

NUMBER 30

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH  
COMMUNICATIONS**

**2016**



# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 30



2 0 1 6

**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 中瀬 崇 古川 謙介	武田 光子 永井 和夫 原島 俊 本田 武司	
監事	下元 高文	藤井 智幸	
評議員	今田 哲 北本勝ひこ 関 達治 武田 直久 土屋 英子	魚住 武司 下田 親 竹内 昌男 谷 吉樹 吉田 敏臣	
顧問	坂野 勲		

## 目 次

発酵研究所の活動		
– 発酵研究所を継いだ人たち (1995.4~2001.3) –	竹内 昌男	1
第10回助成研究報告会の開催	横田 明	17
<b>■ 平成26年度大型研究助成</b>		
熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築	早川 正幸	21
発酵菌による細胞リプログラミング機構の解明	太田 訓正	39
胆汁酸を責任分子と想定した西欧食による腸内細菌叢崩壊機構の解明	横田 篤	47
難培養性アナモックス細菌の生理・生態学の 全容解明に向けてのポストゲノム解析	岡部 聡	57
<b>■ 平成22年度寄付講座助成</b>		
極限環境微生物のゲノムに認められる機能未知遺伝子の 機能解析とその応用	河原林 裕	69
相同性から機能が推定されている超好熱アーキアの 蛋白質・酵素の機能解明 河原林 裕		79
活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析 石野 園子, モハマド ダダシプール, 河原林 裕		89
極限環境微生物遺伝子資源の応用 石野 園子, 鈴木 宏和, 河原林 裕		103
<b>■ 平成26年度一般研究助成</b>		
汽水湖に生息する孔径 0.22 $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを 通過可能な極微小微生物の分離と, 地理分布, 系統学的多様性 およびその生態の解明	新谷 政己	119
倒木に発生する変形菌類の窒素炭素安定同位体比分析による 食性解析と, 変形菌類が倒木中の養分無機化および 樹木実生の生長に果たす役割の解明	深澤 遊	120
従属栄養性珪藻類の進化・多様性と分子生態学的研究基盤の確立	神川 龍馬	120

植物寄生菌の熱帯環境への適応進化の解明	高松 進	121
運動性乳酸菌の選択分離法の開発とその応用： 運動性乳酸菌の多様性の解析	乙黒 美彩	122
高濃度塩泉水・鹿塩温泉における好塩微生物相の解析	峯岸 宏明	123
温泉に生育する真菌の分離培養方法の確立と 系統分類および二次代謝産物生産能の解析	内田 龍児	123
ダイズ根粒菌の生態学的特性と環境因子による 群集構造の構築および亜酸化窒素発生抑制に関する研究	佐伯 雄一	124
嫌氣的湖沼環境に潜む菌類様初期真核微生物群の 多様性解明と培養への挑戦	長濱 統彦	125
メタゲノム解析及び生元素の安定同位体解析を用いた 温泉バイオマツトにおける微生物群集構造と代謝の化学的特徴付け	中川麻悠子	126
海洋性菌類の生態に関する研究	澤山 茂樹	127
上部消化管内優勢乳酸桿菌種のペプチド要求性に関する研究	荒川 健佑	127
中枢代謝，ATP 生産能，蛋白質発現量を強化した微生物宿主による 有用ポリケタイドの発酵生産	鮎 信学	128
単一バクテリア内 ATP の絶対濃度計測法による エネルギー代謝と増殖の解析	今村 博臣	129
大腸菌におけるメタボリックスイッチ制御機構の解明	島田 友裕	130
シロアリ消化管内共生バクテリアによる木質分解機構	徳田 岳	130
微生物による有機物の化学エネルギーから電気エネルギーへの 変換能力解明に向けた基礎的研究	井上 謙吾	131
カビの細胞内レドックス変化に応答したエピジェネティック制御による 遺伝子発現調節機構の解明	志水 元亨	132
過酷な生育環境から単離された微細藻類がもつ 新奇な有用機能に関する研究	川崎 信治	133
イノシトール遊離能をもつ細菌由来フィターゼ： <i>Klebsiella pneumoniae</i> 9-3B 株由来フィターゼの解析と 新規フィターゼの開発	曾根 輝雄	133
CO <sub>2</sub> から石油を高生産するシアノバクテリア株コレクションの構築	寺本 真紀	134
第 3 の生体運動，戦車のように動くバクテリアの運動メカニズム	中根 大介	135

白色腐朽菌の順遺伝学： 担子菌特有の酸化酵素の分泌メカニズムの理解にむけて……………	中沢 威人	136
細菌毒素を認識する RNA アプタマーの創製と検査, 診断 および治療への応用……………	伊藤佐生智	136
医学・農学的応用を見据えた細胞膜脂質非対称センサーの 分子解剖及びエンジニアリング……………	小原 圭介	137
微生物が持つ高次機能の解析： 大規模ゲノム操作技術が拓く新たな遺伝子工学……………	柿澤 茂行	138
酵母を利用した翻訳過程不全によるミトコンドリア病の 分子メカニズムの研究……………	行木 信一	139
組織血液型決定抗原様物質を保持する腸内細菌が ヒトノロウイルスの環境中動態に与える影響の解明……………	佐野 大輔	139
大腸菌縮小ゲノムシステムによる潜在的必須遺伝子群の同定解析と 合成生物学的手法による「光合成大腸菌」の作製……………	加藤 潤一	140
バクテリアの無機炭素濃縮機構とポリアミンの関わり……………	安元 剛	141
プロテオーム解析法を用いた未分化能を有する 歯肉上皮系前駆細胞における歯周病菌産生毒素の 標的膜タンパク質の探索……………	中山 真彰	142
<b>■ 平成25年度若手研究者助成</b>		
鉄酸化細菌によるアスベスト分解メカニズムの解明と応用……………	石田 丈典	143



## 発酵研究所の活動 －発酵研究所を継いだ人たち（1995.4～2001.3）－

竹内昌男

### プロローグ

地球上の多種多様な環境の下に多種多様な微生物が生息しており、人類はそれらを巧みに利用してきた。微生物が生物資源<sup>1)</sup>として意義づけられたのは、1800年代、ヨーロッパの王立機関が微生物を単離し保存する事業を始めたことに遡る<sup>2)</sup>。それが現代まで collection として継続し維持されてきたのは、微生物が人類の物的、知的利益になりうる可能性が認識されていたことと、時代とともに進歩する科学的手法に基づいた微生物の特性化があったからである。collection の質を高めるには、分子生物学を基本とした微生物の科学的特性を明らかにし、研究者本人の努力は勿論であるが、多くの研究者 community の協力とその collection を経済的に支える環境が不可欠である。発展し続ける生命科学の研究を支えるためには、微生物を含む生物資源の質の高い生物資源保存機関 (Culture Collection) が必要である。生物資源保存機関は保存した生物資源を研究者に分譲する機関である。研究者に研究材料として提供するには信頼できうる高品質の生物資源であることが求められる。

1990年までの世界の Culture Collection の活動については、前任者らの詳しい記載がある<sup>2,3,4,5)</sup>。それらの報告によると国内では1960年代まで財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka (IFO)) が唯一の public culture collection (公的生物資源保存機関) であった。これらの機関の活動の規模と信頼性を示す指標として、一般の研究者に分譲した生物資源の分譲数がある。世界のトップレベルは米国の American Type Culture Collection (ATCC)、オランダの Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)、そして日本の IFO であった。1970年以降、国内では国が膨大な予算によって生物資源保存機関を整備しようとしたにもかかわらず、2000年代まで IFO が分譲数でトップを保っていた。その理由はいくつかある。一つには、IFO の活動に多くの学者の意見が反映されていた。それは、学術的な意見だけに限らず、運営方針などの広範囲な意見が提案されていた。例えば、生物資源保存機関の活動におけるサービスの衡平性<sup>6)</sup>、米国の ATCC のように民間組織であること、科学研究の基盤となる事業であるにもかかわらず、国の科学研究費なしの活動などを柱とする IFO の活動姿勢にまで及んだ。

1994年、発酵研究所は設立から50周年を迎えた。その活動の記録が IFO Research Communications vol.17 (50周年記念号) に記されている。ここまで5人の所長が研究所をつないだ。IFO の設立から1975年までの活動記録は長谷川武治氏<sup>2)</sup>が、1976年から1989年までは飯島貞二氏が<sup>4)</sup>、その後1995年までは長谷川徹氏が<sup>5)</sup>、それぞれ残している。以下に述べる報告は1995年4月から2001年3月までの IFO の活動の記録であり、(I)生物資源保存活動のバックグラウンド、(II)IFO の事業、(III)発酵研究所の生物資源保存事業を取り巻く状況、などについて記載する。また、継続的な財団運営には、IFO の経済的側面と武田薬品から受けてきた経済的なサポートについても触れなければならない。これらのことを踏まえ、1995年4月(平成7年4月)から2001年3月(平成13年3月)まで研究所の運営の一部を担当した者として<sup>7,8,9)</sup>、その期間に IFO の活動に携わった研究者たちにフォーカスをあてて、IFO の活動の歴史の一時期を記述する。

### 生物資源保存活動のバックグラウンド

#### 1) Public Culture Collection としての IFO

Public Culture Collection は日本語の公的保存機関にあたる。ここで言う public culture collection とはその生物資源保存機関の主な業務である生物資源の収集・品質管理・保存・分譲が保存機関の外部の利用者(研究者)に衡平に行うことである<sup>6)</sup>。経済的支援を受けている組織・研究者に分譲を優遇してはいけない制約がある。IFO の運営はこれにあたる。一方、private culture collection は私的保存機関で、当該保存機関が属している上部組織や経済的支援を受けている組織に分譲などのサービスを優遇することは随意である。

#### 2) 生物資源保存活動の継続性

生物資源保存機関の活動の指標として生物資源の保存数とそれらの分譲数がよく用いられる。長谷川武治氏の報告<sup>2)</sup>によると、1960年頃、世界ではアメリカの ATCC が指標のトップの座にあり、2位がオランダの CBS で、IFO はその次にランクされていた。設立当時から2000年までの約50年間の IFO の活動を振り返ると、発展できた要因として3つ挙げることができる。まず活動の中心

となる有能な研究者が居ること、それを支える活動資金を提供する個人または機関があること、さらにこの活動をサポートする研究者集団がいること、などの条件が揃うことが鍵になる。オランダではデルフトの工科大学に設置されて発展したのは研究者集団のサポートがCBSの発展の基礎になった<sup>2)</sup>。ATCCは民間機関であるが、国立研究所・NIHの多額の研究費が投入されてきた。また、活動が大きく発展するごとに、連邦政府や州政府などの公的機関が資金の援助をしてきた。しかしながらATCCは民間組織であり、政府とは無関係に独自に活動してきた。生物資源保存事業に対するオランダや米国の卓越した見識をうかがうことができる<sup>2)</sup>。

### 3) 菌株保存番号 (IFO 番号) の保管管理

下図は IFO が受け入れた菌株の第一号が記載されたノートのページである。1941年に記録が始まり、その後すべての受け入れ菌株には IFO 番号を着け、記録を続け、2000年までの数は約20冊にもなった。1980年以降、飯島貞二氏がコンピューターを使い情報の電子化を始めた。コンピューターを利用して記載するのは便利であるが、常に機器が破損する危険がある。また、運用の間違ひに

よりデータを消失してしまう危険もある。そこで、菌株名と受け入れ日、IFO 番号などの最小限の情報を記録した紙書類の保管管理方式も併用してきた。IFO ではコンピューターがどんなに発展し、情報がデータベース化されても、この記録方式を継続した。飯島氏の報告に詳細にも記載されている<sup>10)</sup>。IFO では受け入れた菌株にそれぞれの固有の IFO 番号を付けている。世界にただ一つの番号である。

