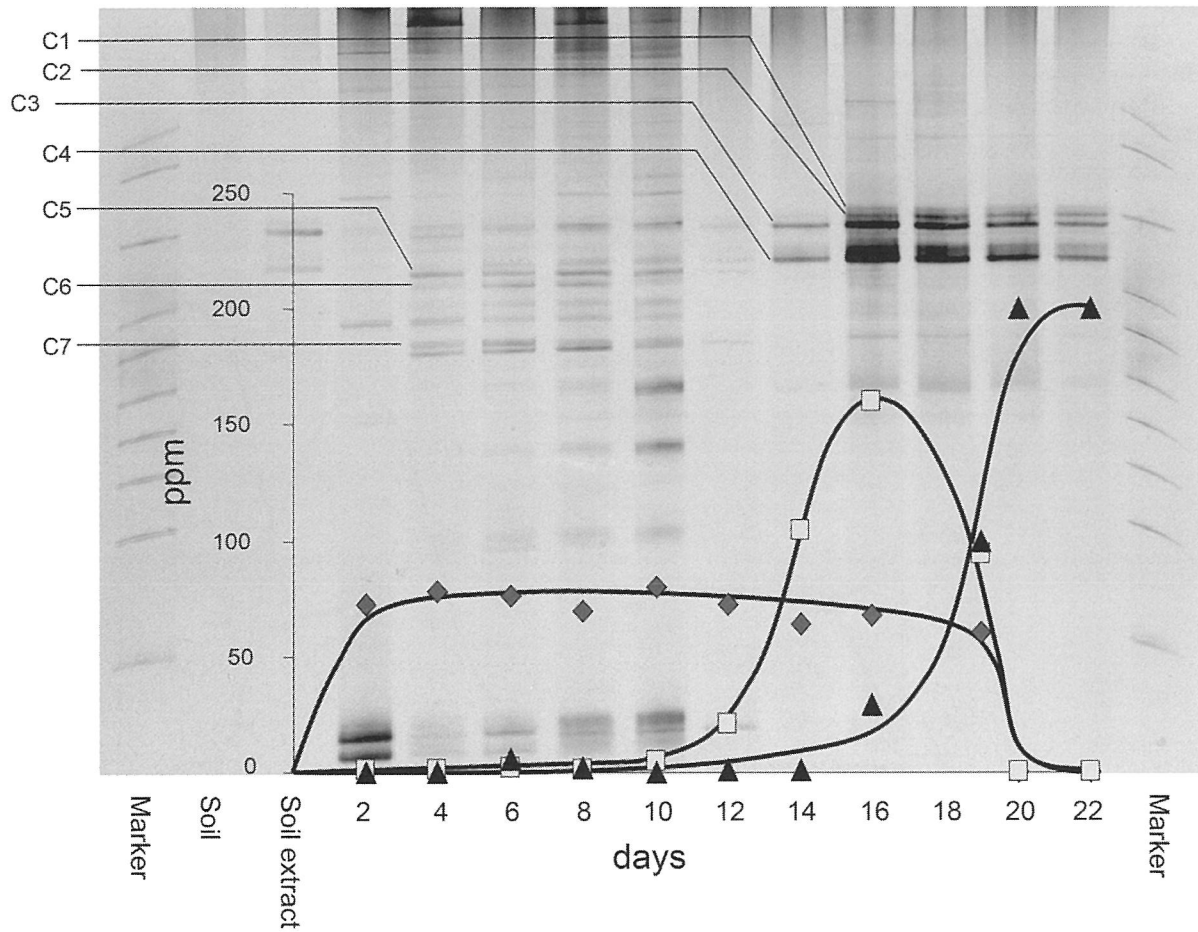
#### 窒素動態に伴う微生物群の菌相推移解析

硝化反応中の窒素動態と微生物の推移を明らかにするべく、試験管スケールで硝化反応を行い、随時、微生物群集の回収を行い、DGGE解析に供した。毎日、5本ずつ回収し、硝化反応液のpH、無機窒素代謝物濃度を測定し、菌体を回収後、ゲノムを抽出し、DGGE解析用のテンプレートとして用いた。

Fig. 4に示すように、硝化反応は2日目よりアンモニウムイオンが検出できたが、およそ80 ppmで一定

の値を示し、増減は観察できなかった。これはアンモニアの気相への流出や、アンモニア酸化性菌による窒素同化などの要因が考えられるが、今後の詳細な解析が必要である。12日目には、亜硝酸イオンが検出され、16日目に160 ppmを示した。亜硝酸イオンが減少しはじめると同時に硝酸が検出され、硝化20日目には亜硝酸イオンは検出されなくなった。このアンモニウムイオンの推移と、16日から19日まで亜硝酸イオンの増減と硝酸イオンの増加は本系の特徴の一つである。

続いて、16S rRNAのV6-V8領域を対象にDGGE解析を行った (Fig. 5)。土壌微生物相と土壌抽出物の細菌相は高い類似性を示したが、硝化反応中の細菌相は比較的単純な菌相に収斂していた。また、静菌作用を示す亜硝酸イオンの出現と同時に菌相の多様性が極端に減少する傾向が観察できた。特徴的なバンドを切り



**Fig. 7** DGGE analysis of nitrite-oxidizing bacterium community transition during nitrification process. DGGE analysis was performed using *nxrA* (catalytic subunit of the nitrite oxidoreductase) gene primer, F2842 F1 *nxrA* GC and F2843 R2*nxrA*. Bands C1 to C7 were cut off from the gel and used as a PCR template for sequence analysis. ◆, NH<sub>4</sub>; ■, NO<sub>2</sub>; ▲, NO<sub>3</sub>

出し、配列の相同性から簡易的な菌種の同定を行った結果を示す。それぞれ *Bacillus cereus* (Fig. 5, A1), *Bacillus cereus* (Fig. 5, A2), *Bacillus* sp. (Fig. 5, A3), *Bacillus* sp. (Fig. 5, A4), *Lysobacter* sp. (Fig. 5, A5), *Pseudomonas* sp. (Fig. 5, A6), *Pseudomonas montelii* (Fig. 5, A7), *Pseudomonas* sp. (Fig. 5, A8), *Pseudomonas putida* (Fig. 5, A9), *Pseudomonas* sp. (Fig. 5, A10), *Acinetobacter* sp. (Fig. 5, A11) であった。*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属が硝化反応中一様に観察される一方で、*Acinetobacter* sp. (Fig. 5, A11) など、亜硝酸の蓄積と同時に消失していく菌種も存在していた。これらの結果から、硝化反応中の細菌相は、一般的な土壌細菌である *Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属が硝化反応中は大部分を占め、その他の菌種が非常に少ない状態であることが示唆された。

続いて、*amoA* (ammonia monooxygenase) を対象に DGGE 解析を行い、アンモニア酸化細菌の推移を解析した (Fig. 6) 結果、アンモニウムイオンの検出と同時に特徴的なバンドが検出され、亜硝酸が検出されるまでは大きな変化は観察できなかった。また、特徴的なバンドを切り出し解析したところ、*Nitrosomonas nitrosa* (Fig. 6, B1), Uncultured ammonia oxidizing bacterium (Fig. 6, B2), *Nitrosomonas nitrosa* (Fig. 6, B3), *Nitrosomonas nitrosa* (Fig. 6, B4), *Nitrosomonas nitrosa* (Fig. 6, B5), Uncultured *Nitrosomonas* sp. (Fig. 6, B6) であった。アンモニウム酸化は主に *Nitrosomonas* 属が担っていることが示唆された。続いて、亜硝酸酸化菌群の推移を *nxrA* (nitrite oxidoreductase) を対象に DGGE 解析を行った (Fig. 7)。亜硝酸イオンが蓄積すると同時に特徴的なバンドの出現が確認できたバンドを中心

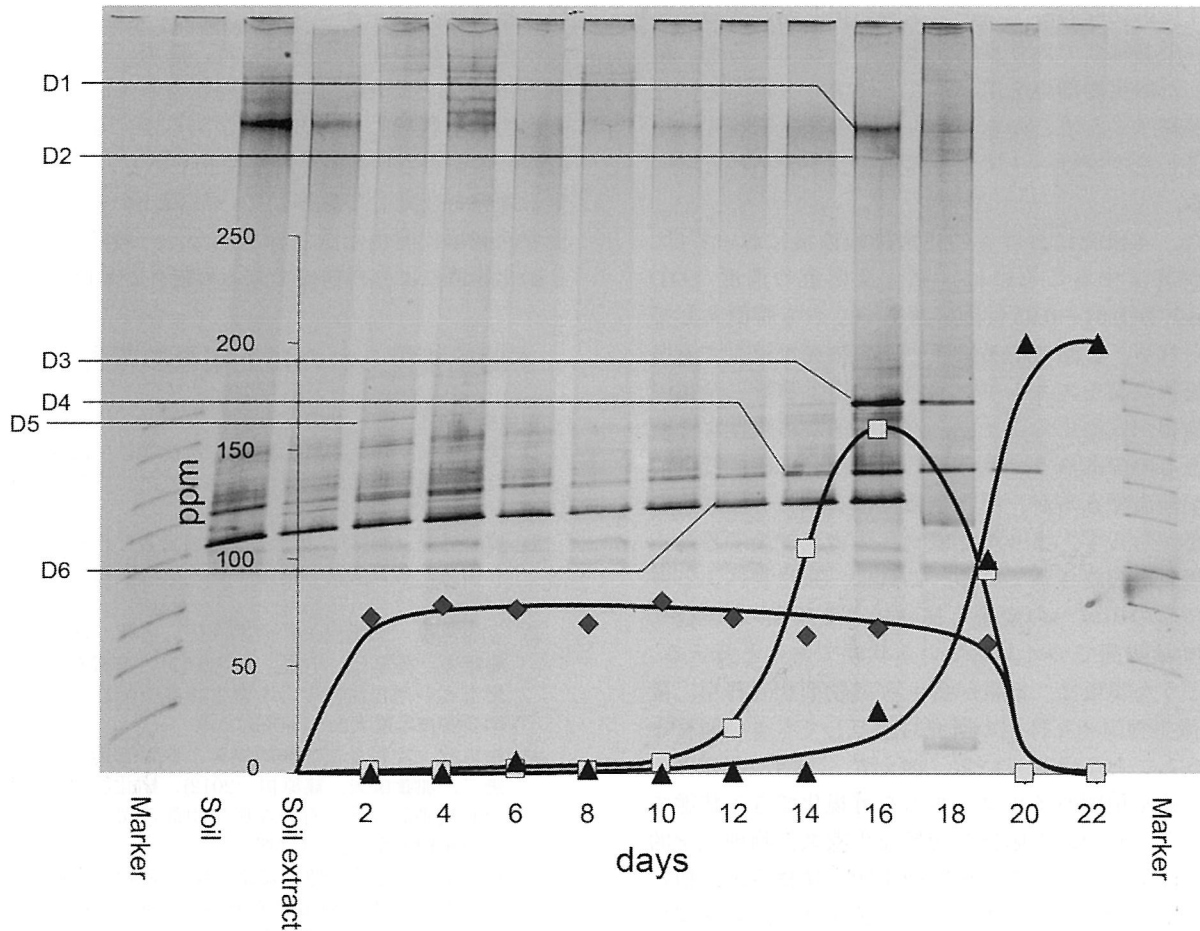


Fig. 8 DGGE analysis of eukaryote community transition during nitrification process. DGGE analysis was performed using 18S rRNA gene primer, NS1 and GCFung. Bands D1 to D6 were cut off from the gel and used as a PCR template for sequence analysis. ◆, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; ■, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; ▲, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

に切り出し簡易同定を行った結果, *Nitrobacter vulgaris* (Fig. 7, C1), *Nitrobacter winogradskyi* (Fig. 7, C2), *Nitrobacter winogradskyi* (Fig. 7, C3), *Nitrobacter winogradskyi* (Fig. 7, C4), *Nitrobacter winogradskyi* (Fig. 7, C5), *Nitrobacter winogradskyi* (Fig. 7, C6), Uncultured *Nitrobacter* sp. (Fig. 7, C7)であった。亜硝酸酸化は主に *Nitrobacter winogradskyi* が担っていることが示唆された。最後に、18S rRNAを対象に硝化反応中の真核生物の推移を明らかにした (Fig. 8)。比較的単純な微生物相に収斂しており、主なバンドを切り出し、簡易同定を行った結果、*Cercomonas* sp. (Fig. 8, D1), *Mortierella alpina* (Fig. 8, D2), *Mortierella alpina* (Fig. 8, D3), *Leuconeuospora pulcherrima* (Fig. 8, D4), *Penicillium oxalicum* (Fig. 8, D5), *Hartmannella vermiformis* (Fig. 8, D6)であった。単

純な微生物相の中で、*Cercomonas* sp. (Fig. 8, D1), *Mortierella alpina* (Fig. 8, D2), *Mortierella alpina* (Fig. 8, D3) が亜硝酸蓄積時のみ確認できること、糸状菌である *Leuconeuospora pulcherrima* (Fig. 8, D4) が一様に観察できることは興味深い点であると言える。アメーバー類である *Hartmannella vermiformis* (Fig. 8, D6) は、細菌類を捕食しているため硝化反応中に一様に確認できると考えられる。

硝化反応中の主な微生物相を明らかにしたが、土壌にくらべ特徴的な菌が大部分を占めることが明らかになった。これは、単純な菌相でも硝化反応が再現できる可能性を示唆していると考えている。一方で、単純な菌相でも栽培が成立しうるかは今後の課題であり、さらなる菌相の解析と微生物の単離解析が必要であろう。

硝化反応に関わるアンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌は独立栄養細菌であり単離が困難とされているが, 集積化した微生物群集を用いることにより2週間で硝化反応が終了することから, なんらかの微生物相互作用に着目したアプローチにより可培養化が望めると考えている。

また, 本研究における硝化菌群の集積においては, 硝化が終了するころには, 硝化反応液の濁度 (OD 600 nm) が0.01~0.05付近に落ちつく点も特徴としてあげられる。C源の枯渇に伴い微生物量が減少する一方, 無機窒素をエネルギー源とする微生物群に全体の微生物相が収斂することで, 窒素動態が再現性よく観察できるのであろう。さらに, 硝化反応中は, 窒素代謝物が検出できるが, 植物定植後は有機物を添加するにもかかわらず, まったく窒素代謝物が検出できなくなる現象が観察されている。これは, 微生物による有機体窒素の硝酸への変換と植物による硝酸の吸収が, 微生物-植物間でつりあっている状態であると言える。このような現象は, 本系が微生物-植物間相互作用, 微生物-微生物間相互作用の研究対象としてもよい題材となりうることを示している。加えて, 土壌と同様の根毛の発達や根圏バイオフィルムを可視化できる状態で再現でき, かつ, 土壌ほど複雑な生態系, 物理化学的組成では無いことから, 根圏微生物, 植物生理, 植物栄養, 肥科学的解析対象としても興味深い。自然環境ほど複雑ではないながらも, 自然と同様のモデルを小さな閉じた系で再現できることが本系の秀でた特徴であろう。また, 有機物の種類にかかわらず, 菌相推移と連動して再現性よく窒素動態が同じ推移を示す点で, 硝化微生物群解析の端緒として本系が科学的解析の対象になりうると考えている。