世界で初めてそれぞれの菌株を研究資源として価値あることを IFO 自ら表現したもので、将来継続的にこの菌株の品質について責任を持っていることを意味する。すなわち、IFO 番号の付いた生物資源を使用した研究者に対し、研究成果が再現性のあることを IFO が責任を持って保障することを意味する。研究論文の記述には生物資源株名と並列に IFO 番号が付いているのは、このことを意味する。

### 4) 武田薬品工業株の経済的支援

生物資源保存機関は独立した経済的自立が困難である。現在、世界最大の機関である米国の ATCC は民間組織である (日本では ATCC が公的機関であるとはしばしば

菌株名	来り方	受入先	取付先
Beer yeast (Burton)		CLM. H. Nakazawa (IFO 2000)	IFO 2000
(Frohberg I) (Untergärige)		Nakazawa (IFO 2001)	IFO 2001
Untergärige Frohberg II		" (IFO 2002)	IFO 2002
(München)		" (IFO 2003)	IFO 2003
Pilsener		" (IFO 2004)	IFO 2004
(Untergärige Carlsberg)		" (IFO 2005)	IFO 2005
(Strain 118 Will)		" (IFO 2006)	IFO 2006
( " 2 " )		" (IFO 2007)	IFO 2007
( " 6 " )		" (IFO 2008)	IFO 2008
( " 11 " )		" (IFO 2009)	IFO 2009
Baso Beer yeast No. 2		" (IFO 2010)	IFO 2010
Baso beer yeast No. 1		" (IFO 2011)	IFO 2011
Untergärige beer yeast		" (IFO 2012)	IFO 2012
Beer yeast Tyskian Jørgensen Lab. Sam. No. 1154		" (IFO 2013)	IFO 2013
Untergärige beer yeast		" (IFO 2014)	IFO 2014
Berlin Bierhefe		" (IFO 2015)	IFO 2015
Bierhefe Leipzig		" (IFO 2016)	IFO 2016
U. (Kirin)		" (IFO 2017)	IFO 2017
Baso beer yeast (Burton upon Trent No. 1)		" (IFO 2018)	IFO 2018
( " " " " No. 2)		" (IFO 2019)	IFO 2019
Bierhefe 150		" (IFO 2020)	IFO 2020
" 159		" (IFO 2021)	IFO 2021
" 212		" (IFO 2022)	IFO 2022
(Denmark)		" (IFO 2023)	IFO 2023
(Kopenhagen)		" (IFO 2024)	IFO 2024
M		" (IFO 2025)	IFO 2025
N		" (IFO 2026)	IFO 2026
Strain 2 Will		" (IFO 2027)	IFO 2027
" 6		" (IFO 2028)	IFO 2028

図1 IFOに最初に受け入れた菌株を記載したページ。1941年 Nakazawa の Beer yeast (Burton) 菌株を受け入れた、と読み取れる。IFO 番号はまだ付けていない。

間違われる)。それゆえ、政府関係の世界会議、たとえば Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) の会議には米国の代表として ATCC は参加していない。組織運営も国・州の政府機関から完全に独立しているから、年間数10万株の分譲による分譲代金収入だけでは、経済的な運用は不可能である。そこには、米国独自の運営形態があり、ATCC が発展する時期には、必ず多額の公的資金が投入されていた。例えば、1960年代以降 Stevenson が ATCC の責任者のときには連邦政府からの補助があり、また、1990年代にはメリーランド州の Bethesda からバージニア州の Manassas に施設を移転した時には州政府から土地代を含め多額の無償援助があった。米国には ATCC 以外にもいくつかの生物資源保存機関があるが、政府行政機関はそれらにも必要に応じて重点的に援助をしている。米政府の ATCC への援助はこれだけではない。ATCC は NIH や他の政府機関の研究プロジェクトに生物資源保存機関として参加し、生物資源の収集・品質管理・保存・分譲作業を分担することにより経済的収入を得ている。先に述べた2000年の OECD の会議でも話題になっていたが、世界中の生物資源保存機関を列挙してみると、いわゆる経済的な先進国は政府機関から独立している現状が報告されていた。政府・一般社会・研究者社会によく理解されている一例が ATCC であると言える。

ATCC の例を見ても明らかのように、生物資源保存機関を経済的に支えることができる外部組織の存在がこの活動に不可欠である。ATCC と同様に IFO も武田薬品工業(株)ならびに六代目武田長兵衛氏やその一族からの個人的資産による多額の援助を受けて活動してきたことは、これまでの報告書<sup>2,4)</sup>にも記載されている。経済的には毎年全面的に武田薬品に依存してきたにもかかわらず、public culture collection としての性格・機能を長期間維持できたのには理由がある。各氏の報告書をご覧になれば理解できるが、再度記載しておきたい。

オーナーである武田薬品工業にとって、生物資源株の保存事業は企業活動とは程遠いことから、IFO の事業は企業の宣伝活動ではなく、企業利益の社会還元の一つと考えられてきた。このことにより資金援助を続けてきた。IFO の初代理事長である六代目武田長兵衛氏、二代目理事長の小西新兵衛氏および三代目理事長の森田 桂は、共に IFO で開催された理事会・評議員会や講演会を通して、理事・評議員の先生方の忌憚のないご意見に快く耳を傾け、武田薬品の外部の研究者でしかも、国内外の第一線で活躍されていた先生方との意見交流を盛んにされていたという。この関係は著者の担当していた期間でも受け継がれていた。早石 修 (京都大学名誉教授)、田村學造 (東京大学名誉教授)、岡田善雄 (大阪大学名

誉教授)、別府輝彦 (東京大学名誉教授)、岡見吉郎 (財団法人微生物化学研究会理事)、駒形和男 (東大名誉教授)、らの先生方の熱弁が特に印象に残っている。先生方は、生物資源保存事業の特質を国際的見地から見て、国の研究機関よりも IFO のような民間の機関による運営が生物資源を利用する研究者にとって最適であると主張していた。これは、IFO の所員にとってどんなに心強く感じたことであっただろうか。

##### 5) 武田薬品の人材支援と IFO の研究活動

武田薬品・本社の人事部、経営企画部、経理部、総務部、特許部との意見交換も頻繁に行われた。IFO の運営資金を援助してきた武田薬品では、その本社の経営会議(会長、社長、副社長その他の取締役の出席)で IFO への経済的サポートに関し討議になることもあった。IFO は武田薬品・研究所の施設を借用していたこともあり、研究者間の意見や技術交流が十分行える環境にあった。人事評価は武田薬品の評価法に従っていたが、武田薬品も変遷する時代に合わせて評価基準の見直しがあった。それに従って IFO の人事評価法も見直された。武田薬品の全体の評価基準から見ると、IFO の業務は微生物を大量に培養して、それらを小分けし、分譲する業務と位置付けられた。しかし、IFO の業務はそのような単純労働ではないことを主張した。微生物・細胞など生物資源株は生物として絶えず変化する恐れがあるので、固有の性状を備えた標準株を維持するには、高い専門知識と技術が不可欠であり、それを応用できる人材の育成こそが新たな生物資源の開発につながるからである。この主張を武田薬品の人事部は良く理解してくれた。このようにして得られた IFO の研究者の位置づけは、研究所の運営にとって給与の面ではなく、IFO の事業に対する意識の面で大きい出来事であったと思う。

管理部門である事務長の役割は多義に渡ることから、末永 格主席研究員を武田薬品から出向してもらった。その後、経理の専門家である吉田正憲が、高丸龍二郎の定年退職に伴って IFO に参加し、従来の佐藤邦子、塩山邦子とともに経理・庶務・特許管理・データベースのデータ管理等の事務作業を補強した。このように、経済的なサポートだけでなく、人事の面でも十分な支援を受けた。また、IFO の研究活動に対しても武田薬品には十分な理解を得ることができた。しかし1997年頃に、武田薬品は IFO への資金援助の削減を提案してきた。その理由として環境の大きな変化が2つあった。一つは1995年に起きた阪神淡路地震による研究所建物のダメージのため武田薬品研究所の全面的な建て替えを検討していたことである。毎年1億7500万円の IFO への援助は大きな負担であったからと思う。他の一つは、当時、文部省、

表1 研究発表数の経緯

年度	H7	H8	H9	H10	H11	H12
西暦(4～翌年3月)	1995	1996	1997	1998	1999	2000
研究発表総数	66	61	43	67	55	49
口頭発表	27	27	18	20	25	16
論文発表	33	28	18	43	26	29
その他(講演・報告書)	6	6	7	4	4	4

科学技術省、経済産業省や厚生省などが国の方針として国際的に生物資源を収集・管理し、国の研究・産業の基盤となる研究資源の確保に力を入れつつあった。この社会的背景の変化が武田薬品の決断に影響を及ぼしたと考えられた。しかし、実に感謝に尽きるが、武田薬品の姿勢は変わりなく、2000年(平成12年度)までは同額の年間1億7500万の寄付を続けて受けることができた。当時、IFOは国の種々研究機関から研究プロジェクトへの参加の要請を受けた。IFOの研究実績や生物資源保存株についてのデータの蓄積および研究者の人材が国の事業を遂行するのに魅力的であったからだと思う。これらの研究プロジェクトに参画したIFOの各研究者には、生物資源の科学的な品質管理法の改善、定期的な報告書の提出、学会発表や論文発表、学会開催など年間の研究活動がこれまでにないほど大きな使命になり、大きな負担を掛けることになった。しかし、懸命な対応の成果が表に示したとおりである(表1)。

## 6) IFOの経済状況

IFOの事業は事務部門を含み6部門にわかれていた。総員、約25名前後である。年間の運営費は約3億5,000万円であった(表2)。収入のうち、菌株の分譲から約7,000万円ではほぼ毎年一定である。寄付金(武田薬品からの毎年約1億7,500万円の寄付金や基本財産からの利子収入等)は約2億2,000万円、それと公的機関からの研究費が数千万円あった。これらの収入に対し、人件費2億2,000万円、実験費と施設使用代(光熱費、武田薬品からの実験室使用代を含む)約6,000万円であった。1999年、2000年の支出の変動は知的財産の拡充を目指したプロジェクトの実施のために国の研究費補助を受けたからである。

これについては後述する。この表2からも分かるように、1人当たりの支出が1,700万円弱である。この額は当時の私立大学の研究者あたりの運営費に相当する。1990年頃から日本経済が下降していた時期であり、当時、幾つかの国内の公益財団の解散を耳にした時期でもある。さらに、この時期は国の税制も変更された。消費税だけでなく、IFOのように公益性が高く、しかも寄付金(寄付金が免税対象であったのは昔の話である)により

表2 各年度の収入と支出

年度	H7	H8	H9	H10	H11	H12
西暦(4～翌年3月)	1995	1996	1997	1998	1999	2000
年間収入(10万円)	3,441	3,237	3,110	3,428	3,921	4,513
寄付金等	2,500	2,320	2,348	2,575	2,655	2,918
公的研究費等	170	100	100	105	588	851
菌株分譲代金等	771	752	657	748	677	744
年間支出(10万円)	3,420	2,800	2,538	2,885	3,919	3,736
人件費	2,439	2,110	1,820	1,746	1,922	2,103
実験費	316	214	352	682	1,489	776
施設維持費	398	375	278	239	372	670
その他	267	101	88	218	136	187
所員数	25	17	16	16	17	18
人件費/年収(%)	70	65	58	50	48	47

活動している財団に対しても事業税(生物資源を国内の基礎研究者に提供する業務が企業活動と同等の経済的活動と見なした)が課されるようになった。財団運営の専門家の解説では、財団運営費における人件費の割合が70パーセント以上では運営が危機の状態にあり、継続的に運営するためには少なくとも60%以下に抑えることが望ましいと、説明されていた。その意味では当財団は1995、1996年が経済的に危機の状態であった(表2)。その後、公的研究費による補助が大きく寄与したため1998年から経済的に改善された。そのプロジェクトの内容については後述する。