複合微生物の理解は非常に困難ではあるが, 本研究での複合微生物の応用例は, 複合微生物理解への一つの入口になったと考えている。

## 要 約

有機溶液栽培は環境負荷を低減し, 効率的な栽培を実現する水耕栽培として期待を集めている。本技術は, 通気条件下にて一定量の有機態窒素を供給することで硝化微生物群を馴養する過程と, 植物定植後に有機物の硝化と栽培を同時に行う栽培過程で構成される。本研究では, 微生物源として硝化能が優れた土壌を選抜し, 数回硝化を行わせることで安定した硝化能を示す微生物群集を集積した。また, 栽培試験を行うことで, 集積した硝化微生物群の有用性を確認した。さらに, PCR-DGGE法を活用し, 硝化工程における窒素代謝動

態と細菌相, アンモニア酸化細菌, 亜硝酸酸化細菌, 真核微生物相の推移を解析した。結果, 硝化工程中の微生物相は, 土壌にくらべ単純化されており, 一定の微生物相に収斂していることが明らかになった。硝化に関わる菌相も比較的単純な菌相を示し, 再現性良く, 窒素動態と連動して推移していた。以上の結果より, 有機養液栽培に有用な微生物群集が, 一般的な土壌細菌と硝化細菌により再構成できる可能性が示唆された。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 犬飼龍矢, 安藤晃規 (2011). 高施肥性・耐病性を備えた有機質肥料活用型養液栽培. アグリビジネス創出フェア (千葉)
- 2) 安藤晃規 (2011). 耕水を半分の日数で作成できる種菌の開発, 有機質肥料活用型養液栽培研究会第2回大会 (津)
- 3) 安藤晃規, 犬飼龍矢, 池本成美, 島純, 宮本憲二, 加藤康夫, 篠原信, 小川 順 (2012). 有機養液栽培に有用な高い硝化活性を示す微生物群の解析. 日本農芸化学会2012年度大会 (京都)
- 4) 小川順, 安藤晃規, 犬飼龍矢, 池本成美, 島純, 宮本憲二, 加藤康夫, 篠原信 (2012). 硝化特性を指標とした有機養液栽培に有用な微生物群の探索. 日本農芸化学会2012年度大会 (京都)
- 5) 種村竜太, 遠藤昌伸, 安藤晃規, 篠原信 (2012). イチゴの有機質肥料活用型養液栽培技術の開発 (第4報) 有機質肥料と化学肥料との養分吸収特性の比較. 土壤肥科学会2012年度大会 (鳥取)
- 6) 種村竜太, 遠藤昌伸, 安藤晃規, 篠原信 (2013). イチゴの有機質肥料活用型養液栽培技術の開発 (第6報) 微生物資材処理方法の違いが初期生育と養分吸収に及ぼす影響. 園芸学会平成25年度春季大会 (東京)
- 7) 藤原和樹, 飯田祐一郎, 青山ちひろ, 安藤晃規, 小川順, 大西純, 高野雅夫, 寺見文宏, 篠原信 (2013). 有機質肥料活用型養液栽培におけるレタス根腐病に対する病害抑止効果の解析. 平成25年度日本植物病理学会大会 (岐阜)
- 8) 小川順, 安藤晃規 (2013). 微生物で土壌を創る - 複合微生物系の機能利用 -. 日本化学会第93回春季年会 (草津)
- 9) 篠原信, 岩井喬, 藤原和樹, 青山ちひろ, 小川順, 安藤晃規, 加藤康夫, 宮本憲二, 高野雅夫 (2013). 人工土壌作出による有機質資源からの無機肥料製造技術と有機質肥料活用型養液栽培. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台)
- 10) 藤原和樹, 飯田祐一郎, 青山ちひろ, 大西純, 安藤晃規, 小川順, 加藤康夫, 宮本憲二, 高野雅夫, 寺見文宏, 篠原信 (2013). 有機質肥料活用型養液栽培における *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* の動態解析. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台)
- 11) 犬飼龍矢, 安藤晃規, 池本成美, 島純, 青山ちひろ, 吉田昭介, 宮本憲二, 加藤康夫, 藤原和樹, 篠原信, 小川順 (2013). 有機質肥料活用型養液栽培における有



機態窒素の硝化と菌相推移の解析. 日本農芸化学会  
2013年度大会 (仙台)

- 12) 吉田昭介, 小野瑞季, 篠原亘, 榊原康文, 安藤晃規,  
小川順, 加藤康夫, 篠原信, 宮本憲二 (2013). 次世代  
シークエンサーによる有機養液栽培における微生物叢  
の網羅的解析. 日本農芸化学会2013年度大会 (仙台)
- 13) Fujiwara, K., Iida, Y., Someya, N., Ando, A., Ogawa, J.,  
Kato, Y., Miyamoto, K., Takano, M., Ohnishi, J., Terami,  
F. & Shinohara, M. (2014). Contribution of the  
rhizosphere microbial community to *Fusarium* wilt  
suppressiveness in multiple parallel mineralization  
system. XVI International Congress On Molecular Plant-  
Microbe Interactions 2014. Rhodes, Greece.

#### 原著論文

- 1) Fujiwara, K., Iida, Y., Iwai, T., Aoyama, C., Inukai, R.,  
Ando, A., Ogawa, J., Ohnishi, J., Terami, F., Takano, M.  
& Shinohara, M. (2013). The rhizosphere microbial  
community in a multiple parallel mineralization system  
suppresses the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.  
*MicrobiologyOpen*. **2**: 997–1009.

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なる助成を賜りました  
公益財団法人発酵研究所に厚く御礼申し上げます。また、  
農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所  
の藤原和樹氏に厚く御礼申し上げます。さらには、栽  
培試験を行っていただきました大阪府環境農林水産総  
合研究所の森川氏、福島県農業総合センターの加藤氏、  
三重県農業研究所の榊田氏、新潟県農業総合研究所園  
芸研究センターの種村氏に御礼申し上げます。

#### 文 献

- Fujiwara, K., Aoyama, C., Takano, M. & Shinohara, M. (2012).  
Suppression of *Ralstonia solanacearum* bacterial wilt disease  
by an organic hydroponic system. *J. Gen. Plant. Pathol.* **78**:  
217–220.
- Fujiwara, K., Iida, Y., Iwai, T., Aoyama, C., Inukai, R., Ando, A.,  
Ogawa, J., Ohnishi, J., Terami, F., Takano, M. & Shinohara,  
M. (2013). The rhizosphere microbial community in a  
multiple parallel mineralization system suppresses the  
pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Microbiology Open*.  
**2**: 997–1009.
- Kawamura-Aoyama, C., Fujiwara, K., Shinohara, M. & Takano,  
M. (2014). Study on the hydroponic culture of lettuce with  
microbially degraded solid food waste as a nitrate source.  
*JARQ*. **48**: 71–76.
- Morimoto, S. & Hoshino, Y. T. (2008). Methods for analysis of  
soil communities by PCR-DGGE (1): Bacterial and fungal  
communities. *Soil Microorganisms* **62**: 63–68.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. & Liesack, W. (1997). The  
ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a  
functional marker: molecular fine-scale analysis of natural  
ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*  
**63**: 4704–4712.
- Shinohara, M., Aoyama, C., Fujiwara, K., Watanabe A., Ohmori,  
H., Uehara, Y. & Takano, M. (2011). Microbial mineralization  
of organic nitrogen into nitrate to allow the use of organic  
fertilizer in hydroponics. *Soil Science and Plant Nutrition* **57**:  
190–203.
- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X. & Degrange, V. (2008).  
Development and application of a PCR-denaturing gradient  
gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-  
like *nrrA* sequences in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**:  
261–271.

平成24年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成24年4月～平成26年3月

### 未分類 *Clostridiales* 目細菌群の分離同定 及び生態学的役割に関する研究

高野 (白鳥) 初美

日本大学生物資源科学部  
takano.hatsumi@nihon-u.ac.jp

目的：多くの嫌気性有芽胞細菌が属する *Clostridiales* 目には、分類学的に明確な定義がなされていないグループ (Family incertae sedis：科名未決定) がいくつも散在している。これらのグループに属する菌群は、比較的多様な環境から分離されているため生態学的な役割は明らかではないが、その多くが蛋白質性基質の分解性を有している。そこで本研究では、蛋白質分解性を指標に身近な環境試料から難培養性の *Clostridiales* 目細菌種を探索し、未分類群の系統発生的な知見を得ると共に、分離株の特性を調査することで生態系における役割や生物資源としての利用性を見出すことを目的とした。

方法：海洋生物、敷設木材チップおよびメタン発酵液などの試料13点を分離源とした。予備実験から、ペプトン類に嫌気呼吸の最終電子受容体として硝酸塩や鉄化合物を添加した培地に炭酸水素アンモニウムを添加することで、難培養性の嫌気性細菌の生育を効果的に促進することが確認されたため、本条件を適用した。各試料を前述の培地に接種し、高温 (55~60℃) で1~5週間の集積培養を行った。次に、インドール反応陽性を示した培養液を選別し、段階希釈後にゲランガム固体培地へ塗布、嫌気ジャーで培養後、出現したコロニーを釣菌した。得られた分離株については、16S rRNA 遺伝子配列の解読およびそれに基づく系統解析を行った。また、*Clostridiales* 目の未分類群に類縁性を示した菌株については、分類学的特徴を調査した。

結果・考察：海洋試料からは41株、木材チップから19株、木材チップ堆肥の嫌気発酵液から11株の分離株を取得した。これら菌株の16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、複数の分離株が *Tepidimicrobium* 属に相同性を示した。本属は、未分類群の一つである Family XI

を構成する一群で、既知種は *Tepidimicrobium ferriphilum* (TF) と *Tepidimicrobium xylaniliticum* (TX) の2種である。また、両種に関する分類学的特徴づけは限定的かつ不十分な比較にとどまり、明確な定義がなされていなかった。そこで、これら既知菌種と本研究で取得した分離株の系統解析を行ったところ、TFとTXを中心とした二系統に分かれることが明らかとなった。また、TFグループに属する分離株 Ui044 株と SC-1 株は基準株と異なる系統位置を示し、16S rRNA 遺伝子配列の一致度は95%以下であったことから新規細菌種である可能性が示唆された。これに加え、グラム陽性型の細胞表層構造やイソ型分岐脂肪酸を共通して有すること、及び鉄化合物を最終電子受容体として生育するという特徴が確認された。一方、基質利用性および硝酸呼吸能はTFとTXグループで差異があった。

本研究で試行した培養手法は、未分類の *Clostridiales* 目細菌群の一群を選択的に分離するのに有効であった。この結果は、本研究にとどまらず、希少な嫌気性細菌群の分離培養に嫌気呼吸の条件が大きく影響することをあらためて認識する必要性を強く示唆した。また、分離株を含む *Tepidimicrobium* 属はアルカリ耐性を有しており、アンモニア発酵による有機性廃棄物処理への利用性が示唆されていることから、今後の研究が期待される。

### 地下深部油田に隔離されていた系統的に 新規な嫌気微生物群を共生培養法で集積し 生態学的解明を行う

持丸 華子

産業技術総合研究所  
h-mochimaru@aist.go.jp

目的：深部地下油ガス田は数万年から数億年単位で地表から隔離された特殊な環境である。筆者は過去に国内油ガス田の油層水を対象とした16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析により、既存種との相同性が90%前後の系統的に新規な細菌が優占しているこ

とを明らかにした。そこで、本研究では油ガス田に生息する新規の嫌気性微生物群を集積し、分離同定を行うことによって、これらの油田における生理生態学的機能を明らかにすることを目的とした。

方法：国内油ガス田から油層水を採取し、培養基質として各種炭化水素、長鎖脂肪酸、芳香族カルボン酸、酢酸、メタノールや水素/二酸化炭素を用いて現地温度の55℃にて集積培養を実施した。得られた集積培養系について、16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析を行い、新規性の高い細菌種を含む培養系に対しては、1) 多くの発酵性細菌が利用する酵母エキスなど、2) 電子受容体として3価の鉄、3) 油ガス田から分離したメタン生成菌を発酵性共生細菌の共生菌として用い、新規細菌の分離培養を試みた。分離培養に成功した細菌については、生育可能温度や至適 pH、NaCl 濃度などの生理学的諸性質を調査した。

結果・考察：集積培養を開始して1年半後、酢酸を用いて集積した培養系において、数種の未培養細菌の優占が確認され、1) の方法により *Firmicutes* 門 *Clostridia* 綱 *Thermoanaerobacterales* 目に属する新規細菌 SenYP 株（最近縁種 *Thermoanaerobacter wiegelsii* に86%の相同性）と、2) の方法により *Deferribacteres* 門 *Deferribacteraceae* 科に属する新規細菌 ANA 株（*Calditerrivibrio nitroreducens* に90%の相同性）の純粋分離に成功した。

SenYP 株の生育至適温度は55℃、至適 pH は7、生育可能な NaCl 濃度は2-3%であった。また、本株は油層環境で酢酸酸化-水素資化性メタン生成反応を行う未培養細菌と96%の相同性を示したため、現在、油ガス田由来のメタン生成菌との共生条件下における酢酸酸化能について検証を行っている。

ANA 株の生育至適温度は55℃、至適 pH は7、生育可能な NaCl 濃度は2-3%であった。また、本株は油層水が採取された現場油層環境に優占する *Flexistipes* sp. vp180 株（未だ学名記載なし）と99%の相同性を示した。vp180 株は原油分解メタン生成反応を行う集積培養系で優占することが報告されており、油田環境にお

ける原油分解に重要な役割を果たしている可能性がある。

本研究では油田環境における未知微生物の純粋分離に成功し、その機能を明らかにすることで、深部地下圏の炭素循環に重要な役割を果たす微生物生態系の理解に資する基盤的知見を得た。

### 我が国の温泉地における好熱性アーキアの 地理分布、系統学的多様性および 生理機能の解明

加藤 真悟

理化学研究所バイオリソースセンター  
skato@jcm.riken.jp

目的：三大生物界の一つであるアーキアは、生物の進化と機能を語る上で欠くことのできない研究対象である。しかしながら日本の温泉のアーキアに関しては、その群集組成や地理的分布といった基本的な調査すらほとんどなされていない。本研究では、日本各地の温泉に生息するアーキア群集の系統学的多様性と地理的分布、および物理化学的環境条件を網羅的に調べ、「どこの温泉の、どのような環境条件に、どのような分類群のアーキアが存在するのか」を体系化することを目的とした。

方法：8つの温泉／鉱泉地域から計22試料を採取した。それらの温度、pH、溶存酸素、鉄、硫黄濃度、塩分を現場および実験室にて測定した。採取した試料から DNA を抽出し、アーキア特異的プライマーを用いて16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行い、増幅産物のパイロ／サンガーシークエンシングを行った。得られた配列をもとに QIIME, mothur 等のソフトウェアを用いて群集構造／多様性解析を行った。さらに、好熱性アーキアを標的にした分離培養も平行して行った。

結果・考察：採取した試料の温度は15.8℃から85.5℃、pH は2.09から8.14、溶存酸素濃度は0から163μMであった。また、いくつかの試料は鉄や硫黄を豊富に含んでいた。塩分はほぼすべての試料で0であ