## IFOの事業

### 1) 国内保存機関の生物資源株の収集・保存・品質管理・分譲

日本微生物保存連盟(JFCC)に所属する国内の生物資源保存機関の1998年の年間実績を一部改訂して表3に示した<sup>11)</sup>。当時IFOから利用された生物資源株(微生物株と動物細胞株等を含む)は8,900株である。現在(2015年)でも、この実績数に匹敵する他の国内機関はなさそうである。生物資源の保存数だけをみれば、IFOより大きい機関はある。保存数が大きいことは、その機関は、研究者が必要に応じて多いだけの対応ができるはずである。しかし、保存数の多い機関が分譲数が多いとは限らない結果がでてきている(表3、太字)。当該保存機関に所属している以外の研究者が利用できる程度の品質が保たれていないことが、その原因の一つであろう。大学に設置された保存機関では、外部研究者の使用に対応できる程の品質管理に費やす時間はまず無いであろう。IFOは資金援助機関にだけ利用し易い保存機関ではない。国内外のいずれの研究者にも衡平な<sup>6)</sup>条件での運用がIFOの基本姿勢であり<sup>1)</sup>、また特に厳しい品質管理への信頼が膨大な分譲数に反映している。

表3 1998年度の国内の主な生物資源保存機関の実績(1)

機関略号	有菌株数							合計	譲渡数		合計
	糸状菌	酵母	放線菌	細菌	ウイルス a)	微細藻類	その他		国内	国外	
OUT	356	3,800	0	800	0	0	0	4,956	142	5	147
RIMD	0	0	0	2,660	0	0	0	2,660	188	2	190
GTC	0	0	53	17,503	0	0	0	17,556	986	235	1,221
IVR	0	0	0	5,000	0	0	0	5,000	15	5	20
IRMG	0	0	0	44,858	45	0	0	44,903	26	0	26
FERM	12	4	0	2	0	0	0	18	10	0	10
RIB	889	156	0	129	0	0	0	1,174	73	0	73
NIG	0	0	0	16,570	20	0	2,000	18,590	1,133	42	1,175
TSY	800	0	0	0	0	0	0	800	27	0	27
NIES	0	0	0	0	0	676	b)3	679	636	28	664
IFM	4,414	744	902	149	0	0	0	6,206	444	21	465
TIMM	2,764	4,038	0	0	0	0	0	6,802	123	0	123
IID	0	1	5	1,821	0	0	0	1,827	121	0	121
IAM	1,289	415	53	1,304	0	421	0	3,482	1,221	32	1,253
ATU	604	287	116	361	0	0	0	1,368	16	0	16
NRIC	447	1,411	9	3,382	7	0	0	5,256	268	13	281
MAFF	10,308	495	261	5,328	469	0	c),d)246	17,104	501	51	552
<b>IFO</b>	<b>7,858</b>	<b>3,075</b>	<b>1,685</b>	<b>2,875</b>	<b>69</b>	<b>0</b>	<b>d)496</b>	<b>16,058</b>	<b>8,281</b>	<b>472</b>	<b>8,753</b>
HUT	665	452	294	8	0	0	0	1,419	20	4	24
AHU	1,330	835	130	320	0	0	0	2,615	82	0	82
RIFY	50	640	2	540	0	0	0	1,232	15	0	15
JCM	1,125	1,987	1,762	4,261	0	21	e)135	9,291	2,474	488	2,962
I GE	1,072	1	0	0	0	0	0	1,073	5	10	15
合計	33,980	18,341	5,272	107,871	610	1,118	2,877	170,069	16,807	1,408	18,215

a)含バクテリオファージ、b)原生動物(原虫)、c)線虫、d)動物細胞、e)古細菌。

表4 各年度に保存した生物資源数と分譲数の推移

年度	H7	H8	H9	H10	H11	H12
西暦(4~翌年3月)	1995	1996	1997	1998	1999	2000
保存株総数	15,441	15,441	16,828	16,058	16,238	16,442
真菌	7,601	7,601	7,778	7,858	7,885	7,988
バクテリア	2,821	2,621	2,785	2,875	3,000	3,083
酵母	2,918	2,918	2,931	2,946	2,349	2,968
酵母(遺伝子)	129	129	129	129	123	133
放線菌	1,645	1,645	1,663	1,685	1,696	1,694
ファージ	70	70	69	69	69	69
動物細胞	420	427	473	496	505	507
分譲総数	8,708	8,367	8,153	8,753	7,503	8,501
国内	7,612	7,688	7,586	8,281	7,098	8,224
国外	1,094	679	567	472	405	277

## 2) IFO における 5 年間の生物資源株の保存と分譲

特許寄託株は法定に従い保管管理し、International Streptomyces Project (ISP) 株の管理は日本放線菌学会の所定の委員会と共同で実施した。生物資源株について、表4に記載した通り、保存株総数は6年間で1,000株程度増えたが、分譲数は殆ど変動なく、高い数値を推移した(表4)。微生物株については、分類学上の命名を見直し、新種の記載などをIFO Research Communications, 各種の専門のJournalやIFO List of Cultureなどに明記し、研究者の利用に供した。

また、動物細胞株については、2000年3月末に特許寄託株保存事業以外のバンク事業を終了し、ヒューマンサイエンス振興財団に移管したので、後で少し詳しく記載する。

## 3) 3人のキューレーター

欧米の博物館にはキューレーターと言って各保存品に精通している研究者がいる。国内の博物館などでは最近、学芸員という専門職名で紹介されることがある。生物資源保存機関においても、分類学・細胞学・保存学・生息域状況などを含めた保存株の特質について、一般の研究者と同等な知識を持ち、外部の専門の研究者と議論ができる担当者のことをキューレーターと称し、このような人が常駐することがその保存機関の発展に重要な役割を果たす。IFOでは入所後、10年から20年をかけて、専門

的知識に長けている担当者に育てる伝統があった。IFOには年間約1,000件近い問い合わせがあり、それらに科学的に適切に対応している。IFOには細菌類、酵母菌、糸状菌、放線菌、動物細胞などの部門があり、各微生物部門はそれぞれ各数千種にも及ぶ微生物株を担当した。IFOでは専門的な知識と技術を持つ研究者を育成するために大学でも、企業でも類を見ない人材育成を行ってきた。時期を越えて多くの担当者が育っていった<sup>3,4)</sup>。ここでは紙面の都合で3人のキューレーターに限って述べたい。IFOには、上述したように分類および保存の都合上(科学的な理由はあると思っている)、酵母グループ(Gと略す)には見方洪三郎、細菌Gには坂根 健、糸状菌Gには伊藤忠義がそれぞれ担当した。L乾燥法の確立への寄与により、坂根 健に日本微生物資源学会から研究

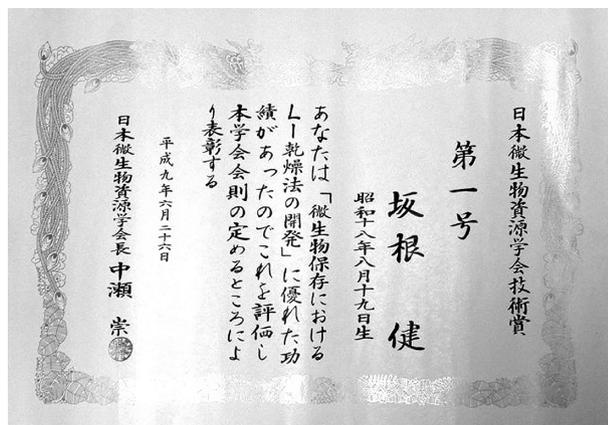


図2 日本微生物資源学会の1997年度（平成19）技術賞

技術賞（1997年）が与えられた（図2）。この技術はIFOの坂根 健、坂野 勲および坂本 豊が長年研究を続けた結果、確立した技術である<sup>12)</sup>。微生物の長期保存法として広く世界の研究者に採用されている。

3者とも共通していることは、入社してから退職するまでの長期間、微生物資源の管理を担当したことと、保存と分譲の作業の効率化のため基盤的技術の改善に貢献したことである。さらに、その時代に即応した分類学をマスターし、生物資源の利用を希望した研究者に常に同一品質の微生物試料を分譲することに努力した。分類学が進歩するにつれ保存している微生物株の学術名も変化していく。見方洪三郎はIFOに保存している酵母株を新しい分類基準に従って再分類し、その結果を学会誌、IFO Research Communications や List of Cultures に記載した。微生物乾燥標品を自動的にアンプルに保存日を印字して封入し、4℃で保存するシステムを構築し、約20万本の資源株を整理した。このシステムは後に、国の機関でも採用され、運用されている。カビ・糸状菌の分類と保存を担当した伊藤忠義は最新の分類基準に合わせて数百の保存株を再分類した。糸状菌の寄生した植物標本（Herbarium）を管理し、国内外の分類学の研究者の利用に供した。湿度と温度を一定に管理し、定期的に標本を挟んでいる濾紙を取り換える地味な作業であるが、この標本群は植物病理学上重要な標本になっているので、海外の研究者からの利用もある。

見方洪三郎、坂根健および伊藤忠義はそれぞれ保存していた微生物株の性質を精査し、それらの結果をIFO Research Communications の各号に英文で記載しているので、海外からの記述の問い合わせにも対応している。いつかは、PDF化されて、ネットで検索される日も来るであろう。IFOには、このようなタイプの研究者は

ISP標準株を担当していた西井忠止や、長谷川建夫、黒島健一などが在籍していた。これらの研究者の共通している活動のスタンプポイントは、ユーザーのクレームを良く聞き、それをユーザーの希望事項として対応したことである。これらのユーザーへの適切な対応が分譲数の増加にも繋がり、IFOは国内外の研究者コミュニティーからの信頼を継続して得ることができたのはこのような優れた研究者あつてのことである。

1998年～1999年頃、糸状菌を担当していた伊藤忠義は *Aspergillus* 属に分類学的に所属するIFO保存菌株の分類学的整理を行っていた。この *Aspergillus* 属に属する種は数百種が知られており、かび毒を生産する菌種も多い。IFOに保存している *Aspergillus* 属の2菌株 (*Aspergillus parasiticus* IFO 30179; *Aspergillus flavus* IFO 30180) がアフラトキシンを生産していることが判り、データベースに記録した。分類学的にはかび毒を生産するかどうかは、*Aspergillus* 属の重要な化学的分類指標であった。一方、食品産業では古くから *Aspergillus* 属の菌を多くの発酵に利用してきた。発酵は清酒、味噌・醤油を製造する日本古来の大事な食文化の一つであるし、安全な食品であることは我々の実生活から証明されてきた。この *Aspergillus* 属でありながらトキシンを生産しないという分類学上の矛盾があった。その当時（1999年3月）、千葉大学の西村和子教授らをIFOにお招きし、講演をしていただいた。教授らの話では、トキシン遺伝子の解析結果から遺伝子に変異があり、トキシンのmRNAが産生されていないことをみつけたとのことであった。その後、*Aspergillus olyzae* のアフラトキシン生合成遺伝子が機能していないことによってトキシンが合成されていないことが分かった<sup>13)</sup>。なお、このトキシン遺伝子を解析した際、世界の生物資源保存機関が提供した数多くの *Aspergillus* 菌株が役立つことを明記しておきたい。

#### 4) 動物細胞株の移動

時代を遡るが、IFOが動物細胞株の保存事業を始めたのは、1984年である。生命科学の急速な発展が企業の活動にも影響を与え、知的財産である特許の取得の必要が生じてきた。その特許申請の保証品として、公的に認定された保存機関に動物細胞を寄託しなければならなくなった。国内では該当する機関がなく、海外のATCCかパスツール研究所に送付する必要があった。その輸送費等には約数百万円必要であるため、企業の負担が大きかった。そこで、IFOはヨーロッパ特許庁（EPO）から微生物の特許寄託の保存機関として承認されていたので、書類審査の結果、動物細胞の保存機関としても承認を受けることができた。2000年までに約200株の培養細胞株を特許寄託株として保存した。