ったが、5%程度の試料も含まれていた。

低温 pH 中性試料と高温酸性試料において、PCR 増幅およびパイロ／サンガーシークエンシングに成功した。多様性解析の結果、高温酸性試料とは比べ物にならない程の多様なアーキアが低温 pH 中性試料に存在することが明らかになった。構造解析の結果、そのアーキアのは大半は未培養グループの DSEG や MCG に属することがわかった。これらの未培養グループには、低-常温性好中性 pH のアーキアが含まれることが示唆される。さらには、DSEG のアーキア 16S rRNA 遺伝子にはイントロンが多数存在することが明らかになり、さらに、これまで報告例のない部位においてイントロンが見いだされた。16S rRNA 遺伝子へのイントロンの挿入／欠失が、アーキアの進化や生理生態に予想以上に深く関わっている可能性がある。

一方で、多くの試料においてアーキア 16S rRNA 遺伝子の増幅が確認できなかった。この結果は、用いたプライマーとマッチしない特異な種がそれらの試料に存在する可能性を示唆する。ただし、それらの試料中にアーキアが極端に少なかったり、増幅阻害剤が混入したりした可能性も現時点では否定できない。

分離培養の結果、*Thaumarchaeota* 門の根元付近に位置する未培養グループ THSCG に属する新規の株の分離に成功した。現在、性状解析、全ゲノム解析および菌株保存機関への寄託の準備を進めている。

以上、本研究によって温泉環境中に存在するアーキアについて多くの新しい知見を得ることができた。今後は、分析手法に改良を加え、さらに多くの温泉地を調査し、多くの新規培養株、遺伝子データ、化学データを得て、より一般性のある議論を展開し、日本のアーキア研究を盛り上げていきたいと考えている。

小笠原諸島固有菌類保全のための分類・  
生態学的研究—樹木材生息菌を対象として

服 部 力

森林総合研究所  
hattori@affrc.go.jp

目的：小笠原諸島はいわゆる海洋島であり、これまで他地域とつながったことがないことから、植物、とくに樹木については固有種が多いことが知られる。一方、菌類は広分布種が多く、狭い地域に固有の種は極めて限定的である。多孔菌類をはじめとする樹木材生息菌の分布は、宿主となる樹木相に大きく依存しており、固有樹木の多い小笠原における材生息菌相の解明は興味深い課題である。そこで、本研究では小笠原に固有、もしくは分布が偏る材生息菌の存在を明らかにするとともに、その宿主や生息環境を解明することを目的として行った。

方法：2012年9月、11月、2013年6月、9月および11月の5回にわたり、小笠原諸島父島、母島および兄島各地において菌類調査を行った。多孔菌類を中心とする材生息菌を採取、菌の分離を行うとともに、標本作製した。また、可能な限り宿主樹木の種名を記録した。標本の同定を進めるとともに、一部の菌株について rDNA の ITS または／および LSU 領域等に基づき遺伝子解析を行った。

結果・考察：国内では、高知県および小笠原諸島に隔離分布する希少種とされ、環境省の絶滅危惧種 I 類に指定されているオオメシマコブ (*Fulvifomes rimosus*) について、形態的特徴ならびに LSU 領域に基づく遺伝子解析から、高知産個体群と小笠原個体群は別種の可能性が高いことを明らかにした。両者ともに *F. rimosus* のタイプ標本と形態的特徴が一致せず、これらの種名確定が課題として残された。また、小笠原個体群は絶滅危惧種のオガサワラグワ上に発生が限られており、オガサワラグワの減少が主要な絶滅要因と考えられる。

ウチワタケ属 (*Microporus*) 菌は、アジア暖温帯～

熱帯域において森林内の材分解者として重要であるが、現時点で種レベルでの分類が混乱している。rDNAのITS領域等複数領域を用いて、小笠原を含む国内各地およびマレーシア産菌株の分子系統解析を行ったところ、従来ツヤウチワタケ (*M. vernicipes*) とされていたものが4クレードに分割された。このうち1クレードについては小笠原産のものだけから構成されていた。本クレードは小笠原固有種から成立している可能性が示唆された。

メシマコブ (*Inonotus sanghuang*) は東アジア暖温帯および小笠原諸島に分布するとされている。本種およびその近縁種はいずれも宿主特異性が高く、メシマコブはクワ属のみから記録されている一方、小笠原産個体群の宿主範囲は調べられていなかった。本研究の結果、小笠原個体群はクワ属ではなくモクセイ科のシマモクセイから発生していることが明らかになった。小笠原個体群はメシマコブとは別の小笠原固有種である可能性があり、現在分子系統学的研究および形態的特徴の比較検討を進めている。

浅海および深海メタン湧出域に生息する  
メタン資化菌の単離、系統分類、  
および生理生態学的研究

平山 仙子

海洋研究開発機構  
hirayamah@jamstec.go.jp

目的：メタン酸化酵素遺伝子を指標とした環境試料の解析から、海洋には *Gammaproteobacteria* 綱に属する多様なメタン酸化細菌が存在することが示唆されているが、培養例が少なくその生理特性の解明は進んでいない。また培養株についても、その生理特性を詳細に解析した例は少ない。本研究では下北半島沖水深1,180mの深海堆積物から単離したメタン資化細菌 MR-1 株について、分類学的解析と炭素および窒素代謝特性の解析を行い、その生態学的役割を推察することを目的とする。

方法：MR-1 株の DNA から、炭酸固定酵素・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 (ルビスコ) の遺伝子 *rbcL*、窒素固定酵素・ニトロゲナーゼ還元酵素の遺伝子 *nifH*、および硝化酵素・ヒドロキシルアミン酸化還元酵素の遺伝子 *hao* を PCR により検出した。これらの塩基配列決定および系統解析を行った。次に炭素同位体標識した炭酸水素ナトリウム (1-40mM) の取り込み実験により、炭酸固定能を調べた。また MR-1 株が窒素固定を行う際の、モリブデン濃度 (0.1-20 $\mu$ M) と気層酸素濃度 (0.5-10%) の至適条件を調べた。

結果：MR-1 株と既知の *Methylobacter marinus* A45 株は 16S rRNA 遺伝子が 100%、*nifH* と *hao* がアミノ酸配列でそれぞれ 100% と 99.3% と高い相同性を示した。脂肪酸、G+C 含量、キノンも *Methylobacter* 属の特徴と一致した。しかしルビスコ遺伝子は *Methylobacter* 属細菌からは見出せなかった。MR-1 株の炭酸固定量は、炭酸水素ナトリウム添加濃度 15mM までは添加濃度に比例して増加したが、15mM 以上では全細胞炭素の 12-13% ではほぼ一定であった。また MR-1 株が試験管内で窒素固定により良好に生育するには、10 $\mu$ M 程度のモリブデンと好気条件 (気層酸素 1%) が必須であった。

考察：メタン資化細菌には 2 つの固有の細胞炭素固定経路が知られており、多くの株はどちらか 1 つを有するが、中には 2 つの経路やルビスコを有するものが知られている。しかしその活性や環境変化への応答に関する知見は限られている。MR-1 株の分離源である深海堆積物の間隙水のアルカリニティは 40mM 程度であり、また通常堆積物中の酸素濃度は低いことから、MR-1 株が海底で炭酸固定を行い、また窒素固定も行える環境にいたと推察される。MR-1 株の炭酸固定におけるルビスコの寄与については、更にタンパクレベルの解析を行う必要がある。またデータベース検索により、多くのメタン資化細菌から、アンモニア酸化により生じるヒドロキシルアミンを酸化する酵素の遺伝子 *hao* が見出され、系統解析の結果、*hao* がメタン資化細菌の系統関係を推察する際の有効な指標となることが

わかった。

環境 DNA や環境 RNA のメタゲノム解析による  
土壌原生生物の生態系の解明と  
新規分類群の探索

福田 康弘

東北大学大学院農学研究科  
yasufuku@bios.tohoku.ac.jp

目的：真核生物の分類体系は、大きく変化しつつある。様々な原生生物のゲノム情報の蓄積と、コンピュータの演算性能の向上から、分子系統解析は飛躍的に発展した。それらの分子系統解析は、地球上に生息する真核生物の多様性が単細胞である原生生物の多様性とほぼ同義であることが明らかになった。だが、これまでに得られた原生生物の多様性と系統関係の知見は、真核生物全体の分類群を捉えるには不十分であり、さらに系統的な位置関係の不明な分類群も多く残る。そこで、環境 DNA を用いたメタゲノム解析は、単離や培養の困難な原生生物を網羅的にとらえ、生態系で原生生物が担う役割も明らかにする解析方法として、注目されている。

土壌には多くの原生生物が存在し、これらは土壌生態系における物質循環の重要な位置を占めている。だが、これまで原生生物のメタゲノム解析は、海洋など水環境で主に行われており、土壌での解析例は知られていない。また原生生物のメタゲノム解析では、確立された手法も無い。本研究は、土壌原生生物を対象としたメタゲノム解析手法の知見と系統分類に不可欠な配列情報の充足、さらに日本国内の森林土壌における原生生物の生態系を比較することを目標とした。

方法：土壌試料は、モニタリングサイト1000の21サイト（北海道・雨竜・苫小牧・足寄、岩手県・カヌマ沢、宮城県・青葉山、新潟県・小佐渡 {豊岡} {キセン城}・大佐渡、茨城県・筑波山、埼玉県・大山沢・秩父、長野県・カヤの平、愛知県・愛知赤津、京都府・上賀茂・芦生、和歌山県・和歌山、高知県・市ノ

又・佐田山、宮城県・綾、鹿児島県・奄美、沖縄県・与那）から得た。メタゲノム解析は、リボソーム小サブユニット（SSU rRNA）の V4 領域（約 400 bp 長）をバーコードとして用い、以下の通りに行った。全ての土壌試料から環境 DNA と環境 RNA を抽出し、さらに逆転写にて環境 cDNA を合成した。これら環境 DNA/cDNA を鋳型として、バーコード領域を PCR で増幅した。次に、Ion PGM で並列シーケンスを行い、増幅産物の配列を決定した。得られた配列情報について不確定塩基の除去と QC チェック、そして 300-500 bp 長のトリミングを行い、各配列の分類群の推定と多様性をクラウドの MG-RAST にて解析した。

結果・考察：様々な PCR 増幅条件を検討し、12 サイトから環境 DNA/環境 cDNA の増幅産物セットを得た。これらから約 0.5 M-10 K の配列長を並列シーケンスによって得ており、その配列の由来生物種の同定、および生態学的関連性の解析を現在も進めている。これまでの結果は、DNA と RNA で検出される生物種の構成はサイトによって大きく異なること、また寄生性の原生生物の配列が土壌中に豊富に存在することを特筆すべき点として示している。

植物内生放線菌の分離、分類および生態解明

松本 厚子

北里大学北里生命科学研究所  
amatsu@lisci.kitasato-u.ac.jp

目的：土壌には多数の放線菌（グラム陽性高 G+C 細菌）が分布しているがその多くは *Streptomyces* 属である。一方、植物内には土壌とは種を異にする多くの放線菌が存在する。そこで多様な植物からの植物内生放線菌を分離、分類すると同時に、植物内での放線菌の局在を調べ植物内生放線菌の生態解明へのアプローチとする。さらに分離した未利用な植物内生放線菌からの二次代謝産物の探索を行なう。

方法：植物の根を洗浄後 1% 次亜塩素酸ナトリウムお

よび70%エタノールで表面殺菌したものを試料とし、放線菌の分離、検出、内生放線菌のクローンライブラリーの作成に用いた。分離には乾燥試料のすりつぶし液を寒天培地と混積培養し、分離株を得た。試料中の放線菌の検出には、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いた。

結果・考察：ジャノヒゲの根からの FISH 法による内生菌の観察では、放線菌が根の表皮近くで多く検出された。また、クリスマスローズおよびチョウセンアサガオの根を内部と表皮を分けて分離すると、表皮からは内部の約100倍のコロニーが出現し、分離においても植物の根の表皮近くに放線菌が多く存在することを示す結果が得られた。一方、ヒナタイノコヅチの根を洗浄後すりつぶし、一部を分離に、一部を微生物の16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーの作製に用い、各々16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列から属を推定すると、分離株166株は16属に、227クローンは45属に分類された。両者を比較すると37属がクローンのみで検出され分離できていないことがわかった。これは、分離できていない植物内生放線菌の存在を示すものである。

クリスマスローズの根より分離した K12-0602 株は、長い孢子鎖を着生し、16S rRNA 遺伝子配列から *Micromonosporaceae* 科に属する1菌株と推定された。化学分類学的特徴を分析した結果、細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成が、アラニン、グリシン、ヒドロキシグルタミン酸および未同定アミノ酸から構成されることがわかった。この未同定アミノ酸は分類指標として重要なジアミノ酸と推測されたので、TLC、LC/MS および NMR を用い解析した結果、今までに報告例がない3,4-ジヒドロキシジアミノピメリン酸であった。系統解析、化学分類およびその他の表現形質から、新属 *Rhizocola hellebori* を提唱した。

キンギンソウの根から分離した *Polymorphospora rubra* K07-0510 株の培養液から、光酸化溶血阻害活性を有する新規物質トレハンジェリン A、B および C を見出した。*Polymorphospora* 属放線菌は現在1属1種し

か知られていない希少な放線菌であり、過去に物質探索に利用された報告はない。植物からは、土壌とは異なる菌群が分離でき、二次代謝産物の探索のための新たなソースとして注目できる。

## 花粉に付着する微生物の検出とその応用

潮 雅 之

京大大学生態学研究センター・中野研究室  
ushima@ecology.kyoto-u.ac.jp

目的：近年、微生物群集の組成の分析が比較的容易になってきたことを受けて、微生物群集の組成情報を応用した研究が報告されている。例えば、人の手表面に付着している微生物群集の組成は個人によって特異的であり、その特異的な微生物群集はその人が触れたものに付着し残る。そのため、ものに付着した微生物を解析することで過去に誰が触れたかを特定することができる。本研究ではこの技術を生態学において応用し、革新的な手法の開発を行う。注目したのは植物の繁殖・結実・更新を考える上で重要な昆虫が花粉を運ぶ（送粉）というプロセスにおける「送粉昆虫の同定」である。従来の送粉研究者は、直接観察・捕獲法によって送粉昆虫の同定を行ってきたが、本研究では花に残された微生物群集の組成を解析し、その群集組成と昆虫体表に存在する微生物群集の組成を比較しその類似性から植物の送粉昆虫相を推定する。

方法：まず、昆虫体表の微生物細胞数を測定した。野外より捕獲した昆虫の体表を界面活性剤と超音波で処理し、微生物細胞を剥離・蛍光染色し顕微鏡下で細胞数を計測した。次に、昆虫の訪花行動による昆虫体表から花への微生物の移動を調べるために室内実験を行った。2013年春に野外のアカメガシワのつぼみに袋掛けをし、開花後に花を採取することにより「昆虫と接触した履歴のない花」を入手した。この花と野外で採取した昆虫（クマバチ、ミツバチ、コマルハナバチ）をプラスチック容器内で3時間接触させた。その後、



昆虫体表、花表面より微生物を剥離し、大量シーケンス法によって微生物相を解析した。最後に、花と昆虫の体表微生物相の対応を調べるために、野外においてセイタカアワダチソウとその周辺でみられる昆虫を採取し、花表面、昆虫体表の微生物相を解析した。当初は花粉一粒に付着する微生物を解析する予定であったが、現段階では技術的に困難であったため、花全体から微生物を採取する手法を採用した。