動物細胞株も微生物株と同様に厳しい品質管理が要求される。特に他の細胞混入の汚染には細心の注意が必要である。動物培養細胞の汚染で多いのはマイコプラズマ汚染である。図3はマイコプラズマに汚染されたCKT-1 (IFO 50003) 細胞の走査電子顕微鏡像である。吉田東歩の研究課題であり、この写真は当時の朝日新聞に掲載されたものである。1993年われわれは国内の主な研究機関で使用している培養細胞のマイコプラズマ汚染を調査した。結果は驚いたことに約50%がマイコプラズマに汚染されていた<sup>14)</sup>。その後、日本組織培養学会が中心となり、国内研究者にマイコプラズマ汚染の実情を訴えるキャンペーンを展開し、マイコプラズマに汚染していない培養細胞や、由来動物種の同定された細胞株のみを分譲することが国内の主要な細胞バンクの品質管理の原則となった。このように我々の汚染検査は誤った研究結果を食い止めるのに大いに貢献した。マイコプラズマ汚染細胞の論文掲載の中止や、汚染細胞を用いたために研究プロジェクトが中止になった例もある。汚染検査のもう一つの重要な項目に細胞の由来動物種の同定である。この件でも忘れることが出来ないことがあった。大きな学術賞を受けた論文に記載されたヒト細胞株が、依頼を受けた我々の検査結果からヒトではなく、ハムスター細胞由来であることを判明し、その研究結果は学術界から抹消されることになった(和光純薬の会報にコラムとして4回掲載)。これらのことから細胞バンクは言うまでもなく、研究者自らも不十分な品質管理は研究生命までも奪ってしまうことを肝に銘じなければならない<sup>15)</sup>。

動物細胞部門を設立してから16年間の活動の中でいくつかの新規の細胞株を樹立した。吉田東歩は脳組織関係

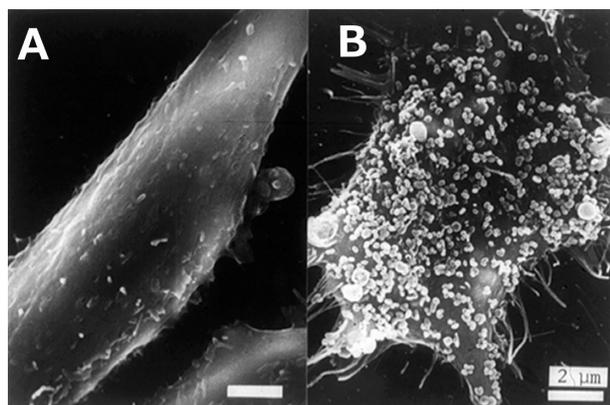


図3 *Mycoplasma hyorhinis* に汚染したCKT-1細胞。(A)非汚染細胞(B)マイコプラズマに汚染した細胞。吉田東歩が撮影した。当時の朝日新聞の科学欄に掲載された原画を修正した。

の細胞株 (AP-16 IFO 50424, MA-89 IFO 50293) を樹立し、細胞バンクに登録した。中垣内弓子はマウス脳神経幹細胞株 (MEB5 IFO 50472)、竹内昌男はマウス脳グリア細胞株 (KT-5 IFO 50161) を樹立した。佐藤元信は mouse olfactory cell (DBC1.2 IFO 50484) を初めて単離し、また既存の細胞株に生化学的なマーカーを入れた細胞株 (Neuro-2aTG IFO 50495, PC-12TG IFO 50496) を樹立し、バンクに登録した。久野晴彦<sup>16)</sup>や辻 憲吾は細胞株の性質を精査した結果を論文に発表した。黒田 (現姓、岡田) 暁子は多くの図表と表紙のイラストやカタログの装丁などに携わった。多くの細胞株が細胞バンクのリストに記載できたのは、これらの人たちの熱意に満ちた研究の賜物である。

2001年3月、厚生省からの要請により、分譲可能な細胞株、約250株はヒューマンサイエンス振興財団の動物細胞バンクに移動した<sup>17)</sup>。IFO番号を付けたまま、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから世界の研究者に分譲することになった。この移設に関しては、ヒューマンサイエンス振興財団の竹中浩治理事長と神崎俊彦専務理事の尽力による。特許寄託株については、30年間発酵研究所が保管する責任があるので、末永 格が責任者として保管を継続し、同時にそれまでの特許寄託・保管業務関係の書類を全て整理した。

## 5) 受賞

国内の学会から表彰された事例を報告する(表5)。IFOの事業は最先端の研究を支え、基盤となる、地味な仕事である。このような表彰は、本人にとってももちろんのこと研究所にとっても大きな誇りであり、財産でもある。

坂根健の業績については既に記載した。中桐昭は糸状菌の分類学の専門家である。特に、汽水領域に生息するマングローブ群生林に寄生する糸状菌を海岸、河川域など広範囲の地域から単離し、多くの新種を発見した。それら糸状菌の生活環を明らかにした。田村朋彦は国内各地や中国の土壌から放線菌を多数単離し、多くの新種を発見した。伊藤忠義はマングローブ生息域や国内各地の燃焼した土壌から多数の糸状菌を単離し、分類学的研究を行った。これらの研究が評価された。

表5 1995年から1999までの受賞

年	学会	受賞者
1995	日本菌学会	菌学研究奨励賞 中桐 昭
1995	日本放線菌学会	研究奨励賞(浜田賞) 田村 朋彦
1997	日本微生物資源学会	学会賞技術賞 坂根 健
1997	日本油化学会	エチター賞 伊藤 忠義
1999	日本伸銅学会	学術論文賞 坂根 健

## 6) タイムカプセル

1970に開催された大阪万国博覧会(EXPO70)のイベントのひとつとして生活文化の記録保存を行った。図4Aに示すようにTime Capsule EXPO '70「記録書」に記載されているが、「生物資源の生命体の保存とその情報の保存の象徴」とも言われた<sup>18)</sup>。飯島貞二の記録(発酵研究所の歴史)には発酵研究所の役割について記述されている<sup>4)</sup>。当時国内の研究室で長期保存可能となっていた10種類以上の微生物株を国内の各担当研究室で調製し、アンプルに封入し、それらの標品を特製カプセルの中に保存した。それから30年後の2000年にカプセル内で保存していたアンプルから各微生物株を取り出して、生存の有無を調べた。その結果は発酵研究所が担当していた3微生物株(コウジカビ IFO 4290, 納豆菌 IFO 13169, あおかび IFO 5754)だけの生存を確認することができた。武内真理子, 伊藤忠義がそれぞれ細菌株と糸状菌を担当したものである。これによって, 1970年当時, 発酵研究所で開発し, 微生物の保存・分譲に運用していたL-乾燥法は微生物の長期保存<sup>12)</sup>に優れているということが見事に実証された。この30年の眠りから起こされ, 再び培養されたこうじ菌から小西酒造(株)が日本酒を醸造し, タイムカプセル記念パーティー(2000.11.23)の席上で参加者, 数百人にこのお酒が振る舞われた。伊藤忠義と共にパーティーに参加し, 1970年に嗜まれていた清酒の味を2000年にも再び味わえた感動は, 長期保存技術の成功とともに格別のものであった。科学的には, 1970年に作製した微生物株の生物学的性質が30年間保存されたことになる。IFOの生物資源保存機関として運用していた微生物保存株の品質管理の信頼性を科学的に証明したことになる。この社会的貢献が, 何にも優る出来事であった。次回, 2100

年にカプセルは再び開封される(図4)。その時, だが, これらの菌株の生存試験を行う幸運を掴むのだろう。その時, 担当研究者が100年以上も前の我々の感動と同じ喜びを味わうことであろう。

## 7) 研究プロジェクトでの活躍

文部省, 科学技術庁, 厚生省や経済産業省などの公的研究費による研究や, 日本放線菌学会のISP菌株の保存事業など, 研究所の所員は多くの研究班に参加し, 活躍した(表6)。

表6は研究所の所員全員が参加した通産省, 科学技術庁などの研究プロジェクトである。ここでは1997から2000まで行った文科省・科学研究費による保存株のデータベース作製事業と経済産業省の新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)による情報管理システムの構築事業について, 述べる。このプロジェクトの目的はIFOBRDBを構築するだけでなく, フィールドワークによる菌叢の解析や単離した新菌種の微生物株をIFOBRDBに登録し, また, 構築したIFOBRDBに収容された情報を利用することによりIFOBRDBの有効性を検証することにある。これらのプロジェクトの内容は4つに分類される。① IFO所内に保存している全ての菌株についてのデータをデータベース(IFOBRDB)化する。②データベース(IFOBRDB)の利用方法として, a)菌株の検索のシステムの試作, b)IFOBRDBから保存資源の自動カタログの作成, c)外部の保存機関とon lineで接続し菌株のデータベースを相互利用可能なシステムの構築, などがある。③海外の生物資源保存機関との共同研究による収集システムの検証。④海外の生物資源保存機関の情報収集。以下, それぞれについて少し詳しく記載したい。

## 7-1) IFO Biological Resources Data Base (IFOBRDB)の作製

本プロジェクトは文部省MEXTと通産省NEDOから3年間で総額約1億6000万円の資金援助とIFOの予算で実施した。当時はWindows 95が開発されて, これに関連したコンピュータソフトウェアが盛んに開発されていた。従来のDOSのコマンドから開放されつつあった時期でもある。国内には生物資源の汎用性の高いデータベースを本格的に構築した生物資源保存機関がなかった。

IFOでは1980年代から, 飯島貞二, 坂野 勲氏らが生物資源の情報をノート記載(Fig. 1)からコンピューターによる電子化を開始していた<sup>10)</sup>。ヨーロッパ特許庁(EPO)の特許寄託株を保管していたこともあり, 情報のセキュリティーの観点からも電子ファイルの管理が必要であった。その後, 佐藤邦子が引き継ぎAS400(IBM製)を運用していた。今回のプロジェクトでは, セキュリティー性

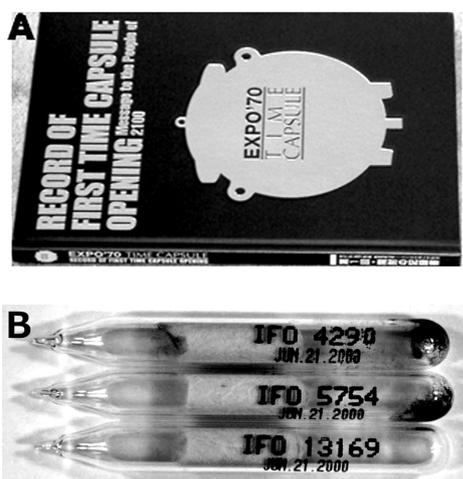


図4 タイムカプセル事業の2000年時の報告書(A)とカプセルに再び包埋された3種の菌株(B)。

表6 1995年度から2000年度まで導入した主な研究費

年	研究課題	担当官庁	研究者	金額 (万円)
1995	クロミスタ生物群の細胞特性と系統の研究	文部省	中桐 昭(分担)	31
	マングローブ汽水域に生息する真菌類の分類および生態に関する研究	藤原NH財団	中桐 昭(分担)	46
	千葉県の実生菌調査	財千葉財団	中桐 昭	10
	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,700
1996	創薬科学総合研究事業: 研究資源の開発に関する研究	厚生省	竹内昌男	200
	マングローブ生態系の微生物相の解明とその培養株の収集保存	文部省	中桐 昭	50
	マングローブ汽水域に生息する真菌類の分類および生態に関する研究	藤原NH財団	中桐 昭(分担)	46
	千葉県の海生菌調査	財千葉財団	中桐 昭	10
	植物内生菌における寄生性とは -植物内生菌 <i>Phyllpstickta</i> の分類学的研究	文部省	岡根 泉	100
	<i>Flavobacterium</i> 類縁細菌群の多様性と系統進化に関する研究	文部省	中川恭好	90
1997	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,700
	情報公開費: 画像データベースの構築と維持	文部省	佐藤元信(分担)	70
	創薬科学総合研究事業: 研究資源の開発に関する研究	厚生省	竹内昌男	200
	マングローブ生態系の微生物相の解明とその培養株の収集保存	文部省	中桐 昭	120
	塩生植物: アッケシソウおよびハママツナにおける内生菌の分類・生態学的研究	文部省	岡根 泉	190
	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,000
1998	生物系研究材料のデータベース化及びネットワーク化に関する基盤的研究開発	科学技術庁	竹内昌男(代表)	530
	情報公開費: 画像データベースの構築と維持	文部省	佐藤元信(分担)	70
	マングローブ生態系の微生物相の解明とその培養株の収集保存	文部省	中桐 昭	60
	紀州熊野一帯における隠花植物相の再調査	藤原NH財団	中桐 昭(分担)	4
	塩生植物: アッケシソウおよびハママツナにおける内生菌の分類・生態学的研究	文部省	岡根 泉	30
	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,050
1999	生物系研究材料のデータベース化及びネットワーク化に関する基盤的研究開発	科学技術庁	竹内昌男(代表)	530
	産業有用微生物の高度保存・管理システムの開発	通産省	竹内昌男(代表)	8,000
	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,050
	亜熱帯微生物相の解明および培養株の収集保存	文部省	中桐 昭	170
	微生物標準株の整備事業	通産省	波多野和徳(代表)	1,800
	生物系研究材料のデータベース化及びネットワーク化に関する基盤的研究開発	科学技術庁	竹内昌男(代表)	530
2000	産業有用微生物の高度保存・管理システムの開発	通産省	竹内昌男(代表)	6,700
	細胞バンク・遺伝子バンクの管理	厚生省	吉田東歩(代表)	1,050

a) 藤原ナチュラルヒストリー振興財団, b) 財千葉県史料研究財団

能の高い AS400 と汎用性の高い PC を併用し、研究所に保管している 16,235 株についての生物資源情報を一括管理可能なデータベース (IFOBRDB) を構築した (図 5A)。微生物株は中桐 昭、西村久美子、中川恭好、田村朋彦など、動物細胞株は佐藤元信、特許株には佐藤邦子などが全所員の希望を採り入れた基本設計を作成するため、データベースの「要件定義」について IBM 担当者と半年以上かけて相談し、2 年近くの年月を経て IFOBRDB を完成させた<sup>9)</sup>。

## 7-2) IFOBRDB の運用

所内の作業は従来複数個の PC で保管していたデータのすべてを IFOBRDB に収納することから始まり、新規データのインプットと保存データの修正後、完成した DB を閲覧、印刷することなどである。各グループのデータ記載内容にはそれぞれ特徴がある。細菌のように性質を数値化、アルファベット化し易い分野と酵母、糸状菌のような形態の記載が重要である分野がある。培養細胞も後者の部類に入る。IFOBRDB のデザインから運用が始まるまで、実に 2 年がかりの大仕事だったが、これまでのすべての記録を同一 DB に収容できたことは業務の運用におおきな力になり、次なる発展を感じた。これも

IFO の希望を理解と熱意でもって受けてくださった IBM の担当グループがあつたことである。感謝にたえない。後になって、担当者の一人であるプログラム専門の野尻逸予氏が IFOBRDB を作成に寄与した功績により、IBM 社から社内表彰された、と聞いた。

このデータベースの運用の一環として、データの output 機能を使いカタログ作成を自動化した。Microorganisms - 第 11 版 (2001) と Animal cells - 第 6 版 (2000) はこの IFOBRDB から作成した (Fig. 6)。ハードコピーのカタログの他、検索機能の優れた CD-ROM も作製し、ハードコピーに添付して国内外の研究者に配布した。Output 機能の利用のもう一つは外部研究者から生物資源株の最新の情報を検索閲覧できるように構築することである。各組織や機関ではインターネットを通して、各組織の活動状況を real time で世界に発信し、それらを外部から閲覧可能になり始めた時代である。ホームページ (HP) を持っていない組織は家「ホーム」を持っていないのと同様な意味である、と冗談で言われていた。IFO にとって外部の人に組織の活動内容を知らせるもっとも速やかな方法の一つでもある。IFOBRDB から作成した情報の一部を 1998 年、試験的に Nacsis のサーバー (<http://>

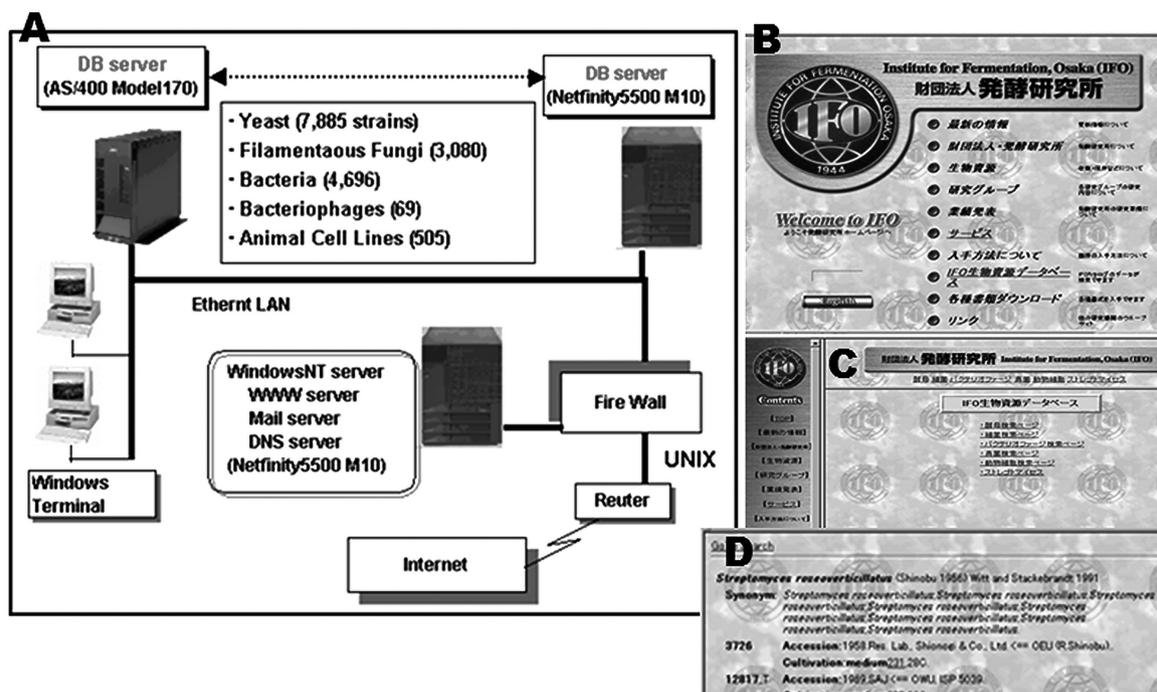


図5 IFOBRDB と所内ネットワークの構成

A. システム構成 B. IFOのホームページ C. 生物資源株の検索システム  
D. 放線菌群の分類学用データベースの検索モデル

www.soc.nacsis.ac.jp/ifo/index.html) から発信した。その後、2000年に IFO ホームページ (<http://www.ifo.or.jp>) を作成し、IFO が独自に情報を発信した (図 5B)。さらに、データベースの情報はデータの新規登録、訂正を遠隔地で行ったり、複数の研究機関で情報の共有するパッチャルな DB (CORBA と言って、複数の DB サーバーをあたかも一か所にある一つのサーバーと見えるような DB サーバー) の作成を国立遺伝学研究所の菅原秀明教授と共同で構築した<sup>19)</sup>。

このようにして生物資源に関する情報を DB 管理したが、さらに、生物資源保存機関として重要な情報管理は保存資源の在庫管理である。所内には約20万アンプルの生物資源株が保管されている。L 乾燥品の作成法、印字法、アンプル収納・保管方法を改良し、この保管庫の管理を含めた在庫管理とそのデータを IFOBRDB の中で一括管理できるようにシステム化した。これにより、正確な分譲作業がスムーズに実施できるようになった。

### 7-3) タイ・カセサート大との共同研究

沖縄西表島でのフィールドワークを糸状菌グループの中桐 昭が主体となって毎年実施してきた。それを IFO 全体のプロジェクトと位置づけて、田村朋彦 (放線菌グループ)、中川恭好、内野圭仁 (細菌グループ)、見方洪三郎 (酵母グループ)、伊藤忠義、中桐 昭、岡根 泉 (糸

状菌グループ) が試料採取に参加した。研究所に持ち帰って、杉本美香、西井忠止など加わり、まさに所員全員で微生物株の単離、品質管理を行うことにより、多数の新種の発見ができた。その成果を IFO Research Communications や関係する Journal に記載した。このフィールドワークの経験を活かして、タイ国の研究者と共同でタイ国のフィールドワークを行った。IFO の糸状菌グループの中桐 昭、伊藤忠義、岡根 泉らが Leica Manoch (タイ・カセサート大、タイ・Biotech) と「熱帯マングローブ域に生息する微生物に関する共同研究」を実施した。多くの新種を発見し、これらを IFOBRDB に登録した。

### 7-4) 海外の保存機関 (米国 ATCC および NRRL) の視察

生物資源保存事業における IFO の役割と将来の発展のため、他機関を見学・調査し、IFO の活動と比較検討することが一つの指針を与える場合がある。当該事業の先人の一つと認められている米国の American Type Culture Collection (ATCC) (R. Hay, S-C. Jong), NRRL (C. Kurtzman, D.P. Labeda), や Coriell Institute for Medical Research (CIMR), National Disease Research Interchange (NDRI) などの研究所を見学し、IFO の今後の活動の参考とした。それぞれの機関の運営及び活動が独創的であり、生物資源保存事業が着実に発展していることが判った。また、これらの研究機関は米国政府の資金

援助を受けているが、政府の行政機構から独立した運営形態が保たれているようだ。詳細は波多野和徳、吉田東歩の報告書に記載されている (1998. 9, 波多野和徳, 吉田東歩の私信)。

#### 8) 出版物

隔年ごと、IFO Research Communications を発行した。各2年間の活動の総括や、所内での生物資源の単離や分類学的研究などの original reports を記載した。研究所を紹介する英文・和文パンフレットを随時、カタログ (ハードコピー、及び一部 CD-ROM) は約3年ごとに発行した。主な出版物は以下のようである。②, ③については、Fig. 6 に示した。

- ① IFO Res. Commun. **17**, 1995; **18**, 1997; **19**, 1999; **20**, 2001.
- ② LIST OF CULTURES, MICROORGANISMS, **10th ed.** 1996; **11th ed.** 2001.
- ③ LIST OF CULTURES, ANIMAL CELL LINES, **5th ed.** 1997; **6th ed.** 2000.
- ④ Institute for Fermentation, Osaka (English Leaflet) 1995; 2000.
- ⑤ 財団法人発酵研究所 (和文リーフレット) 1995; 2000.

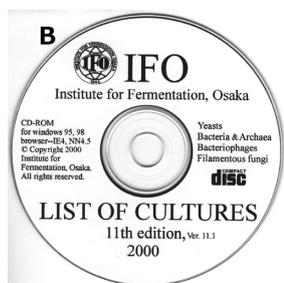
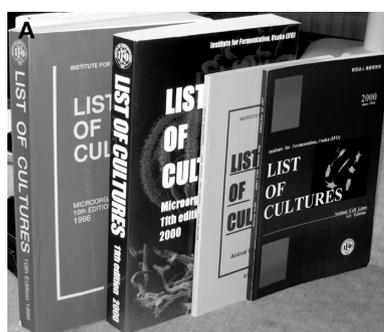


図6 A. カタログ類。左からList of Culture, Microorganisms 10th ed. 1996; 11th ed. 2000, List of Cultures, Animal cell Lines, 5th ed. 1996; 6th ed. 2001.  
B. CD-ROM Catalog, List of Cultures, Microorganisms 11th ed. 2000.