結果・考察：昆虫体表から剥離される微生物細胞数を測定した結果、概ね昆虫1個体の体表から100万~200万細胞程度が検出された。室内接触実験の結果、アカメガシワの花にクマバチが接触することによって、花表面の微生物相は大きく変化した。すなわち、クマバチの接触によりクマバチ体表から検出される微生物の多くが花表面からも検出されるようになった。従って、昆虫の訪花行動によって花に昆虫体表の微生物が移動していると判断できる。最後に、野外においてセイタカアワダチソウの花表面とその周辺で見られる昆虫の体表微生物相を解析した結果、直接観察によって頻繁な訪花が確認された昆虫（オオハナアブなど）体表の微生物相と、セイタカアワダチソウの花表面の微生物相の類似性が高かった。これらの研究結果より、花および昆虫体表の微生物群集の組成は、潜在的な訪花者昆虫の推定に利用できる可能性が示唆された。

### 淡水環境での硫黄酸化細菌の多様性と生態に関する研究

小島久弥

北海道大学低温科学研究所  
kojimah@pop.lowtem.hokudai.ac.jp

目的：硫黄酸化細菌は、硫黄、窒素、および炭素の循環をリンクする生物として地球上に広く分布し、元素循環に大きく影響すると考えられている。環境中の硫黄酸化細菌に関する従来の研究は海洋や極限環境に集中しており、一般的な淡水湖沼に生息する硫黄酸化細菌については不明な点が多い。淡水湖沼には特有の性

質を有する独自の硫黄酸化細菌が生息していることが予想され、これらの特性を明らかにすることは、海産種との比較を通して硫黄酸化細菌全体の理解に大きく貢献するものと期待される。本研究では、淡水湖沼に生息する硫黄酸化細菌の系統を特定し、淡水への適応機構をゲノム解析から推定することを目的とした。

方法：淡水湖沼の主要な硫黄酸化細菌を特定するために、部分循環湖の嫌気水層と、5つの湖沼の堆積物を対象として4つの硫黄酸化関連遺伝子のクローニング解析を行った。この結果から淡水環境を代表する硫黄酸化細菌の候補を2種選び、それぞれの基準株の完全ゲノム配列を決定して他の硫黄酸化細菌と比較した。

結果・考察：クローニング解析の結果、いずれの湖沼においても *Betaproteobacteria* 綱の硫黄酸化細菌が優占していることが示唆された。系統解析の結果、これらの生物が持つ硫黄酸化経路は、チオ硫酸酸化の結果として単体硫黄を生じるタイプ（不完全チオ硫酸酸化型）であると推定された。配列の多くについては種を特定するに至らなかったが、例外的に *Sulfuritalea hydrogenivorans* と *Sulfuricella denitrificans* に相当する配列が検出され、それぞれが嫌気水層と堆積物における主要種のひとつであることが示唆された。これら2種を淡水湖沼のモデル硫黄酸化細菌とみなし、それぞれの基準株の完全ゲノム配列を決定し比較解析を行った。その結果、両種とも同じ硫黄酸化経路を有することが明らかとなった。この経路は不完全チオ硫酸酸化型であり、硫黄酸化遺伝子の系統関係から推定されたものと一致していた。他の硫黄酸化細菌との比較から、両種が持つ硫黄酸化経路が淡水性硫黄酸化細菌に特徴的なものであることが示唆された。この硫黄酸化経路は、環境試料解析において種を特定することができなかった硫黄酸化細菌でも共通すると考えられる。解析した全湖沼においてこのタイプの硫黄酸化細菌が優占していたことから、本研究で特定された硫黄酸化経路は淡水湖沼環境に適応した硫黄酸化細菌の特徴である可能性がある。海洋と比較して硫酸イオン濃度が低い淡水環境では、還元型硫黄化合物の供給量が抑え

られていると考えられる。 *Sulfuritalea hydrogenivorans* と *Sulfuricella denitrificans* が有する硫黄酸化経路は、利用可能な基質が限られる条件下においてより多くのエネルギーを獲得するうえで有利に働いているのかもしれない。

イグチ科シクエストレート菌未知系統の  
探索と分類、および進化的・地理的起源の解明

折原 貴道

神奈川県立生命の星・地球博物館  
t\_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

目的：シクエストレート菌（トリュフを始めとした、胞子を能動的に射出しない被実性のきのこを形成する菌類）は担子菌門・子囊菌門のいずれにおいても収斂的に多様化しているグループである。中でも、担子菌類のイグチ科 (*Boletaceae*) はシクエストレート菌の多様性が特に高く、これらの菌の多様性や進化プロセスを探る上で重要なグループである。本研究では、イグチ科を対象とした、属レベルの未知系統シクエストレート菌の探索と分類を主要な目的とした。さらに、得られた知見を基に、新たに見出された系統における形態形質の進化や系統地理についての発展的考察を試みた。

方法：イグチ科のシクエストレート菌と地上生イグチ類を国内外でサンプリングし、子実体組織から核およびミトコンドリア DNA 計 5 領域 (nuc-ITS/LSU rDNA, *EF-1a*, mt-SSU rDNA, *ATP6*) のシーケンスを得た。各領域の単独もしくは結合データセットから、ベイズ推定および最尤法により系統樹を作成した。一部のデータセットについては Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2011) を用いて子実体形態の祖先形質推定を行った。同時に、対象としたシクエストレート菌の形態学的検討を行った。

結果・考察：本助成により行われた複数の系統解析の結果、イグチ科において、5つの属レベルの未知系統、1つの日本新産属、およびそれらに伴う複数の

種・亜種レベルの未知系統が確認された。上記6つの属レベルの系統は互いに単系統でなく、イグチ型の菌からシクエストレート菌へと並行進化したものであると考えられた。特に、ヤマイグチ属 (*Leccinum*) に近縁なシクエストレート菌 *Rossbeevera* 属の新規姉妹クレードが発見され、本クレードの菌に対して新属 *Turmalinea* Orihara & N. Maek. を設立し、属内の4新種および1新亜種を記載した。また、*Rossbeevera* 属においても2つの新種を記載した。両属は担子胞子や子実体無性基部の形態等により識別可能である。

これら2属と同様にヤマイグチ属と類縁関係の強いシクエストレート菌 *Chamonixia* 属はこれまで日本からは報告されていなかったが、国内で初めてタイプ種 *C. caespitosa* が採集され、本標本を含めた属内の系統解析の結果、*Chamonixia* 属菌は北米を起源とし、アジア経由でヨーロッパへと分布を広げた可能性が示唆された。

その他、これまで系統関係が不明であったコガネシヨウロタケ (学名未確定) やアフリカ原産である *Octaviania ivoryana* 等についても複数領域データセット系統樹や祖先形質推定の結果、属レベルの新規系統であることが新たに判明し、今後さらなる系統学的・分類学的検討を進める予定である。

菌糸融合および疑似有性生殖を利用した麹菌  
有用株の新規育種法の開発

丸山 潤一

東京大学大学院農学生命科学研究科  
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的：麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くより日本の伝統的醸造に利用され、また、異種タンパク質生産の宿主として用いられるなど、産業上有用な微生物である。複数の優れた形質を併せもつ株を取得するには、疑似有性生殖や、まだ見つかっていない有性生殖による交配育種が有効であると考えられる。なかでも、菌糸融合は交配育種で重要な過程の一つである。しかし、

1950年代の坂口謹一郎東京大学名誉教授らの報告以降、麴菌の菌糸融合に関連する研究はほとんどなく、交配育種を行うには知見が乏しい状況であった。本研究では、麴菌において異なる栄養要求性で標識した株を作製することにより、菌糸融合した細胞を高感度に検出、解析する実験系を確立した。

方法：ウリジン・ウラシル要求性株 ( $\Delta pyrG$ )、アデニン要求性株 ( $\Delta adeB$ ) を用い、菌糸融合するとそれぞれの栄養要求性が相補されることを利用し、必要な栄養源を含まない最少培地での生育を観察することにより菌糸融合の有無を判定した。

結果・考察：2つの栄養要求性株の分生子を混合して、必要な栄養源を含む寒天培地で混合培養を行った。形成された分生子を回収して、必要な栄養源を含まない最少培地に植菌した。麴菌の分生子は多核であるため、異なる株に由来する核を同一の細胞にもつことが可能である。その結果、多数のコロニーが観察され、これらは菌糸融合体によって形成された分生子に由来するものであることを確認した。この手法を利用して、混合培養における培地組成が麴菌の菌糸融合効率に及ぼす影響について解析を行った。その結果、栄養培地を用いた場合は菌糸融合効率が低く、最少培地の窒素源、炭素源、pHを変えると融合効率に変化することを明らかにした。

さらに、異なる栄養要求性株を対峙培養することにより、その境界線上で菌糸融合が行われるかを検討した。対峙培養での菌糸融合能力を評価する指標として、コロニーの境界線上で形成される菌核を利用した。菌核は菌糸が接着・融合を繰り返して形成する耐久構造であり、他の糸状菌ではその内部に有性生殖器官を形成することが報告されている。対峙培養を行ったところ、コロニーの境界線上に菌核の形成が見られ、栄養要求性が相補されていたことから、菌糸融合体により形成されたものであることを確認した。麴菌では菌核形成能力が低下していることから、有性生殖を行うにはその形成能力を向上させることが必要である。そこで、菌核形成を正に制御する転写因子 ScIR を

過剰発現させた結果、菌糸融合体による菌核形成が促進されることを明らかにした。

以上の実験により、2つの異なる培養方法において、麴菌に菌糸融合能力があることを証明した。今後はこの知見をもとに、麴菌における疑似有性生殖の再現、さらには、まだ見つかっていない有性生殖の発見による交配育種の確立につながることを期待される。

### 放線菌二次代謝生産を誘導する新規シグナル分子の化学構造と分子多様性の解析

荒川 賢治

広島大学大学院先端物質科学研究科  
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

目的：Streptomyces 属放線菌には A-factor などのシグナル分子を鍵物質とした二次代謝制御カスケードが存在しており、抗生物質生産を厳密にコントロールしている。我々が研究対象としている Streptomyces rochei 7434AN4 株は2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産し、それらの生合成遺伝子および制御遺伝子ホモログは線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされていた。本研究では本菌が生産する新規シグナル分子 SRB に注目し、単離・構造決定および分子構造多様性の解析を目指す。

方法：SRB の単離・構造決定を行うため、大量培養し、各種クロマトグラフィーで精製した。SRB 活性検出は *srrX* 破壊株の抗生物質生産性回復により行った。また、SRB 生合成経路の解析および基質特異性の解析を目指し、遺伝子破壊株の構築および SRB 誘導体の合成も行った。

結果・考察：160リットル大量培養し、精製して得られた化合物の高分解能質量分析を行ったところ、2つの活性成分の存在 (SRB1, SRB2) が示唆され、それらの分子式は  $C_{15}H_{24}O_5$ 、 $C_{16}H_{26}O_5$  であった。さらに NMR で解析したところ、いずれも 2,3-二置換-4-ヒドロキシブテノライド骨格を有する新規シグナル分子であった。本構造および 1' 位立体化学を確認するために化学

合成したところ、C-1'位の立体化学はRであることが分かった。今まで知られている放線菌微生物ホルモンはいずれも $\gamma$ -ブチロラクトン骨格であり、これによりシグナル分子の構造多様性を見出すことが出来た。

また、*srrX* (*orf85*) 近傍には還元酵素 *srrG* (*orf81*)、ホスファターゼ遺伝子 *srrP* (*orf83*)、P450 遺伝子 *srrO* (*orf84*)、チオエステラーゼ遺伝子 *srrH* (*orf86*) などがコードされており、SRB 生合成への関与が考えられた。そこで遺伝子破壊および代謝産物解析を行い、SRB の生合成機構解明を目指した。*srrO* 破壊株は LC、LM を生産したものの、シグナル分子について単離・構造決定をしたところ、活性成分は SRB1、SRB2 でなく、6'-デオキソ SRB1、SRB2 であった。本結果は 6'-デオキソ体が抗生物質誘導活性を有することを示唆しており、6'位の酸素官能基に関してはリセプター SrrA の基質認識が寛容であることが分かった。現在、炭化水素鎖長などが異なる誘導体についても合成し、それらの二次代謝誘導活性試験や他菌株への添加実験なども行い、分子多様性解析を進めている。

### プロテアソーム様巨大複合体プロテアーゼを分泌する好熱菌の応用に関する研究

渡部 邦彦

京都府立大学大学院生命環境科学研究科  
kwatanab@kpu.ac.jp

目的：本申請者が有馬温泉から単離したグラム陰性好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、プロテアソーム様の巨大分子複合体構造を有する特異なケラチン分解性プロテアーゼを分泌し、トリ羽毛を液状にまで分解する。このプロテアーゼはトリ羽毛などの難分解性動物タンパク質を強力に分解するだけでなく、常識を越える濃度の界面活性剤や有機溶媒に耐性を示す。そこで本研究では、ケラチン分解性プロテアーゼが持つ巨大分子複合体構造を明らかにすると共に、変性剤耐性と構造を繋ぐ分子基盤の解明を進め応用していくことを目的とする。

方法：H328 株からのケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の精製は、本菌株を羽毛含有培地で 60℃、37h 培養後、遠心により培養上清を得て、限外濾過濃縮（排除限界 500 kDa）→ウイルス分離用ゲル濾過クロマト Sephacryl S-1000→ショ糖密度（10-60%）勾配超遠心により行った。また電子顕微鏡解析は、上記精製画分に対しネガティブ染色法とフリーズレプリカ法を実施した。ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体を構成するタンパク質分子の同定は、ゲノムドラフト解析情報と、SDS-PAGE および MALDI-TOF/MS/MS 解析結果を照合させて行った。

結果・考察：精製操作のゲル濾過から 2 つの画分（Peak 1 および 2）、そして Peak 1 に対するショ糖密度勾配から活性画分と活性の弱い画分を得た。これらは 500 kDa 以上の分子量を有する巨大分子であり、特に Peak 1 画分から派生する 2 つはさらに巨大なウイルス大であることが判った。電顕解析から、ショ糖密度勾配超遠心から得られる 2 つの画分には、100 nm 大の脂質二重層膜を有する膜小胞構造が観察されたのに対し、Peak 2 画分では、膜小胞は観察されず 10 nm 大の粒子のみが無数に観察された。これはケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体が、10 nm 大の粒子としてこの膜小胞に含まれる場合に活性画分となることを示唆した。構成するタンパク質分子の同定から、唯一セリンプロテアーゼに該当する Protein B (MrH\_0844) を同定した。膜小胞を含む画分のみから、細胞表層タンパク質など 10 種類以上の他のタンパク質も同定することが出来たことから 10 nm 大の粒子がケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体であることが示唆された。このケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の各精製画分に対する耐性試験から、変性剤耐性、温度安定性を示す因子として膜小胞が大きく関与していることを示した。今後、この好熱性細菌の利点を生かしながら、驚異的な変性剤耐性の賦与と共に、細菌がもつ有効な機能である膜小胞を、新規で強力なバイオツールにすることが本研究の目指すゴールである。