#### 9) 国内研究会の開催および外部研究者との交流 国際学会・会議への参加

1995~2000年の間 IFO の主催での学会の開催は、日本微生物資源学会年会 (1998), 第16回微生物化学分類研究会 (1996.11), 日本組織培養学会シンポジウム「神経細胞の発生・分化・機能の解析」(1997.11) であった。

口頭・ポスター発表 (海外を含む) と論文発表の総数は表1に記載した。国際学会などへの参加は、竹内昌男が WFCC の理事会のため、伊藤忠義が研究発表のため ICC-8 (オランダ, 平成8年) へ、竹内昌男, 波多野和徳, 中川恭好が研究発表のため ICC-9 (オーストラリア・プリズベーン, 平成12年) などである。国際会議として竹内昌男, 波多野和徳が OECD の会合に (フランス, 平成12年), その他, 竹内昌男が台湾食品工業発展研究所 (台湾, 新竹, 1999) へ、田村朋彦が中国へ、武内真理子が韓国へ、各国の研究者との会合に出席した。

#### 10) 国内外からの来訪者

1995.4 (平成13年度) ~ 2001.3 (平成18年度), 国内外から研究者を含む多数の来訪者があり、講演および情報交換を行った。国外来訪者の一部の方々は以下の通りである。

- ① Dr. L. Manoch (Kasetsart Univ.), M. Tanticharoen (NCGEB), P. Pitakpaivann (Dept. Agriculture), P. Atthasampunna, W. Potacharoen, and V. Arunpairojana, and A. Mahakhant, (Thailand Institute of Scientific and Technological Research), Thailand
- ② Dr. C. Kurtzman (NRRL), R.J. Hay (American Type Culture Collection) and Dr.T. Myoda (Rockland), M.C. Aime (Virginia Polytechnic and State Univ.), U.S.A.
- ③ Dr. N.L. Dung, P. Van Ty, T.B. Thuanand and N.T. Thanh (Hanoi Univ.), Vietnam
- ④ Dr. D. -H, Lee (Forestry Research Institute), J.-D. Lee (Pusan Univ.), Y.-H. Park, Y.-K. Sim (KCTC), J. -H. Yu (Yonsei Univ.) and S.-K. Kim (Souzan National Univ.), Korea
- ⑤ Dr. I. Gandjar, M. Asturi (Univ. of Indonesia), and P. Lisdiyanti (Indonesia Institute of Science), Indonesia
- ⑥ Dr. K. Kerstern, P.A.R. Vandamme), and J. Swings (Univ. Ghent), Belgium
- ⑦ Dr. C-Y. Chen (Culture Collection and Research Center) Taiwan
- ⑧ Dr. M. Guangzhen and Z. Peijin (China Academy of Sciences) China
- ⑨ Dr. J-F. Bernardet (Centre de echerches INRA) France
- ⑩ Dr. J. Kaiser (Max-Plank Institute) Germany
- ⑪ S. Vikineswary (Univ. Malaya) and C. Nyorya, S.A. Alias (Univ. Malaysia), Malaysia

- ⑫ R.A. Grzybowski (Inst. Agricultural food and Biotechnology), Poland
- ⑬ L.M. Branchini (Univ. Campinas), Brazil
- ⑭ G.D. Castro-Bernas (Philippin Univ.), Philipin.J. Lehocki (NCIAM), Hungary
- ⑮ H. Prilinger (Univ. Bodenkultur), Austria

## 発酵研究所の生物資源保存事業を取り巻く状況

国内の生物資源保存事業の状況の変化に伴い、IFO も対応にせまわれた。特記すべき下記の2項目について記載する。

### 1) 発酵研究所の生物資源保存事業を取り巻く状況に対する意見交換

当財団の2000年3月の理事会・評議員会の終了後、最近の通産省で構想している Biological Resources Center (BRC) について意見交換を行った(2000.3.16)。冒頭、「通産省 BRC 構想」に関するメモが配布された。その会合の要旨を記載する。

#### 一【通産省 BRC 構想】に関する(財)発酵研究所

理事・監事・評議員による自由意見の要旨一

本日、国家プロジェクトとしての通産省 BRC 構想についての解説をお聞きし、発酵研究所の今後の活動を進めていくためにも大変参考になる内容であったと思います。理事・評議員の方々には、懇親会開催までのしばらくの時間を自由な意見交換の機会としたいと存じます。先生方の忌憚のない御意見をお願い致します。

- (1) I J 理事： IFO の運営にとって職員の採用の仕組みを作ったことは意義がある。しかし、①事業所開設に伴い事務業務の負担が大きくなるか。②タケダからの出向者との労働条件の違いによる研究所の運営に影響がないか。③職員採用に関する、理事会の役割は？
- (2) T U 理事： ①非常に大きい。しかし、研究者を確保することが研究所運営に急務である。②タケダの出向者の報酬は実績主義の評価になっている。IFO職員も同じ実績主義の評価基準を適合する。③「寄付行為」によると、理事会の承認事項になっている。
- (3) O D 理事： 通産省のかずさに作る BRC に IFO が参加するという図がかいてあるが、新しい BRC は独自に運営するのか。官主導で先ず建物を作り、中身(運営費や研究内容)についての議論が伴わない状態で IFO が組み込まれる(後での発言をここで纏めて記載した)ことに危惧を感じる。厚生省・

HS は大阪泉南地区に建物をつくったが、運営形態はどのようになるのか。特に、IFO との関係とその他の Culture Collection の活動とのバランスをどのように調整する計画か。

- (4) S N 理事： ここで表示された通産省・BRC 構想の中に、IFO が BRC 機関に矢印で示しているが、これは IFO が通産省 BRC に取り込まれることを示しているのか。微生物 Culture Collection はそれぞれ特色を持って発展してきた。通産省の BRC はどのような特色を保持する機関を想定し、その具体的な方針はなにか。
- (5) T N 評議員： 大阪泉南地区に細胞・遺伝子・ヒト組織・胚のバンク機能を持つ組織を建設した。2000年9月に建物を完成、2001年から運営、3年後からは、独立して運営する予定であり、今後も IFO の技術的支援をお願いしたい。
- (6) S N 理事： IFO の研究計画の中に、ヒト脳神経幹細胞の樹立とあるが、法的問題はクリアしているのか。
- (7) T U 理事： 海外から入手し、予備的実験を進めている。国内の材料については、インフォームドコンセント等、倫理規定に遵守して得られた試料の入手が当面の課題である。
- (8) F N 理事： タケダの経営企画部で検討した際、動物細胞 G の運営に経費がかかり過ぎて、IFO の運営を悪化させたと指摘されいている。また、タケダ側の立場から発言すると、「武田が永久的に IFO を支援する」という約束はできない。
- (9) S N 理事： 動物 G の設立の際、タケダからそれなりの資金を投入したはずである。(注：1984年に動物 G が IFO にできたが、その際4,500万円を追加して1億7,500万円を毎年寄付されることになった。1984年以来継続している。また、経営に影響を与えないために1986年には基本財産として2億円をタケダから受けている。)
- (10) T T 評議員： バイオ産業とその発展を支える基礎となる微生物 Culture Collection Center を考えるとき、熱帯地域は微生物の宝庫であり、それらの地域の国々との協力関係を推進するためにも日本を代表する BRC の建設が急務である。これから作られる通産省の BRC は独立行政法人組織で運営することになると考えている。同時に Culture Collection は national な面を持つ研究組織であること、国際支援の中で活動できることが求められている。このような条件を満たすためには、現在活動している JCM や IFO の協力は欠かせない。現在建設中の「かずさアカデミーパーク内の BRC 専

用施設の予算60億円が、従来の単年度予算の域を越えて3年間の予算として承認されている。このような施設とそれを運営する組織は日本の将来を考えるとき必要である。

- (11) O M 理事： 今まで、それぞれの Culture Collection は独自の特徴を出しながら活動してきた。今後、各 Culture Collection との give and take の調整はどのようにしていくのか。また、IFO は民間の組織として flexibility の高い活動をしてきた。通産省主導のこれまでのやり方を見る限り、「先ず国ありき」で、これが今後、通産省の独立法人としてその中に取り込まれ、運営すると仮定するなら、IFO が培ってきた「よさ」が失われるおそれはないのか。そして、national としての機能の要件は？通産ベースで計画して良いのか？文部省は？厚生省は？他からの協力はどのようにする計画か？
- (12) B P 理事： 通産省の情報開示が少なすぎる。Culture Collection の事業は各 collection が独自に活動してきた。Culture Collection は文化事業と言える。研究者が主体的に活動しないと成功しない。この場合、national とは？、JCM とはどのような文化の整合性を採るのか？IFO、または JCM だけが変わり、それで日本の Culture Collection という文化が決まる（成功裏に発展する）ものではない。日本全体の文化としての研究活動の整合性を採る必要がある。また、地球環境の理解を踏まえた上での微生物の研究が必要である（注：地球上に生息する微生物のまだ1%しか学問的に明らかにされていない）。
- (13) K G 評議員： Culture Collection は生物資源とそれの情報の両者が並行して整備される必要がある。通産省が建物を作っただけでは問題解決にはならない。国内の Culture Collection をどのように整備するか？関係者のコンセンサスを作成することが先決である。また、海外の研究者からみて「日本の Culture Collection の窓口はどこか判らない」との苦情を聞く（注：Culture Collection に関する問い合わせの手紙を受け、正確な対応をする国の組織がない）。この通産省の BRC がこの業務を担当するということか。また、IFO の観点からは、① IFO の55年間の歴史がどのように総括されるのか？②研究者処遇をどうするのか？③保存している生物資源をどのように質を高めていく計画か？これらの要素に基づき IFO 及び日本の Culture Collection の発展のため、明確な立案をする必要がある。一カ所の Culture Collection の問題ではなく、日本全体の問題であり、海外とどのように co-operative

に活動するかが重要である。海外からの視点にたつて、今後のあるべき BRC の姿を考え、それに IFO としても協力して行くべきである。

- (14) T T 評議員： 通産省 BRC の情報の開示については懸念している。IFO, JCM の役割については、これから2年間で（建物ができるのは2年後である）十分検討されることが必要である。
- (15) N S 評議員： BRC の内容については通産省の言っていることがころころ変わるので、方針がよくわからないし、いまのところ、具体性のあるものはでていないように感じている。理研に参加するように依頼されたことはない（理研の上層部および JCM にもないし、理研の上層部からも聞いていない）。この通産省の BRC の中身（活動内容）を決定する委員会（open）を作ることが大切である。その場で、日本の Culture Collection はどうあるべきかという“内容”の問題を検討すべきである。
- (16) M T 理事： IFO に通産省から具体的な申し入れはない（タケダの方にあっただけである）。
- (17) T N 評議員： 国の仕組みとして、国が BRC を建設しようという気になったことは、BRC をある程度理解してきたという点では評価したいし、今回、景気対策として補正予算を執行したというのは、それなりに予算を獲得するという観点では重要である。ただ、この計画が上手く国の科学技術の発展のため、どのように企画・実行するかが重要である。そのためには、学者、研究者が initiative をとり、積極的に運営に参加し、実行することが大切である。
- (18) I J 理事： 2つのポイントについて意見を述べる。JCM が設立されたのは1981年である。その際、タケダの上層部からの意見として、近い将来には IFO が必要無くなるではないか、という意見があった。しかし、その後18年を過ぎ、JCM と IFO は共に好ましい競争相手としながら、共に発展し、日本および世界の Culture Collection 事業に寄与してきた。日本のなかで、この大きい2つの機関が独立に存在することの意義は大きい。すなわち、JCM は日本のナショナルコレクションとして設立され、今日まで発展してきている。今回の通産省 BRC 構想はこの JCM と機能や役割の面でどう分担するかがハッキリしていない。単にナショナルコレクションで規模が大きいものを作るという説明だけでは、JCM や IFO に加えて新しく設立される意義が認識できない。BRC が国の管理下になると、品質管理という Culture Collection に必須な研究が、研究費管理のもとで管理され、研究の質が