### 有用微生物に細胞内磁気微粒子の形成能を 付与するための基盤研究

田 岡 東

金沢大学理工研究域自然システム学系  
aztaoka@staff.kanazawa-u.ac.jp

目的：磁性細菌は磁気オルガネラであるマグネトソームを合成し、これを磁気センサーとして用いることで、磁場に配向して遊泳する。任意の細菌にマグネトソームを合成させ、磁気感知能を付与できれば、細菌の進行方向や集積場所を磁力によって制御する新技術の開発が期待できる。マグネトソームを構成する蛋白質は、ゲノム DNA 中のマグネトソームアイランド (MAI) と呼ばれる領域に、合計31個の ORF からなる4つのオペロン (*mamAB*, *mamCD*, *mamXY*, *mms6*) にコードされており、膜小胞の形成、鉄の取り込み、磁鉄鉱結晶合成など、マグネトソームの形成に関わっている。本研究では、これらのオペロンを大腸菌内で発現させ、磁気オルガネラを合成させることを目的とした。

方法：*Magnetospirillum magneticum* AMB-1 の MAI の4つのオペロンを2種類のプラスミドにクローニングし、*mamAB* 発現ベクター (pET-AB: 23.0 kb) と *mamCD*, *mamXY*, *mms6* 発現ベクター (pBBR-CX6: 18.7 kb) を作製した。pET-AB は蛋白質発現ベクター pET-29b 由来、pBBR-CX6 は広宿主域ベクター pBBR1 由来のプラスミドで、各オペロンの上流には IPTG 誘導可能な T7 プロモーターを配置した。作製したプラスミドは、塩基配列を確認し、蛋白質合成に影響する変異のないものを選別した。MAI の遺伝子のうち *mamE*, *P*, *T* は磁鉄鉱合成に必須のシトクローム *c* をコードしている。そこで、ヘム *c* 合成遺伝子群をコードするプラスミド pEC86 (p15A 由来) を共発現させた。これらの compatibility を示す3種類のプラスミド pET-AB, pBBR-CX6 及び pEC86 を大腸菌 BL21 (DE3) 及び HMS174 (DE3) に共形質転換し、MAI 発現株を作製した。

結果・考察：IPTG により蛋白質発現を誘導したところ、いずれの MAI 発現株とも、SDS-PAGE で野生株に見られない多数の蛋白質バンドを確認することができた。また、ウエスタンブロット法で、各オペロン1つ以上の蛋白質 (*MamA*, *K*, *P*, *C*, *Mms6*, *FtsZ-like*) の発現を確認し、マグネトソーム形成蛋白質群の発現に成功したと判断した。磁鉄鉱 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) は  $\text{Fe}^{2+}$  と  $\text{Fe}^{3+}$  化合物であり、その合成には微好氧的環境が必要である。そこで、MAI 発現株をキナ酸鉄と硝酸塩を加えた液体培地に植菌し、1% 酸素 99% 窒素またはアルゴンガス中で培養し、磁気微粒子の合成を調べた。しかし、本条件では細胞の磁性は確認できず、磁気微粒子の合成も認められなかった。現在、磁鉄鉱合成の条件検討のため培養条件の検討を進めている。今後は、広宿主域ベクターを利用し、大腸菌とは生理的条件の異なる細菌に MAI 発現系を導入し、磁鉄鉱合成条件の検討を行う予定である。

### 変性してもすぐにまき戻る「変性しない酵素」 —好塩性酵素の大量生産と産業的利用

徳 永 正 雄

鹿児島大学農学部  
tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

目的：好塩性酵素は総荷電が大きくマイナスに偏った酸性蛋白質である。広い pH 領域で多量のマイナス荷電をもち、通常酵素が機能できない高濃度塩存在下でも水分子を引きつけて「塩析効果」を受けず十分に機能できる。酵素の高次構造を壊すようなストレス環境下でも多量のマイナス荷電による高可溶性と荷電の反発による「非凝集性」を示し、可逆的な構造回復能を保持できる「変性しないタフな酵素」である。本研究では、大腸菌などを宿主に用いた好塩性タンパク質の大量発現系の確立とその産業的利用をめざして、好塩性サーモライシン (HaTML) の塩依存的活性化、好塩性  $\beta$ -ラクタマーゼ (HaBLA) の有機溶媒耐性、及び好塩性金属結合タンパク質 (HaHP) による重金属回収

について検討した。

方法：好塩性酵素の大量発現系の構築のため、大腸菌および *Brevibacillus choshinensis* を発現宿主に用いて検討した。発現精製した pro 型 HaTML の様々な性質における塩依存性を検討した。また好塩性酵素は、高濃度塩存在下と同様に水分活性が低いと考えられる有機溶媒存在下でもより高い活性を示すと予想されたので、好塩性・非好塩性の BLA を発現精製し、有機溶媒の影響を比較した。

結果・考察：HaBLA および HaHP は好塩性の分泌蛋白質であるがジスルフィド結合は持たず高い可溶性をもっているため、大腸菌細胞質内発現でも活性のある状態で大量に発現した。さらに *B. choshinensis* を宿主に用いた場合、HaHP では大腸菌の 3 倍程度（～500 mg/liter）の高発現が認められた。プロテアーゼは一般的に前駆体型（pro 型）で発現され、pro 領域が切り離されて活性化される。HaTML は大腸菌内では pro 型で生合成され、精製後塩を加えることによって初めて成熟型に切断され活性化された。プロテアーゼのプロセシングが塩依存性を示した最初の例と思われる。CD スペクトルは、前駆体と成熟型で大きな違いはなく、塩がなくても前駆体はほとんど正しい 2 次構造をとっていることが示唆された。しかし成熟型の 2 次構造の変性温度を調べたところ、塩存在下では変性温度の上昇が見られ、構造安定化が示された。成熟型の酵素活性は、NaCl 濃度依存性を示し、1, 2, 3, 4 M の NaCl 存在下でそれぞれ塩を加えない場合の 4.0, 8.7, 21.0, 30.8 倍という高い活性を示した。*Halomonas* 由来好塩性 HaBLA と大腸菌由来非好塩性 BLA (EcBLA) の有機溶媒耐性を比較検討したところ、アセトン等の水可溶性溶媒の存在下における酵素活性とそれら溶媒処理後の残存活性は、いずれも HaBLA の方がより高かった。また HaHP の重金属結合能を測定した結果、HaHP 1 分子当たり Ni, Cu, Zn などの重金属が 10 分子程度結合することが明らかとなった。

## 分泌シグナルに基づく細胞表層タンパク質の ターゲティング機構の解明

山本博規

信州大学繊維学部  
ymmthrk@shinshu-u.ac.jp

目的：厚い細胞壁により覆われているグラム陽性細菌は、筒状部位（側壁）および隔壁のペプチドグリカン（PG）を限定的に分解することにより、桿状形態を維持した増殖が可能となる。枯草菌の場合、これらの限定分解に関与している細胞壁溶解酵素は 4 種類の DL-エンドペプチダーゼ（LytE, LytF, CwlO, CwlS）である。これらのうち、LytE と CwlO は主に側壁の限定分解に、LytF と CwlS は隔壁の分解に機能しており、ある程度明確な役割分担がなされている。 $\Delta\text{lytE } \Delta\text{cwlO}$  の二重欠損株は側壁伸長が行われないため合成致死性を示し、LytE とドメイン構造が類似している LytF や CwlS の発現を誘導した場合でも、この合成致死性を相補できないことがわかっている。そこで、本研究ではドメイン構造は類似しているものの、主に側壁の PG を分解する LytE と、隔壁の PG を分解する LytF に焦点を当てて、両酵素のターゲティングがどのような機構により制御されているのかを解明することを試みた。

方法：LytE および LytF のシグナルペプチド（SP）を入れ替えた  $\text{SP}_{\text{LytE}}\text{-LytF}$ ,  $\text{SP}_{\text{LytF}}\text{-LytE}$  を IPTG 誘導により発現させ、それらの分泌量、局在性および  $\Delta\text{lytE } \Delta\text{cwlO}$  合成致死の相補性について調べた。さらに詳細に両 SP の機能を調べるために、前半及び後半部分を入れ替えたキメラ SP ( $\text{SP}_{\text{EF}}$  および  $\text{SP}_{\text{FE}}$ ) や、3 つの領域（+チャージ、疎水性、シグナルペプチダーゼ認識部位）を入れ替えたキメラ SP ( $\text{SP}_{\text{EFF}}$ ,  $\text{SP}_{\text{FEF}}$  および  $\text{SP}_{\text{FFE}}$ ) を作成し、側壁の限定分解における SP の役割を調べた。

結果・考察： $\text{SP}_{\text{LytE}}\text{-LytF}$  を発現させた場合、分泌された LytF は本来の隔壁と極だけでなく側壁にも局在していた。さらに  $\Delta\text{lytE } \Delta\text{cwlO}$  合成致死の相補性について調べた結果、部分的ではあるものの相補できるように

なっていた。一方、SP<sub>LytF</sub>-LytE を発現させた場合は、側壁への局在量が減少し、合成致死の相補性も本来の SP<sub>LytE</sub>-LytE に比べて著しく低下していた。以上の結果から、両酵素の SP にそれぞれの局在性と機能を支配する因子が含まれている可能性が示唆された。そこで SP の機能をさらに詳細に調べるために、キメラ SP-LytF 発現株を作成した。それぞれのキメラ SP を用いて発現させた LytF は、ほぼ同じ量が細胞表面および培地中に分泌されていた。次に機能面での影響を調べた結果、前後を入れ替えた SP では、その前半部分が重要であり、さらに 3 つの領域を入れ替えた SP では、疎水性領域が重要であることが明らかとなった。これらの結果から判断すると、SP<sub>LytE</sub> の疎水性領域の前半部分に分泌後の機能を支配する領域が存在する可能性が示唆された。

アラニン排出輸送体を利用した新たな  
アミノ酸発酵生産技術の確立を目指した  
基盤研究

米 山 裕

東北大学大学院農学研究科  
yoneyama@bios.tohoku.ac.jp

目的：アミノ酸発酵の正否の鍵は優良生産菌株の造成であるが、アミノ酸合成経路の強化による手法には限界がある。リジン排出輸送体の発見以降各種アミノ酸排出輸送体が同定され、基質排出過程の制御による生産性向上の可能性が注目されている。我々は遺伝学的手法により大腸菌のアラニン (Ala) 排出輸送体 YgaW の同定に成功した。そこで、Ala 排出能の制御による Ala 生産効率の向上を目指し、YgaW の構造と機能の解析に加え、*ygaW* 遺伝子の発現制御解析を行った。

方法：YgaW の構造と機能をシステイン (Cys) スキャンニング法を用いて解析するために、YgaW の 3 つの Cys 残基を Ala に置換した Cys-less YgaW を PCR 法を用いて構築し、その活性をアラニルアラニン (Ala-Ala) に対する宿主の感受性の変化と、反転膜小胞内へ

の [<sup>3</sup>H]Ala の蓄積により評価した。また、*ygaW* 遺伝子の発現に及ぼす制御因子 Lrp の影響を、*ygaW* 上流域 (60~300 塩基) とプロモーターを欠いた *lacZ* 遺伝子との融合遺伝子を構築し評価した。

結果・考察：YgaW 欠損株 ( $\Delta ygaW$ )、YgaW 過剰発現株 ( $\Delta ygaW/pYgaW$ ) 及びその親株細胞内への [<sup>3</sup>H]Ala の蓄積量を測定した結果、親株に比べ  $\Delta ygaW$  株は約 2 倍、 $\Delta ygaW/pYgaW$  は 1/2 の蓄積量を示した。次に、YgaW の排出活性を評価するために、YgaW 過剰発現株と  $\Delta ygaW$  株より調製した反転膜小胞内への [<sup>3</sup>H]Ala の取り込み活性 (排出活性に相当) を調べた結果、この活性は小胞外の Ala 濃度及びエネルギー (2.5 mM NADH) に依存していた。これは Ala の濃度勾配に従った活性であるため、200 mM Ala をロードした反転膜小胞を調製し [<sup>3</sup>H]Ala の取り込み能を調べた。その結果、反応開始時の反転膜小胞外の基質濃度を小胞内と同じ 200 mM とそれより低い 0.34  $\mu$ M に設定した場合、いずれもエネルギー依存的な [<sup>3</sup>H]Ala の小胞内蓄積が認められたことから、YgaW はエネルギー依存的な Ala 能動輸送活性をもつことが明らかとなった。次に、Cys-less YgaW の活性を Ala-Ala に対する感受性として調べた結果、野生型 YgaW に近い活性をもつことが示唆された。また、Cys-less YgaW 発現株の反転膜小胞を調製し、[<sup>3</sup>H]Ala の蓄積量を調べた結果、エネルギー依存的な能動輸送活性を示した。細胞内外に局在することが予想されるアミノ酸残基を Cys に置換した Cys-less YgaW 誘導体を作製し、蛍光ラベル法によって YgaW のトポロジー解析を行った結果、4 つの膜貫通領域をつなぐ第 1 ループ内の Ser41 及び第 3 ループ内の Trp107 が細胞外に局在することが示唆された。さらに、種々の長さの *ygaW* 遺伝子上流域をもつレポーターアッセイを行った結果、Lrp による制御領域が *ygaW* 遺伝子の 180 bp~240 bp 上流に存在することが示唆された。

## D-サイクロセリン生合成機構の解明と 非天然型アミノ酸合成への応用

的 場 康 幸

広島大学大学院医歯薬保健学研究院  
ymatoba@hiroshima-u.ac.jp

目的：近年の創薬研究において、非天然型アミノ酸をビルディングブロックとする医薬品の開発が精力的に行われている。しかしながら、非天然型アミノ酸は自然界からの抽出や発酵法による生産が難しい。また、アミノ酸の有機合成では、光学活性体が得られない場合が多い。今後の創薬研究を進展させていくためには、様々な構造を有する光学活性非天然型アミノ酸の合成手法を開発していく必要がある。

抗生物質のひとつ D-サイクロセリン (D-CS) は、*Streptomyces lavendulae* などにより産生される D 型で環状のアミノ酸類似化合物であり、結核の二次選択薬として用いられる。申請者らの研究グループは、D-CS 生合成機構の解明をテーマに研究を進めてきた。その成果のひとつとして、*S. lavendulae* の染色体 DNA から、D-CS 生合成に関わると推測される遺伝子クラスター (*dcsA*~*dcsJ*) を取得することに成功した。

本研究では、D-CS の生合成機構を明らかにするとともに、D-CS がアミノ酸類似化合物であることに着目し、D-CS 生合成酵素を利用して多様な光学活性非天然型アミノ酸を産生することを目的とする。

方法：クラスター中に含まれる個々の遺伝子から産生される酵素を、大腸菌を用いて大量調製した。得られた組換え型酵素を用い、どのような反応を触媒するかを調査した。さらに、DcsD と DcsG については、X 線結晶構造解析と変異体解析を実施し、触媒に関わる残基を同定した。

結果・考察：個々の酵素の機能解析から、D-CS 生合成経路を確定できた。まず、DcsA と DcsB がヒドロキシ尿素を供給し、DcsE が O-アセチル-L-セリンを供給する。続いて、DcsD の作用により O-アセチル-L-セリンとヒドロキシ尿素とが反応し、O-ウレイド-L-セリンが

生じ、DcsC の作用により D 体に変換された後、ATP 依存性の酵素 DcsG により環状化され、D-CS が合成される。特に、DcsC、DcsD、DcsG を含む酵素反応液に、市販されている O-アセチル-L-セリンとヒドロキシ尿素を加えることによって、D-CS を試験管内で合成することに成功した。

DcsC、DcsD、DcsG の基質特異性を調査したところ、DcsC は O-ウレイドセリンに対して特異性を持つことが明らかとなった。その一方で、DcsD は O-ウレイド-L-セリン合成のみならず、L-システイン合成活性を有しており、DcsG は D-ホモシステインや D-ホモセリンを環状化する活性を持つことが明らかとなった。DcsD と DcsG に関しては X 線結晶構造解析を行い、触媒反応に重要と思われる残基を予測するとともに、変異体解析によりその重要性を明らかにした。今後、得られた構造情報を基に、部位特異的変異を導入することで、様々な光学活性非天然型アミノ酸の合成に応用できると考えられる。

## バイオ素材産業の創成を目指したウロン酸 酸化発酵微生物の選抜と機能解析

阿 野 嘉 孝

愛媛大学農学部  
anoy@agr.ehime-u.ac.jp

目的：果物果皮等に多量に含まれる複合多糖ペクチンは、ウロン酸を骨格に構成されており、セルロース、リグノセルロース等に次ぐ再生可能なバイオマス資源として注目されている。本研究では、自然界に広く分布するウロン酸を有価物へと効率よく変換しうる微生物の探索とその機能を明らかにすることを目的とし、バイオ素材産業の創成のための科学基盤を得ることを目指した。

方法：本研究では、酢酸菌等に見られる高速かつ高効率な酸化変換が可能な代謝系「酸化発酵」の利用を視野に入れて、まず、研究室保存の酢酸菌株を対象としたスクリーニングを実施した。*Acetobacter* 属、*Glu-*



*conobacter* 属, *Gluconacetobacter* 属, *Asaia* 属, *Acidomonas* 属, *Kozakia* 属に属するさまざまな酢酸菌株をウロン酸含有培地で培養し, 得られた細胞から細胞膜画分を調製した. 人工電子受容体を用いたアッセイ系により, ウロン酸に対する酸化活性を調査した. 次に, 細胞膜に見出したウロン酸酸化活性を解析するため, 分子生物学的解析が行いやすい *Gluconobacter oxydans* NBRC 12528 を対象に研究を進めていった. ウロン酸の酸化生成物については HPAEC-PAD による定性分析を実施した.