損なわれかねないことも危惧することである。もう一つの点は、動物細胞 G が IFO の経営を悪化させたという見方は正しくない。動物細胞 G が設立された時、タケダから 2 億円の基本財産積み増しがあった（注：それだけではなく、毎年 4,500 万円の寄付の増額があり、1 億 7,500 万円の寄付はそれ以後 2000 年まで続いている）。動物細胞 G ができたのは 1984 年であり、1990 年まで単年度黒字を続けている。赤字経営が続いたのは 1995 年以前の数年前からである。その原因は 1991 年から単年度の赤字財政になりながら、人件費の増加を続けたことが原因である。

- (19) MB 評議員： その新しい組織の性格は、その責任者、すなわち所長の人事により大いに左右されるので、通産省・BRC の初代所長に望ましい人物の就任が実現できるよう働きかけることが最も現実対応として有効な方策である。
- (20) IN 監事： IFO の所員はどのような希望をもっているか知らないし、また、現時点では、通産省の BRC についての情報が少なすぎるので判断しがたい。通産省主導での BRC の建設は産業育成への姿勢が優先するため、IFO のような Culture Collection を続ける上で懸念材料となる。
- (21) OS 監事： 大学の Culture Collection が通産省の Culture Collection に吸収されるのであれば、生物資源がそれなりに利用されるという点では有意義なことである。

理事長： 大変有意義なご意見ありがとうございました。それでは、この議論は懇親会の際にでもまた続けることにして終了したいと思います。

追記： 後に田村學造先生からご意見をいただいたので、その要旨を記載しておきたい。

【拜啓 陽春の候 益々ご清祥の御事大慶に存じます。御恵送賜りました通産省 BRC 構想についての意見メモを拝読致しました。

BP 理事、IN 監事と同意見でありましたので敢えて申しませんでしたが発酵研究所は 55 年の歴史を担い研究に裏づけられた保存事業をつづけてこられたと思います。BP 理事が言われました様に culture collection は既に文化であると思います。また、IN 監事が言われました様に坂口謹一郎先生が御指導され武田長兵衛社長が全面的にバックアップされて発酵研究所が発展して来られたものと存じます。IFO と言えば世界にそのまま通用すると思います。通産省がかずさアカデミーパーク内に 60 億円で建物だけをつくるというのはいささか本末転倒の感があると思います。文化は中身であり、まず中身のことが

ら話が始まるべきと思います。これでは OD 理事と同様に危惧の念を感じざるを得ません。IN 監事がいわれる様に通産省主導の BRC の建設は産業育成の姿勢が優先されるとすれば懸念材料と思います。通産省が景気対策でまず建物をたてると言うのでは問題です。運営も独立行政法人で行うと言うことのようにですが独法化後も中期目標（3～5 年）をきめて評価すると言うことですし、長期の 10 年～50 年と言う計画はむずかしいでしょう。理事長、所長が委員に加わると言うことですので、おかしなことにはならないとは思いますが、今のままでは問題と思います。文化の破壊にならない事を祈ります。いずれにせよ発酵研究所の一層のご発展を心より御祈り致します。 敬具】

## 2) 文部省及び通産省による共同所管

IFO の活動は監督官庁の文部省の範囲を超え、科学技術庁、通産省、厚生省などの管轄範囲に拡大してきた。監督官庁を文部省と通産省の共同管轄とする案を検討し、平成 12 年 12 月の臨時理事会・評議員会の了承を得て、所管官庁に提出した書類の審査の結果、両官庁から承認を得た。この際、IFO の「寄付行為」の改定手続きや各省に提出する書類作成に、吉田正憲が尽力した。

文部省と通産省による共同所管に関し、IFO の理事の方々の考えがメモの中に適切に表現されていたので、その要旨を記載しておきたい。

### 【(財団法人)発酵研究所のありかたについて】

Culture Collection 事業は「有用な生物資源とくにその基準となる生物株を収集、保存、分譲することによって公共的な学術、産業に資する事業」であると理解いたしますと営利を目的としない公共性の高い事業であります。とくに事業の対象となる生物株は多種多様で多種多様の学術、産業と行政官庁に密接な関係があり（文部省、科学技術庁、通産省、農林水産省、環境庁、厚生省、建設省などの官界と、学会では農、工、医、理の学会、また産業界では農業、工業、医薬業、食品業と密接な関係がある）、また国内のみならず国際的な存在と活動があり国際的な視点での運営維持も要求されます。

このように非営利事業の運営には公共的な資金援助や財政援助が不可欠でありとくに武田薬品が営利を離れて公共的で高邁な理念のもとに長年にわたり支持と援助をしてこられたことは世界に誇るべき大きな貢献でありました。そして官の認定する法人であっても官に属する法人機関ではなく民間法人として競争原理のもとに業務を行ってきた発酵研究所は国内外の産・官・学の user にも高い評価を得てきたのであります。

この面での先進国であるアメリカでは農林省や健康保

険省に属する Culture Collection 事業 (例えば NRRL ; 世界的に著名な評価がある農林省の北部地域研究所での Culture Collection)がある一方,民間の Culture Collection 事業として財団 ATCC(American Type Culture Collection) は運営財源として収集保存生物株を有料分譲するとともに国立 NIH (National Institute of Health) などからの支援援助を得て研究運営を長年維持続行しております. 特に生物株の分譲は民間事業の理念のもとでの運営と業務が世界的に user の高い評価を得ており,営利性がないためにしばしば直面する経済的経営困難を乗り越えて長年存続しております.

従って世界の現況を踏まえると,我が国においても文部省,通産省,農林省,科学技術庁など官に属する研究所での Culture Collection の運営のほかに,発酵研究所のように官の一省庁に属することなく民間法人として事業を行う研究所の運営と活動の存在が望ましいと考えられます. また多岐にわたる産官学との密接な関係にも拘わらずこれまで文部省のみの認可団体として運営されてきました発酵研究所はこの転機にあたり通産省などの他の省庁の認可団体としても認可,支持,援助のもとに運営され活動することがわが国にとっても世界的にも貢献が大きいと考えられます. (平成12年秋)

### 発酵研究所の組織 (1999年12月)

年間,2回の役員会が開かれ,年度末3月には前年4月から12月までの活動の実績と次年度の計画について,また6月の役員会では前年度一年間の活動が報告される.同時に,経営内容が審議・修正の上,承認を得ている.役員会の構成は以下の通りである.発酵研究所には5研究部門と管理部門から構成されている.

表7 発酵研究所の組織 (1999年12月)

理事長:	森田 桂			
常務理事:	竹内 昌男			
理事:	別府 輝彦	藤野 政彦	早石 修	飯島 貞二
	岡田 善雄	岡見 吉郎	杉野 幸夫	山田 秀明
監事:	磯野 正雄	大嶋 泰治		
評議員:	古川 謙介	本郷 次雄	木村 光	駒形 和男
	松原 謙一	目黒 寛治	中瀬 崇	大村栄之助
	武田 六郎	竹中 浩治	田村 學造	富田 房男
	豊島久真男	椿 啓介		
研究所				
所長:	竹内 昌男			
管理部門:	吉田 正憲	佐藤 邦子	塩山 絹子	山下 幸恵
情報管理:	末永 格			
研究部門				
糸状菌:	伊藤 忠義	中桐 昭	岡根 泉	
酵母:	見方洪三郎	西村久美子	杉本 美香	
細菌:	武内真理子	中川 恭好	内野 圭仁	山口やよい
放線菌:	波多野和徳	西井 忠止	田村 朋彦	
動物細胞:	吉田 東歩	佐藤 元信	辻 憲吾	

### エピローグ

当研究所は1944年に設立され,微生物等の生物資源の保存事業を継続してきた.当事業の業績については,いままでの長谷川武治氏,飯島貞二氏らの報告<sup>2,4)</sup>に十分記載されている.退職してから約20年ともなり,私が所長として在籍していた期間(1995年から6年間)の一部の記録も飯島貞二氏らの報告には記載されていることから,部分的な重複があることを了解していただきたい.ここでは,歴史的な報告と言うより,発酵研究所を継いだ人たちについての感想文であることをご理解いただきたい.発酵研究所に直接に携わらなかった研究者や,特に生物資源保存機関に関わっていない研究者の方々にも一読していただければ幸いである.米国のATCCを除いて,IFOのような民間の機関でここまで発展できる生物資源保存機関は今後現れないかも知れない<sup>20)</sup>.タイムカプセルが次回に開封される2100年の時代の生物資源保存事業を取り巻く社会的状況を見たいものである.

在職中は研究所の事業への協力や研究指導など研究所の運営について多くの先生方々に指導していただいた.財団の理事・評議員・監事の方々には多大な指導をいただいた.お礼を申し上げても言い尽くせないほどである.発酵研究所を離れて20年近くなると,今は他界されてしまわれた先生方,森田 桂,藤野政彦,飯島貞二,岡田善雄,福井三郎,早石 修,磯野正雄,大村栄之助,田村學造,椿 啓介,本郷次雄,長谷川武治,三輪谷俊夫,原田篤也,磯野正雄 諸氏には特にこの場を借りてお礼を申し上げることをお許しいただきたい.木崎良平監事には幾度となく研究所運営の倫理的・歴史的史観についてご教授頂いた.また,小生の在職中,やむをえず他の研究機関に移動しなければならなかった研究者,今井紘,坂根 健,長谷川建夫,黒嶋健一,中垣内弓子,久野晴彦などの所員の方々については,発酵研究所での経験と実績を基にそれぞれの新しい職場でご活躍されていることを時折耳にしたが,彼らの他機関への移動の経緯について忘れたことがない.IFOBRDBの仕上げにはさらに1年を要したが,この難解な作業を発酵研究所のメンバーに託することになった.坂野 勲氏には研究所に入所した時から退職するまでの期間,多くの課題について教示して戴いた.特に,Culture Collectionの原理・原則についてのご指導には感謝にたえない.どうにか退職するまで健康を維持できたのも坂野勲氏はじめ,理事・評議員による指導や,IFO所員およびその関係者のお陰であると感謝している.

### 参考資料,文献および注釈

- 1) 生命科学研究用の試料として微生物,動物・植物細胞,DNA,その他,生物に関わる試料を含めて生物研究資源

- (略して、生物資源)と呼ばれている。本稿では、実験室で培養(複製)可能な試料を生物資源、また微生物や動物細胞に限って、個々の試料を指すときには、微生物株、動物細胞株などと記した。
- 2) 長谷川武治, 「微生物保存事業と IFO」 IFO Research Communications, 17, 9-18. (1995)
  - 3) 長谷川武治, A History of Microbial Culture Collections in Japan 「日本の微生物保存事業」 IFO Research Communications, 19: 83-115. (1999)
  - 4) 飯島貞二, A history of Institute for Fermentation, Osaka, IFO Research Communications, 20: 15-33. (2001)
  - 5) 長谷川 徹, 発酵研究所の歴史, IFO Research Communications, 28: 1-10. (2014)
  - 6) 衡平な: 情報の公開性, 利用料の均一性, など当該機関のサービスが経済的サポートしているかどうかにより差別をしないことを意味する。当該機関が提供するサービスに関し, 資金提供者(国や企業)の研究者と提供していない研究者との間に差別しないことを意味する。
  - 7) Masao Takeuchi, Report of the Director, IFO Research Communications, 18, 1-6. (1997)
  - 8) Masao Takeuchi, Report of the Director, IFO Research Communications, 19, 1-5. (1999)
  - 9) Masao Takeuchi, Report of the Director, IFO Research Communications, 20, 1-14. (2001)
  - 10) 飯島貞二, 発酵研究所における情報管理 Research Communications, 17, 44-53. (1995)
  - 11) 1998年度 JSCC 機関会員事業報告. 日本微生物資源学会誌. 15, 32. (1999)
  - 12) 坂根 健, 坂野 勲, L-乾燥票品の長期保存. 凍結及び乾燥研究会誌. 26, 96-100. (1980)
  - 13) 山田 修, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のアフラトキシン生合成系遺伝子は機能しない-アフラトキシン生合成遺伝子ホモログクラスタの解析-, 化学と生物. 50: 560. (2012)
  - 14) M. Takeuchi et. al, (1993) Survey of Mycoplasma contamination in animal cell lines collected by three cell banks in Japan. Bull JFCC, 9, 13-18.
  - 15) 竹内昌男, 吉田東歩ら, 和光純薬時報, 60(3) 25; 60(4) 25 (1992); 61(1) 25; 61(3) 25. (1994)
  - 16) H. Kuno et al. (1999) A simple and rapid reverse transcriptase assay for the detection of retroviruses in cell cultures. Cytotechnology 29, 221-227.
  - 17) IFO に保存した動物細胞株(5001から50525)までのうち, 特許寄託株を除く193株が(財)ヒューマンサイエンス振興財団に移設され, 2001年4月から分譲が開始された。2014年, 国立研究開発法人・医薬基盤研究所に組織変更され, IFO 番号を付けたままで研究者に分譲されている。
  - 18) タイム・カプセル EXPO '70 開封委員会(2001.11), Record of First time capsule opening, Message to the people of 2100. Time Capsule EXPO '70 「記録書」(1970)。
  - 19) Bio-Resource 「生物系研究資材のデータベース化及びネットワークシステム構築のための基盤的研究開発」科学技術振興事業団。(平成10年度~平成13年度)
  - 20) 小生が IFO を退職した数年後, 国のある当時の BRC 担当課長に学会でお会いしたことがある。その際, IFO のような研究者・技術者が育っていないことを聞いた。皆が理解している一事象「人材を育てるには, 長い時間が必要である」, と感じた。