結果・考察: さまざまな酢酸菌株を対象にウロン酸酸化活性を調査したところ, 意外にもウロン酸酸化活性は酢酸菌に広く存在していた. 酢酸菌は自然界では花や腐敗した果実等からよく単離され, そこに含まれる糖や同じ環境に生息する酵母によって生産されたアルコールを強力に酸化することが知られている. 今回, 酢酸菌は真菌類等によって生成されたペクチン分解物であるウロン酸も酸化する能力を有していることが初めて示された. *G. oxydans* NBRC 12528 はウロン酸を単一炭素源とする培地では全く生育を示さないが, ウロン酸酸化活性は恒常的に有していた. 本菌はグリセロールとウロン酸を炭素源に用いた培養では良好な生育を示したが, 培地中のウロン酸量の変化は確認できなかった. しかし, 休止菌体とウロン酸とを高通気条件下で直接反応させると, 短時間のうちにウロン酸の消失が確認できた. ウロン酸酸化生成物の HPAEC-PAD による分析の結果から, ウロン酸の減少に伴ってアルダル酸の増加が確認できた. このことから, 本菌の細胞膜にはウロン酸のアルデヒド基をカルボキシル基に酸化する酵素が存在していることが明らかとなった. アルダル酸は広く工業的用途がある化合物であり, 米国エネルギー省 (DOE) が定める Top 12 の基幹物質にも含まれている. 本酵素反応は, 果物加工品の製造過程で廃棄される果皮残渣のリファイナリー技術への応用が期待できる.

## バイオコンバージョンによる植物油脂からの 果実様香ラクトン生産について

金 内 誠

宮城大学食産業学部  
kanauchi@myu.ac.jp

目的: ラクトンは, 果実の香りを示すフレーバーとして, 重要な成分として利用されている. ウイスキーもろみでは, 乳酸菌と酵母の作用により  $\gamma$ -ラクトン類を生産することが報告されている. しかし, ラクトンの生成の条件に関して, 特に  $\gamma$ -ラクトンを高生産するための前駆物質であるヒドロキシ脂肪酸を生成する乳酸菌機作に関する報告はない. そこで本研究では, 植物油脂の構成脂肪酸をヒドロキシ化する乳酸菌の分離とその酵素, さらにヒドロキシ化脂肪酸からの  $\gamma$ -ラクトン高生産条件について検討した.

方法: 食品・食材13サンプルから179株の乳酸菌を得, これらを0.1%オレイン酸と0.1%カゼインを含む液体培地で培養後, ヒドロキシ脂肪酸を確認した. 分離株は定法に従い, 形態学的, 生理学的, 分子生物学的同定を行った. この分離株のヒドロキシ脂肪酸変換のための, 最適培養温度や時間を検討した. また, 実用酵母や研究室保存酵母48株のヒドロキシ脂肪酸からの香気ラクトン生成能も GCMS にて検討した. ただし, ラクトンは抽出しそのまま, ヒドロキシ脂肪酸はトリメチルシリル化処理後に GCMS 分析を行った.

定法に従い分離株 Y-20 のゲノム DNA を制限酵素で部分分解し, 大腸菌用ベクターに挿入してライブラリを作製, 大腸菌コンピテントセルに導入した. 得られた形質転換体から脂肪酸ヒドロキシ活性 (*fah*) を示す株を選択した. さらに, 単離した *fah* を 6×His タグ付加発現ベクター (pCold) に挿入したプラスミド (pHis - Fah) を構築し, 脂肪酸ヒドロキシ酵素 (His-FAH) を発現させた. これを Ni カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製した. これを Factor Xa 処理により 6×His タグを外し, 脂肪酸ヒドロキシ酵素 FAH とした. *fah* の塩基配列は自動 DNA シークエ

ンサーを用いて決定した。

酵素活性は  $0.8\mu\text{M}$  NADH,  $160\mu\text{M}$  オレイン酸, 20% DMSO を含む緩衝液 (50 mM リン酸 - クエン酸緩衝液, pH 3.0~7.0) に溶解させ,  $30^\circ\text{C}$  で 1 時間反応後,  $A_{340}$  より測定した。

結果及び考察: 食品から乳酸菌 179 株中, 高脂肪酸ヒドロキシ変換乳酸菌 *Lactobacillus sakei* Y-20 を分離した。Y-20 は,  $15^\circ\text{C}$ , 48 時間で, オレイン酸を 10-ヒドロキシ脂肪酸に変換し, さらに実用ビール酵母により  $\gamma$ -ドデカラクトンに変換することが明らかとなった。このときの変換率は 90% 以上であった。また, クローニングの結果, ロイシン起点とする 405 アミノ酸残基をコードする 1215 塩基配列が脂肪酸ヒドロキシ酵素遺伝子 (*fah*) の全塩基配列であった。また, アミノ酸配列を相同性検索すると, *L. sakei* の膜表層タンパク質とは 60% の相同性で, *Lactobacillus curvatus* の NlpC P60 タンパクとは 90% 以上と高い相同性であった。本酵素の至適 pH は 6.0, 分子量 46 kDa で, NADH を捕因子とするものであった。マンガン, 鉄, コバルトイオンにより賦活され, 銅イオン, 水銀イオンとアジ化ナトリウムにより阻害される酵素であった。

### 放線菌のセシウム蓄積に関する研究

安 齊 洋次郎

東邦大学薬学部  
yanzai@phar.toho-u.ac.jp

目的: 2011年3月の東北地方太平洋沖地震により発生した福島第一原子力発電所事故による放射性物質の拡散は福島県及び周辺地域に多大な損害をもたらした。中でも,  $137\text{Cs}$  による環境汚染は最も深刻な問題の1つである。 $137\text{Cs}$  による農作物等の汚染は, 1986年のチェルノブイリ原子力発電所事故でも確認され, 特に野生キノコへの  $137\text{Cs}$  の蓄積量は他の周辺植物とは比較にならないほど高かった。当研究室では, ヒラタケの細胞内に取込まれたセシウムイオン  $\text{Cs}^+$  は細

胞内のポリリン酸に吸着されることで, また, 気菌糸・孢子形成などの真菌と同様な形態分化をする放線菌でも細胞内に取込まれた  $\text{Cs}^+$  はポリリン酸に吸着されることにより, 多量のセシウム  $\text{Cs}$  が蓄積されることを明らかにしている。これらの微生物細胞内への  $\text{Cs}$  高度蓄積性を理解するには,  $\text{Cs}^+$  の取込みや吸着などの各機能を解明する必要がある。本研究では, これら機能に着目し, 放線菌の  $\text{Cs}$  蓄積メカニズムの解明を試みた。

方法: カリウムイオン  $\text{K}^+$  チャネル *KcsA* の研究が進んでいる *Streptomyces lividans* TK24,  $\text{Cs}^+$  のポリリン酸への吸着が確認された *Streptomyces* sp. K202 を用いた。遺伝子欠損株作成には, 各菌株のゲノムデータを用いた。遺伝子欠損株の比較には, 塩化セシウム  $\text{CsCl}$  を添加した培地を用いた。

結果・考察:  $\text{Cs}^+$  は同じアルカリ金属イオンである  $\text{K}^+$  の輸送系を介して細胞内に取込まれ, 負の電荷をもつポリリン酸に吸着されると考えられる。細菌には種々の  $\text{K}^+$  輸送系が存在し, 主なものとして,  $\text{K}^+$  移送系の *Trk* 移送系, *Kdp* 移送系,  $\text{K}^+$  チャネル *KcsA* がある。細胞内のポリリン酸の合成にはポリリン酸キナーゼ *PPK* などが関与する。公開されている *S. lividans* TK24 ゲノム配列上 (NZ\_GG657756) には,  $\text{K}^+$  チャネルの遺伝子が2つあり, *SSPG\_00189* (*kcsA*) は  $\text{K}^+$  チャネル *KcsA* (160aa), *SSPG\_00653* *KcsA* と同様に  $\text{K}^+$  チャネルの小孔領域の共通配列 *TTVGYG* をもつ 276aa をコードする。一方, ゲノム解析した *Streptomyces* sp. K202 では,  $\text{K}^+$  チャネルの遺伝子は1つだった。本遺伝子にコードされたタンパク質 (225aa) は *TTVGYG* をもち, *KcsA* 類似タンパク質 *KcsA2* とした。

野生株 *S. lividans* TK24 と同様に *kcsA* 欠損株の生育が抑制された 12.5 mM  $\text{CsCl}$  添加最小寒天培地上で *SSPG\_00653* 欠損株は生育した。これは *SSPG\_00653* がコードする  $\text{K}^+$  チャネルが  $\text{Cs}^+$  の細胞内取込みに関与することを示唆する。今後, 両菌株の  $\text{Cs}$  蓄積に関与すると推定される種々の遺伝子の欠損株の詳細な解析により, 放線菌における  $\text{Cs}$  の蓄積に関わる機構が解

明できると考える。

ゲノム情報を基盤にした感染環境における  
細菌間共生現象の解析と応用

後藤 直正

京都薬科大学薬学部  
ngotoh@mb.kyoto-phu.ac.jp

目的：純粋な培養環境での細菌の性状解析は古くから行われてきた。しかし、感染部位という環境は、複数の細菌が存在し、互いに単一の培養下では見ることができない多様性を発揮し、共生している場である。事実、感染症の検査材料には多種の細菌が混在（混合感染）し、原因菌が別の細菌に起き変わる（菌交代症）が少なくはない。本研究では、院内感染で分離頻度が高く、また混合感染や菌交代症の原因のグラム陰性菌である *Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）とグラム陽性菌である *Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）の共生現象について、混合感染や菌交代症の防止策の考案の情報とすることを目的として行った。

方法：緑膿菌遺伝子のノックアウトはすでに報告した *suc* 遺伝子を用いた相同的組換え法によって行った。

また、培地中の *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) や 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO) の量は薄層上で分離し、UV 検出によって比較した。緑膿菌による黄色ブドウ球菌の増殖阻害は混合培養における菌数の変化によって調べた。

結果・考察：緑膿菌 PAO1 株に対して高感受性を示す黄色ブドウ球菌の探索を行ったところ、ゲノム情報が明らかな TY825 がもっとも感受性が高かった。そこで、本株をインディケーター株として、緑膿菌 PAO1 株から構築した Tn5 ランダム挿入変異株ライブラリー 9,085 株のなかから増殖抑制活性の低下した変異株を検索し、Tn 挿入位置を調べたところ、quorum sensing (QS) や *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) システムの制御に関わる遺伝子群を含む 43 遺伝子群が TY825 株の増殖抑制に関わる遺伝子であることが分かった。

これらの 43 遺伝子の中に機能未知な RND 型排出ポンプ MexMN のペリプラズムコンポーネントをコードする *mexN* が含まれていたことから、MexMN がグラム陽性菌の増殖を阻害する PQS や 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO) を排出することで、黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制に寄与しているという仮説を立てた。

本仮説を検証するために *mexMN* 欠損株を新たに作成したところ、培養上清中の PQS・HQNO の量が減少することと、TY825 株に対する増殖抑制作用が低下することが分かった。これらの結果から、緑膿菌の RND 型排出ポンプ MexMN は PQS・HQNO を排出することで黄色ブドウ球菌の増殖抑制に寄与していることが明らかとなった。

以上の緑膿菌と黄色ブドウ球菌をモデルに用いた研究の成果から、細菌のみならず、生物界に広く分布する異物排出システムが菌交代現象に大きな役割を果たしていることを明らかにすることができた。感染部位を模式化した共培養環境を設定し、遺伝子の発現制御を解析することによって、相利から片利の共生関係が引き起こされる詳細なメカニズムを明らかにする研究を進展させることが必要であるが、異物排出システムの阻害薬の創生による菌交代症の防止薬の開発が有用であることを示すことができた。

ポリエステル分解性クチナーゼをモデルとした  
 $\alpha/\beta$  ヒドロラーゼの分子改変技術の開発

河合 富佐子

京都工芸繊維大学ナノ材料・デバイス研究センター  
fkawai@kit.ac.jp

目的：生分解性プラスチック及びバイオポリマーのほとんどがポリエステルである。ポリエステルはジオールとジカルボン酸から合成され、ジカルボン酸の構造から脂肪族、芳香族および脂肪族芳香族に分類される。芳香族はほとんどすべてがポリエチレンテレフタレート (PET) である。脂肪族芳香族ポリエステルは

PET 構造に脂肪族基を導入させた構造を有する。エステル結合は  $\alpha/\beta$  ヒドロラーゼに属するリパーゼファミリーの酵素で分解されるが、酵素の構造と基質特異性からクチナーゼがポリエステルの分解に関与することが周知の事実である。しかし、PET の分解に関しては *Thermomyces insolens* (formerly *Humicola insolens*) 及び *Thermobifida* 属酵素以外に顕著な分解を示すものはない。その要因として、酵素の活性中心構造と PET ポリマー鎖にゆらぎを与えるために必要な耐熱性を兼ね備えた酵素が極めて限定されることが挙げられる。クチナーゼはポリエステル以外にも各種エステル化合物の処理及び合成への応用可能な有用酵素である。本研究は堆肥由来耐熱性放線菌のクチナーゼ遺伝子の改変と構造解析を行い、より効率的な酵素作成のための分子改変技術を開発するものである。

方法：使用した遺伝子組換え酵素は *Thermobifida alba* AHK119 由来の pQE80L-*est1* or *est119* (*E. coli* Rosetta-gami B(DE3) 発現) であり、登録番号は BAK48590.1 及び BAI99230.2 である。Est119 のタンパク質構造は PDB に 3VIS として登録されている。3VIS に基づいて、Est1 の 3D モデリングを実施した。変異酵素の作成には、KOD-Plus-Mutagenesis kit (TOYOBO) を使用した。

結果・考察：Est119 の結晶構造に基づき Est1 の構造推定を行った結果、両者の差異は触媒 3 残基を含む基質結合ループに集中していた。最近解明された Est1 の構造 (未公表) は Est119 とほとんど差異がないが、Est1 は Est119 の約 2 倍の活性を示した。従って、ループ部分の微細な差異が活性に大きく影響していると考えられる。また、Est119 に対して行ったランダム変異の結果に基づき、Est1 の A68, S219 及び M259 に変異を導入した。Est1 および Est119 の野生型及び変異型酵素の活性及び耐熱性の比較から、ループ構造におけるプロリン数が特に耐熱性の増強に重要であることが判明した。これらの中では Est1 (A68V/S219P) が最も耐熱性に優れ、脂肪族及び脂肪族芳香族コポリエステルを全て分解した。芳香族 (コ) ポリエステル分解酵素は脂

肪族を一般的に分解できるが、逆は難しいので、広範なポリエステル分解には芳香族 (コ) ポリエステル分解酵素が望ましい。また、本酵素は PET フィルムを親水化し、PET 3 量体モデル基質を分解した。これらの分解産物は LC-IT-TOF-MS で解析し、エステル結合の加水分解が確認できたので、本酵素は PET 分解酵素の 1 種である。しかし、PET フィルムの十分な分解に必要な 65°C 以上で長時間 (約 1 週間) 活性を維持するという条件は満たさなかった。さらに改良が必要であるものの、PET を含むポリエステル全般の表面処理には十分な機能を有する。他方、*Saccharomonospora viridis* AHK190 から新規クチナーゼ Cut190 をクローニングした。これら 3 つのクチナーゼタンパク構造の比較解析を行い、真の PET 分解酵素の開発と反応機構の解明を目指す。

#### 粘液細菌の分離と生理活性物質の探索

木村 義雄

香川大学農学部  
kimura@ag.kagawa-u.ac.jp

目的：天然物由来の生理活性物質は新規の構造と高い生理活性を有することが多いが、天然物由来の医薬品は減少の一途をたどっている。天然物由来の医薬品は、放線菌由来のものが、6-7割を占めているが、今日、新たな放線菌を分離することは難しいとされている。

粘液細菌の *Sorangium cellulosum* は、細菌の中で最も多くの遺伝子を有する細菌で、自然界に広く存在しているが、生育が遅く、また、純化が難しいため、日本ではほとんど分離されていない。そこで粘液細菌は新たな生理活性物質を生産する微生物資源となりうる。粘液細菌の *Sorangium* 属の分離と生理活性物質の探索を試みた。

方法：採取した土壌をろ紙培地にのせ、1ヶ月ほど培養し、生育してきた *Sorangium* 属を新しいろ紙培地に

植菌した。これを数度繰り返し、*Sorangium* 属を分離した。ついで高温処理、浸透圧及び酸化ストレス処理など様々な純化方法を用いて、分離菌の純化を行った。純化された菌が、*Sorangium* 属であることを 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から確認を行った。純化菌を種々の培地にて培養を行い、菌体及び XAD-16 樹脂からアセトン抽出し、これを用いて微生物の生育阻害解析及び LC/MS 解析を行った。

結果・考察：採取した土壌から、*Sorangium* 属を分離するため、種々の培地に土壌を置き、分離に適した培地を検討した。その結果、ろ紙を炭素源、窒素源として硝酸カリウム及び複数の金属塩を含む培地にて良好な子のうからなる子実体の形成が顕微鏡を用いて観察され、採取した土壌の約 10% 強において *Sorangium* 属の分離がなされた。

分離された *Sorangium* 属の純化を行うため、胞子で満たされた子のうからなる子実体を 50~65℃ で、15分~1 週間置いた後、ろ紙培地に植菌し、*Sorangium* 属の生育がみられたものは、子実体をカシトン培地などの栄養培地に移し、混入細菌の生育により純化できているかどうかを確認した。その結果、50℃ で15分の加熱で死滅するものから、60℃ で1週間おいても生育できる株もあり、分離株によって様々な熱耐性を示したので、高温から徐々に低温処理することで純化を行った。これにより、分離菌の 20% 程度は純化できたが、効率が悪く、引き続き浸透圧や酸化ストレスの負荷などによる純化方法の検討を行っている。

純化された *Sorangium* 属の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した結果、*Sorangium cellulorum* と 99-100% の相同性が見られたことから、分離された株は、*Sorangium* 属であることが確認された。

*Sorangium* 属の純化株を amberlite XAD-16 を添加した 6 種類ほどの培地を用いて培養を行い、XAD-16 と菌体からアセトン抽出物を調製し、かび、酵母、細菌に対する生育阻害をみたところ、特に *Aspergillus niger* などのかびに対する強い生育阻害が見られた。

*Sorangium cellulorum* は既に欧米で分離されており、

46種の新規化合物が同定されている。抽出物を LC/MS 解析したところ、既知の化合物が12種程度、既知とは異なる分子量を有する化合物が15化合物ほど確認された。現在、これらの化合物を用いて有用生理活性物質の探索を試みている。

### ナノバイオマーカーを利用したモデル腸内 フローラのリアルタイム機能解析

中 村 修 一

東北大学大学院工学研究科  
naka@bp.apph.tohoku.ac.jp

目的：運動性細菌が持つべん毛の回転（回転速度、回転方向）は、環境中の化学物質濃度や pH などのわずかな変化を検知してダイナミックに変化する。本研究では、細菌べん毛の回転をマーカーとして、乳酸菌の代謝活動をモニターすることを試みた。

方法：乳酸菌として *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC:100933 を使用した。べん毛細菌として *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を用いた。*L. lactis* は Trypticase Soy Yeast Extract Medium によって 30℃ で好氣的に振盪培養した。*L. lactis* 培養液を遠心（6,000 x g, 3分）によって回収した上清をフィルター（0.22µm）に通し、べん毛回転測定に用いた。*Salmonella* は、L-broth によって 37℃ で対数増殖期まで好氣的に振盪培養した。*Salmonella* のべん毛回転を測定するため、2枚のガラスを貼り合わせて作製したチャンバー内に細胞を固定し、べん毛に付着させたポリスチレンビーズ（直径 1.5µm）の回転を解析した。高速度カメラで撮影したビーズの回転動画をコンピュータ上で解析し、回転の速度と方向の変化を求めた。

結果・考察：新鮮な培地中では、*Salmonella* べん毛は反時計回りに安定して回転していた。8時間培養後に回収された *L. lactis* 培養液上清を添加すると、べん毛の反転頻度が顕著に増加した。次に、5種類の糖存在下でそれぞれ培養した *L. lactis* 培養液上清のべん毛回転に対する影響を調べた。その結果、*L. lactis* が分解可

能なグルコース、ラクトース、フルクトース存在下で培養された *L. lactis* 培養液上清中においてのみ、*Salmonella* ベン毛の反転頻度が増加し、回転の減速や停止も観察された。ベン毛回転の変化は上清添加後の数秒以内に検出され、その強度は添加された糖の濃度に依存した。*L. lactis* と *Salmonella* の共培養においても、*L. lactis* の糖分解能依存的な *Salmonella* 運動の変化が確認された。以上の結果から、*L. lactis* の代謝活動を *Salmonella* ベン毛の回転変調によって迅速かつ半定量的に評価できることが示された。本研究では、*L. lactis* 培養上清中で *Salmonella* の細胞内 pH が低下することも明らかにした。さらに、その細胞内 pH の低下には、*L. lactis* の糖分解によって産生された酢酸が関わる可能性も見出した。細菌の運動性と病原性には強い相関があることが知られている。本研究の成果は、乳酸菌代謝活性の簡便な初期スクリーニング法を提案するだけでなく、細菌感染防御における乳酸菌利用の研究にも発展することが期待される。

### 微生物のホルムアルデヒド代謝生理機能を利用した環境技術開発

由里本 博也

京都大学大学院農学研究科  
yury@kais.kyoto-u.ac.jp

目的：ホルムアルデヒド (HCHO) は極めて毒性が高く、低濃度でも人体に悪影響を及ぼす。一方、HCHO は植物に含まれるリグニン分解過程や、植物から放出されるメタノールの酸化により生じ、メタンやメタノールを含めたこれらの還元型 C1 化合物は、自然界に広く存在している。C1 化合物を炭素源として利用できるメチロトロフ (C1 微生物) もまた自然界に普遍的に存在するが、C1 微生物における C1 化合物代謝の最大の特徴は、その強力な毒性にもかかわらず、HCHO が代謝中間体となっている点である。さらに、C1 微生物の代謝経路では、CO<sub>2</sub> よりもエネルギー準位の高い HCHO を固定して細胞構成成分を合成しており、この

反応を活用すれば、CO<sub>2</sub> 固定よりも少ない消費エネルギーで炭素固定が可能となる。本研究では、HCHO を中心とする C1 化合物代謝の生理機能・制御機構を利用し、温室効果ガス排出削減や低炭素社会の構築など環境問題の解決に役立つ基盤技術を開発することを目的とした。

方法：メタノール資化性細菌の HCHO 固定経路の一つであるリブローズモノリン酸経路 (RuMP 経路) の鍵酵素ヘキサロース-6-リン酸シンターゼ (HPS) とホスホヘキサロイソメラーゼ (PHI) を、メタノール資化性細菌、およびメタン資化性細菌で発現させ、生育や代謝に与える影響を調べた。一方、メタノール資化性酵母については、メタノールおよび HCHO に応答する遺伝子発現に関わる転写因子および情報伝達関連因子について、遺伝子破壊株を構築し、機能解析を行った。

結果・考察：メタノールを培養原料とする物質生産に有用なメタノール資化性細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 株に HPS-PHI 人工融合酵素を発現させたところ、高発現プロモーターよりも中程度に発現するプロモーターを用いることにより、メタノール培養時の菌体収量が増加することを明らかにした。また発現株における代謝産物解析の結果、HPS-PHI の高発現による菌体収量の減少は、エネルギー源の不足によるものであることを明らかにした。一方、メタン資化性細菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 株由来の HPS-PHI 融合酵素を、HCHO 資化経路としてセリン経路を持つ *Methylosinus* 属メタン資化性細菌に導入した。メタン培養した HPS-PHI 発現株では、相当する酵素活性を確認できたが、生育やメタン消費に対する正の効果は認められず、メタンのみを炭素源とする培養では生育能低下が見られた。様々な培養条件を検討したところ、HPS-PHI の高発現により基質となる糖リン酸が不足することが示唆された。

メタノール資化性酵母異種遺伝子発現系の強化に向け、メタノールおよび HCHO に応答する遺伝子発現に関わる転写因子および情報伝達関連因子の機能解析を

行った。グルコース抑制に関わる転写因子 Mig1 の遺伝子を破壊することにより、メタノール誘導初期段階での転写活性化を早めることに成功した。また、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜におけるストレスセンサーとして知られる Wsc タンパク質が、メタノール資化性酵母においては、HCHO 代謝関連遺伝子を含むメタノール誘導性遺伝子の転写活性化に関与することを明らかにした。

### 新規ジペプチジルペプチダーゼと歯周病原性細菌のタンパク質分解・取り込み機構の解明

根本孝幸

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
tnemoto@nagasaki-u.ac.jp

目的：成人性歯周病の起因菌である *Porphyromonas gingivalis* は、糖非発酵性で、エネルギー源および炭素源として菌体外タンパク質、アミノ酸を利用する。栄養タンパクはまずエンドペプチダーゼであるジンジパインによってオリゴペプチドに分解され、次いでジペプチジルペプチダーゼ (DPP) によってジペプチドに分解後、菌体内に取り込まれる。従来、*P. gingivalis* には DPP4 と DPP7 の発現が知られていたが、私たちは 2011年にこれまであらゆる生物種で報告のなかった新規の Asp および Glu 特異的 DPP11 が存在することを明らかにした。本研究では、*P. gingivalis* のジペプチド産生機構の全容を明らかにすることを目的とした。

方法：3種の DPP の野生型、及び変異型リコンビナントタンパク質を発現精製し、それらの基質特異性と基質特異性を決定するアミノ酸について検討した。また、DPP 遺伝子の同時破壊株を作成し、その残存活性から未知の DPP の存在を推定した。これらの検討とともに、本菌のゲノム情報より DPP 様遺伝子の網羅的検索を行い、候補遺伝子タンパク質を発現精製して、残存活性を担う新規の DPP5 を同定した。

結果：疎水性アミノ酸特異的な DPP7 は P2 位置 (N 末端) にも疎水性アミノ酸を好み、P2 が疎水性アミノ酸

であれば P1 が疎水性でなくてもジペプチドを遊離することが判明した。さらに P2 疎水性アミノ酸の認識には Phe664 残基が関与することを明らかにした。*dpp4-7-11* 遺伝子破壊株には DPP7 の基質特異性に類似したジペプチド産生活性が残存していた。ゲノム情報より DPP 様構造を有する 3 種類の遺伝子を大腸菌で発現したところ、PGN\_0756 が残存活性に類似した DPP 活性を示した。アミノ酸配列などの比較検討より、PGN\_0756 は従来、コウジ菌などの真菌類にのみ分布するとされてきた DPP5 オルソログであると結論した。*P. gingivalis* DPP5 の発見により、DPP5 は細菌や古細菌に広く分布することが判明し、さらに高等動物にも分布する可能性が示唆された。DPP5 は DPP7 と同様に疎水性アミノ酸及び Ala 特異的であるが、P2 位置については選択性がなく、その結果、本菌のジペプチド産生レパートリーが広がることが明らかとなった。DPP はペリプラズムに局在すると判明し、この位置でオリゴペプチドを効率よくジペプチドに変換し、トランスポーターに送り込む可能性が示唆された。

結論：*P. gingivalis* には 4 種類の DPP が発現し、多様なジペプチドを産生することで本菌の増殖を支えている。このうち DPP5 は従来コウジ菌などの一部の真核生物にのみその発現が知られていたが、細菌や古細菌に広く分布する DPP であることが明らかとなった。

### イネ科植物に共生する糸状菌の抗菌性物質合成遺伝子の単離と植物病害防除への利用

竹本大吾

名古屋大学大学院生命農学研究科  
dtakemo@agr.nagoya-u.ac.jp

目的：植物体内で共生的に生活している糸状菌や細菌などはエンドファイトと総称されている。*Epichloë* 属エンドファイトは、イネ科の牧草や芝草の地上部組織の細胞間隙で生育し、共生関係を保っている。*Epichloë* 属エンドファイトは、宿主植物内で様々な二次代謝産物を生成し、昆虫による補食の抑制、病原菌に対する

耐性向上などの効果をもたらす。耐虫性に関わる生理活性物質が単離され、耐虫性を向上させる菌株が害虫防除に利用される一方で、病原菌に対する耐性を向上させる機構は殆ど明らかになっていない。本研究では、複数の *Epichloë festucae* 菌株から病原菌の生育抑制活性の強い菌株を選抜し、さらにその菌株を用いて抗菌性物質の生成に必要な遺伝子の単離とその機能解析を行なった。

方法：様々な地域から分離された14の *E. festucae* 菌株と、宿主植物ペレニアルライグラスの病原菌である、いもち病菌 *Magnaporthe grisea*, グラースポット病菌 *Sclerotinia homoeocarpa*, 斑点病菌 *Drechslera erythrospila*, *D. siccans*, 網斑病菌 *D. dictyoides*, 炭疽病菌 *Colletotrichum graminicola*, 夏斑点病菌 *Bipolaris sorokiniana* および葉腐病菌 *Rhizoctonia solani* との PDA 培地上での対峙培養を行った。また、抗菌性の高い E437 株を用いて、遺伝子タギング法 (REMI 法) を用いた抗菌性低下株の分離を行なった。

結果・考察：エンドファイト菌株と病原菌の対峙培養の結果、E437 株が最も多くの病原菌に対して抗菌活性を示し、*D. erythrospila*, *D. siccans*, *D. dictyoides*, *C. graminicola* および *B. sorokiniana* の生育を阻害した。

E437 株および抗菌活性を持たない FI1 株をペレニアルライグラスに接種し、それぞれの菌株が感染した植物に *D. erythrospila* を接種した。その結果、エンドファイト非感染株および FI1 感染株と比較して、E437 感染株における病徴の軽減が認められた。この結果から、E437 株の産生する抗菌物質が宿主植物を病原菌から守る活性があることが示された。次にプラスミド挿入による遺伝子変異法を用いて、抗菌活性を失う変異株を単離した。1200の形質転換体と *D. erythrospila* の対峙培養の結果、抗菌性を失った変異株 830 を単離した。830 株においてプラスミドが挿入された部位に隣接する DNA 配列を特定したところ、推定転写制御因子のプロモーター領域に挿入されていた。この遺伝子にコードされている転写制御因子は、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の Ndt80/PhoG DNA 結合ドメインをも

つ転写制御因子である Vib-1 と同一性を示したことから、VibA と名付けた。vibA 遺伝子の欠損株を新たに作出したところ、培地上での対峙培養時における抗菌性および培養濾液の病原菌の胞子発芽阻害活性が失われていた。次に、*E. festucae* E437 株に過剰発現プロモーターの制御下で vibA を発現させた。vibA 高発現株の抗菌活性を調べたところ、E437 株が培地上で抗菌活性を示した5種の病原菌に対する抗菌性が著しく上昇しており、さらに野生株が抗菌性を示さなかった *M. grisea*, *S. homoeocarpa* および *R. solani* に対する抗菌性を獲得していた。また、抗菌活性をもたない *E. festucae* FI1 株に vibA を過剰発現したところ、病原菌に対する抗菌性を獲得した。これらの結果から、vibA はエンドファイトの抗菌物質生成において主導的な役割を担う転写制御因子であることが示された。

### 腸内細菌マイクロバイオームの遺伝子間 相互作用ネットワークの比較解析

奥田 修二郎

立命館大学生命科学部 (現 新潟大学大学院医歯学総合研究科)  
okd@med.niigata-u.ac.jp

目的：近年、腸内細菌と肥満や糖尿病などの生活習慣病との関連が示唆されている (Vijay-Kumar, M. et al. Science 2010, Qin, J. et al. Nature 2012)。様々な腸内細菌叢の解析から、腸内細菌の組成や量などの因子によって、ヒトにおける肥満などの生活習慣病を予防する方法が開発される可能性が出てきた。腸内細菌による生活習慣病を始めとする病気との関連のメカニズム解明が望まれており、腸内細菌叢をまるごとシーケンスするマイクロバイオーム研究は非常に注目されている。本研究では、バイオインフォマティクス的手法を駆使し、様々なマイクロバイオームデータから腸内細菌叢における遺伝子ネットワークと病気との関連を明らかにすることを目的とする。

方法：京都遺伝子ゲノム百科事典 (KEGG) データベースよりゲノム配列が決定されている生物種のデータ



を取得した。これらのデータから系統プロファイルを作成した。系統プロファイルとは、ある遺伝子のゲノム内での有無を全生物種ゲノムについて調査したものである。利用した生物種ゲノムには系統的な類似性による偏りがあるため主成分分析を実施し、類似生物種をグループ化した。主成分分析の結果から、寄与率が90%以上になるまでの主成分を取得し、その主成分に基づいたベクトルから系統プロファイル間の相関係数を計算した。また、代謝ネットワーク内から全ての隣接遺伝子ペアの抽出を実施した。これらから、系統的に類似した生物種グループが担う一連の代謝反応のセットを抽出した。さらに、筆者らによって実施された糖尿病と腸内細菌叢との関連についての解析 (Qin, J. et al. Nature 2012) に利用された2型糖尿病患者と健康な人の腸内細菌叢のデータを取得した。このデータを上記で得られたモジュールおよびKEGGモジュールデータベースにマッピングした。さらに2型糖尿病患者と健康な人という2つのカテゴリに分けた時に、それぞれのモジュールの相対量を推定し、カテゴリ間での比較を実施した。

**結果・考察：**腸内細菌のような複雑な微生物間の相互作用が予想される場合には、遺伝子間相互作用ネットワークが構成出来たととしても、どの部分はその系にとって重要かの判断が非常に難しい。そこで本研究では、生物系統と代謝ネットワークを事前に統合することで、メタゲノムデータをマッピングした時に、どの生物種がどの部分を担っているか、あるいはどの程度重要かを理解しやすい形で解析するための手法を開発した。その結果、モジュール単位での解析において2型糖尿病への影響の程度を表す指標の作成に成功し、その指標の解析から2型糖尿病に特有なモジュールの存在が示唆された。今後は、得られたモジュールの病気との関係を文献調査などからより詳細に解析する必要がある。

## 腸炎ビブリオの下痢誘導機構の解明

児 玉 年 央

大阪大学微生物病研究所  
kodama@biken.osaka-u.ac.jp

**目的：**腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) はわが国で分離同定された食中毒原因菌である。申請者はこれまでに小染色体上にコードされる3型分泌装置 (Type III secretion system 2; T3SS2) が、腸炎ビブリオ感染によって誘導される下痢原性に必須であることが明らかにしてきた。さらに、このT3SS2依存的な下痢原性に寄与するエフェクター (effector) としてVopVを同定した。また同定の過程でVopV以外にも12種類のT3SS2のエフェクターが存在することが明らかとなった。しかしながら、それらの病態形成過程における役割は不明である。よって、本研究ではT3SS2のエフェクターの機能解析を行うことで、本菌の下痢誘導機構の全貌を明らかにすることを目的とした。

**方法：**腸炎ビブリオの遺伝子欠損株はpYAK-1 (R6K ori, Cp<sup>r</sup>) を用いて作製した。感染細胞のF-アクチン (F-actin) 染色はAlexa Fluor 488-phalloidinを用いた。VopCの脱アミド化活性は抗脱アミド化RhoA抗体を用いて評価した。Rho familyの活性化はEZ-Detect<sup>TM</sup> Rac1, Cdc42 Activation Kitを用いて評価した。細胞侵入性試験はゲンタマイシンを用いたgentamicin killing assayで評価した。

**結果・考察：**VopVはアクチン結合活性を有していることから、腸炎ビブリオ感染細胞のF-アクチンを染色した結果、VopV依存的なアクチン凝集の他にT3SS2依存的にストレスファイバー形成 (stress fiber formation) が観察された。そこで、VopV以外のT3SS2エフェクターの関与を考え、エフェクター候補遺伝子欠損株を作製し、ストレスファイバー形成に寄与するエフェクターの検索を行った。その結果、*vopC* 遺伝子欠損株感染細胞において、親株で認められるストレスファイバー形成の代わりに曲がった枝分かれしたアクチン

ファイバー形成された。VopCは尿路病原性大腸菌が産生する毒素，cytotoxic necrotizing factor (CNF)の活性部位と相同性を有しており，近年腸炎ビブリオの細胞侵入性に寄与しているとの報告があるエフェクターである。CNF毒素はRho family GTPase (RhoA, Rac1, Cdc42など)に属する低分子量Gタンパク質を脱アミド化し，それらを恒常活性型状態にすることが知られていることから，VopCの脱アミド化活性を測定した。その結果，Rac1およびCdc42に対して選択的に脱アミド化活性が認められ，さらにそれらを活性化していた。*vopC* 遺伝子欠損株で認められた曲がった枝分かれしたアクチンファイバー形成は，恒常活性型のRac1を発現させることによって回復した。一方，VopC依存的な細胞侵入性はCdc42のknockdownによって減少した。以上の結果により，T3SS2のエフェクターであるVopCは2つのRho family GTPaseを活性化することにより，ストレスファイバー形成と細胞侵入性という，2つの異なる表現型に寄与していることが考えられた。

平成23, 24年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：平成23年4月～平成26年3月（吉澤 晋）  
：平成24年4月～平成26年3月（中沢威人）

極域を支配する *Polaribacter* 属細菌の  
系統分類と生態に関する研究

吉 澤 晋

東京大学大気海洋研究所  
Yoshizawa@aori.u-tokyo.ac.jp

目的：高緯度領域に広がる低温環境“極域”から分離された *Polaribacter* 属細菌（1属10種）はその過酷な環境で最も優占するグループの一つである。また、近年のゲノム解析で *Polaribacter* 属細菌の MED152 株からプロテオロドプシン（PR）遺伝子が見つかり、極域環境での PR を利用した生活様式が注目されている。PR は光エネルギーを用いて細胞内からプロトン（H<sup>+</sup>）をくみ出すことで電気化学的プロトン勾配を生産し、そのエネルギーで ATP を合成する言わば光駆動型プロトンポンプである。しかしながら、*Polaribacter* 属内における PR 遺伝子の普遍性や、エネルギーを利用する生活様式に関してはほとんど分かっていない。本研究では、様々な環境から分離した *Polaribacter* 属細菌を用いて、種の系統と PR 遺伝子の有無を調べ属内における PR 遺伝子の普遍性を明らかにし、また比較ゲノミクスを用いた解析から光従属栄養性生活様式を推定することで、極域に優占する *Polaribacter* 属の生態解明を目的とする。

方法：冬季サロマ湖（表層水温-1.5度）、相模湾（表層水温23度）、西部北太平洋亜寒帯地域（表層水温4℃以下）から Marine Agar 2216 を用いて海洋細菌を分離し、16S rDNA を用いて種の推定を行った。分離株および購入した全 *Polaribacter* 種の基準株を用いて、属内における PR 遺伝子の有無を調べた。PR 遺伝子の検出は新規に設計したプライマーを用いた。また非常に近縁でありながら PR 遺伝子の有無が異なる株のドラフトゲノムを決定し、比較ゲノミクスを行った。

結果・考察：合計34株の *Polaribacter* 属細菌の分離に成功した。また分離株の18株から、および購入した基準株10株のうちの5株から PR 遺伝子が検出された。これまで *Polaribacter* 属細菌から PR 遺伝子は1株でしか

報告がなく、属内における PR 遺伝子の普遍性は未解明であったが、本成果により *Polaribacter* 属内に PR 遺伝子が広く存在する事が明らかになった。サロマ湖から分離した SA4-10 株および SA4-12 株は 16S rDNA 相同性が 98% と非常に高いにも関わらず、PR 遺伝子の有無が異なった。これらの2株のドラフトゲノムを決定し、比較ゲノミクスを行った結果、PR 遺伝子を持つ株（SA4-10: 約 3.4 Mbp）は持たないもの（SA4-12: 約 4.0 Mbp）に比べてゲノムサイズが小さく、また窒素代謝、呼吸、炭水化物利用に関する遺伝子が少ない傾向が示された。これは、PR 遺伝子を持つ株は太陽光をエネルギー源として利用できるため、持たない株に比べて有機物依存性が低い生活様式を持つ可能性を示唆している。今後、他の株のゲノム解析も実施し、低温環境における *Polaribacter* 属細菌の“光利用”生態の詳細を明らかにしていく予定である。

幅広い糸状菌からの休眠型二次代謝産物  
遺伝子クラスターの網羅的活性化および  
化合物生産を実現する基盤整備

中 沢 威 人

静岡県立大学大学院薬学研究科  
tnakazaw@kais.kyoto-u.ac.jp

目的：ゲノム解読技術の飛躍的進歩に伴い、膨大な数の糸状菌種のゲノム解読が行われた。その結果、天然物（二次代謝産物）生合成遺伝子に関して意外な事が判明した。今まで獲得されてきた天然物の種類より遥かに多くの生合成遺伝子がゲノム上に転写不活性な状態で存在していたのである。不活性化は主にエピジェネティック効果によるものだとされ、近年ではそのような休眠型生合成遺伝子を活性化させることで新規化合物の獲得が試みられてきた。その方法論についても豊富に報告されている。しかし現実には、活性化を試みた実験の大多数は上手くいかず「成功するまで、とにかく数をこなす」のが実際である。不確実性が高く、研究方法論としても洗練されているとは到底言え

ない状況である。そこで本研究課題では、幅広い糸状菌を用いて幾つかの手法で休眠型生合成遺伝子の活性化を試みると同時に、その休眠型生合成遺伝子のエピジェネティック状態も解析し、活性化に成功したものと・成功しなかったものについて、そのエピジェネティック状態を比較する。これらを通じて、どのような状態にある生合成遺伝子の活性化には、どのような手法が有効であるかをまとめる。本研究課題は、将来今以上に発展するであろう糸状菌種のゲノム・エピゲノム情報を活用し、効率的かつ網羅的な生合成遺伝子の活性化・新規化合物獲得の実現に貢献する基盤的知見を整備することを最大の目的とする。

**結果・考察：**5種類の糸状菌において、休眠型生合成遺伝子クラスター内に存在する転写制御因子を強制発現させる手法を試みた。結果、20%程度の確率でクラスターの活性化・天然物の獲得に成功した。活性化に成功した・成功しなかった生合成遺伝子に分けて、クロマチン免疫沈降法（ChIP）によるヒストン修飾および分布密度を比較解析したところ、ヒストンの存在量もしくはアセチル化レベルが高い場合に、本手法が有効であるという仮説が導かれた。

*Chaetomium globosum*, *Botrytis cinerea* において、エピジェネティック制御因子類の破壊株を作成した結果、天然物生合成が劇的に変動した。*C. globosum* において転写変動したそれら生合成遺伝子のエピジェネティック状態を解析したところ、遺伝子破壊株において変動が確認できた生合成遺伝子と変動していない生合成遺伝子の両方が存在していることが確認できた。このことは、エピジェネティック因子が生合成遺伝子を直接制御している場合に加え、他因子・経路を通じて間接的に制御している経路が存在していることが示唆された。

発酵研究所助成研究報告 第28号【非売品】

平成26年12月10日 印刷

平成26年12月20日 発行

編集委員長 中瀬 崇  
編集委員 伊藤忠義, 内海龍太郎  
大竹久夫, 工藤俊章  
桑原正章, 永井和夫  
坂野 勲, 横田 明

発行人 中濱一雄

発行所 公益財団法人発酵研究所  
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06 - 6300 - 6555

FAX. 06 - 6300 - 6814

印刷所 日本印刷出版株式会社  
大阪市福島区吉野1丁目2番7号