## 第 10 回助成研究報告会の開催

平成 28 年 6 月 10 日千里ライフサイエンスセンター 5 階ホールにおいて第 10 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 31 件および 1 年間の助成を受けた若手研究者助成 1 件の研究成果のポスター発表が行われた。参加者は大学、国公立研究所、企業の研究者、大学院生など総数 235 名であった（このうち大学院生は 40 名）。

報告会に先立ち波多野和徳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「熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築」（早川正幸）の 1 題は徳増征二 元筑波大学教授の座長のもとに、「発酵菌による細胞リプログラミング機構の解明」（太田訓正）の 1 題は阪井康能 京都大学大学院農学研究科教授の座長のもとに、「胆汁酸を責任分子と想定した西欧食による腸内細菌叢崩壊機構の解明」（横田 篤）および「難培養性アナモックス細菌の生理・生態学の全容解明に向けてのポストゲノム解析」（岡部 聡）の 2 題は熊谷英彦 石川県立大学学長の座長のもとに、口頭発表が行われた。また、寄付講座助成の 1 題「極限環境微生物のゲノムに認められる機能未知遺伝子の機能解析とその応用」（河原林 裕）は波多野和徳 発酵研究所理事長の座長のもとに口頭発表が行われた。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 3 報に分けて報告されている。

引き続き一般研究助成 31 件および若手研究者助成 1 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成果は本報告集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。まずは永井和夫理事（東京工業大学名誉教授）の挨拶があり、次いで北本勝ひこ評議員（東京大学名誉教授）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東北大学の寄付講座の永田裕二教授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。特に、今回の報告会および懇親会には若手の研究者が多数参加され、新旧の研究者の交流の場としても十分役だったものと思われる。参加された皆様のご協力に心から感謝致します。

来年の第 11 回助成研究報告会は平成 29 年 6 月 9 日（金）に同じ会場で開催致する。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 徳増 征二 先生



座長 阪井 康能 先生



座長 熊谷 英彦 先生



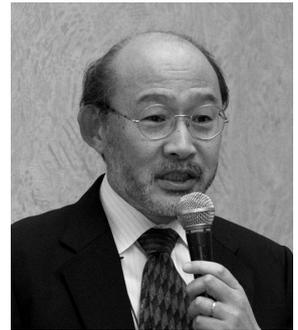
座長 波多野和徳 理事長



早川 正幸 氏



太田 訓正 氏



横田 篤 氏



岡部 聡 氏



河原林 裕 氏

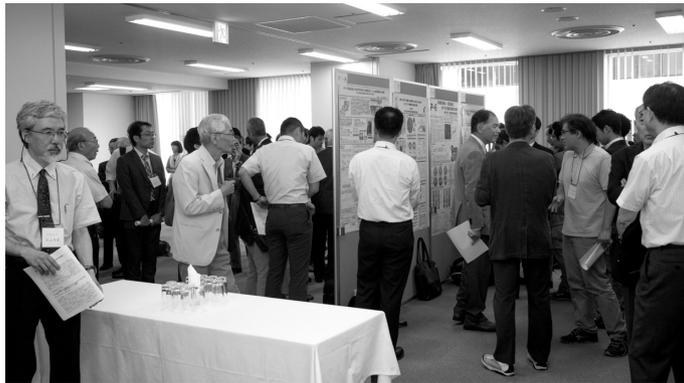


司会  
中濱 一雄 常務理事



講演会

RESEARCH COMMUNICATIONS



ポスター発表



挨拶 永井 和夫 理事



乾杯 北本勝ひこ 評議員



懇親会



# 平成26年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成26年4月～平成28年3月



## 熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築

早川正幸

山梨大学生命環境学部  
〒400-8511 甲府市武田4-3-11

### Construction of the Foundation of Screening Strategies for Extremely Rare Microorganisms from Tropical Areas

Masayuki Hayakawa

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi  
Takeda-4, Kofu 400-8511, Japan

This study assessed the effectiveness of isolation and screening strategies for rare microbial resources, such as actinomycetes and lactic acid bacteria, from tropical regions. Application of the rehydration and centrifugation method developed by Hayakawa *et al.* (2000) resulted in the selective isolation of 632 rare actinomycetes from 113 soil samples from Myanmar. 16S rDNA sequence analysis revealed that the actinomycete isolates were particularly diverse, consisting of 17 families, 48 genera and 128 species. The most frequently isolated genus was *Actinoplanes*, followed by *Krasilnikovia*. Of the 632 isolates, 210 strains (33%) were new species candidates with 16S rDNA similarities of less than 98.7% compared to the most homologous prototype species. Forty-six strains (84%) of the 55 new-species candidates exhibited antimicrobial activity or had genes that encoded nonribosomal peptide synthetases or type I polyketide synthases. The findings showed that rare actinomycetes from tropical regions have potential for producing useful and novel metabolites. A total of 253 lactic acid bacteria were isolated from 55 traditional fermented foods using a newly developed method involving co-culture with yeast strains and a conventional dilution plating technique. These isolates belonged to four families, eight genera and 30 species. *Lactobacillus* was the most frequently isolated genus, followed by *Weissella*. Several species, including *L. futsaii* and *L. plajomi*, reportedly isolated from other tropical regions, were also isolated among the Myanmar isolates examined in this study. Most of the 253 lactic acid bacteria isolates exhibited the capacity to actively ferment mono- or di-saccharides.

Key words: actinomycetes, lactic acid bacteria, taxonomic diversity, ecology

### 緒言

近年、世界各地の熱帯域で土壌、植物、伝統的発酵食品などにおける有用微生物の探索が行なわれているが (Azevedo *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2009; Lan *et al.*; 2013), 分離技術が未開拓な菌群も多く、その分布は未だに不明な点が多い。また微生物を含む遺伝資源に対しては、生物多様性条約の発効により原産国の主権的権利が認められ、利用者は原産国政府から事前の合意を取ることが必

要となっている。このような中、我が国では製品評価技術基盤機構 (NITE) が東南アジアを中心とした各国とのアクセススキームを構築し、生物多様性条約に則った微生物菌株の移転が可能になっている。東南アジアは、熱帯特有の気候や植生、食文化を有し、今般、東南アジア産の新種微生物が次々と発表されている (Hamada *et al.*, 2015; Nurkanto *et al.*, 2016)。このことは同地域が医薬品や酵素の生産菌、発酵食品といった微生物遺伝子資源保有地域として潜在的な価値が非常に高いと考えられる。その中でミャンマー連邦はごく最近になってから微生物探索が可能になった国である。そこで、本研究では NITE が構築したミャンマー連邦との共同研究プロジェクトに参画することで、同国における微生物の分離探索基盤を構築することとした。具体的には、医薬品の生産

E-mail: mhayakawa@yamanashi.ac.jp

共同研究者：柳田藤寿 (山梨大学ワイン科学研究センター)、  
岸本宗和 (山梨大学ワイン科学研究センター)、  
乙黒美彩 (山梨大学ワイン科学研究センター)、  
山村英樹 (山梨大学生命環境学部)

菌として重要な放線菌や発酵食品に利用可能な乳酸菌を取り上げ、希少種や固有種の分離方法の構築と多様性、さらに有用性を明らかにすることを目的とした。

放線菌は Waksman らによるストレプトマイシンの発見を契機に、世界中の研究者によって広く環境中から分離が行われ、抗菌薬や抗寄生虫薬、抗癌剤、免疫抑制剤など多様な生理活性物質が発見・実用化されている。放線菌の中でも *Streptomyces* 属からは極めて多くの生理活性物質が報告されており、例えば *Streptomyces avermectilis* の生産物より開発されたイベルメクチンはアフリカ諸国のオンコセルカ症の特効薬として、さらにフィラリア症や疥癬（かいせん）にまで効果を示し、広く人類の生活と健康に恩恵をもたらしている (Omura, 2008)。放線菌の分離に関しては、希釈平板法や SDS-YE 法 (Hayakawa & Nonomura, 1989) によって土壤中の優占種である *Streptomyces* 属を分離することができるが、分布密度の低い希少放線菌は何らかの選択分離方法を用いなければ取得する事が出来ない。例えば Hayakawa *et al.* (2000) によって考案された再水和-遠心沈殿法は、運動性をもつ希少放線菌を効率的に分離することが可能である。本研究では日本では分離が困難であるが、熱帯特有の環境から分離できる放線菌を超希少放線菌として捉え、再水和-遠心沈殿法及びその改良法を適用し、分離された希少放線菌の多様性や有用性を評価した。

一方、日本をはじめとするアジア諸国は、独自に発達した伝統的な発酵文化を有しており、様々な発酵食品に共存、共生している微生物群には非常に興味を引かれる。ミャンマーには、エビやカニ、魚などの甲殻類や魚類、豆や野菜などの植物を使用した発酵食品が多く、例えばモヒンガ（発酵麺）、ンガピ（小エビを発酵させたペースト状の調味料）、バゾンチン（エビの馴れ鮓）、発酵茶などが知られている。これらは多民族国家であるミャンマーにおいては部族や民族ごとに受け継がれており、多様性に富んでいる。本研究では、ミャンマーの発酵食品から日本では入手困難な希少種を含む多様な乳酸菌を取得し、有用性を評価することを目的とした。発酵食品から乳酸菌を分離する際には、一般的に試料の一部を液体培地中で前培養したのち希釈平板法が適用されるが、優勢種が集積されて分離されることが多い。そこで分離にあたっては、前培養の際に特定の酵母を添加して乳酸菌の希少種を増菌させ平板分離する新たな手法の開発を目指した。

## 実験方法

### 分離源

放線菌の分離源としてミャンマー南東部のタニンダー

リ地方域のダウェイ、ベイ、コータウンから土壌29点を収集した（2014年11月）。この地域はケツペンの気候区分によると熱帯モンスーン気候に属しており、例えばミャンマー最南端のコータウンの月別最高気温の年平均は 32.3℃、月別最低気温の年平均は 23.7℃となっている (<http://www.worldweatheronline.com/>)。また、同時に分類試験に供試した NITE 保有ミャンマー株は、ミャンマー中北部に位地するマンダレー地方域及びチン州から採取された土壌試料84点を分離源としたものである。一方、我が国の本州、利尻島、西表島より採取した土壌試料105点を対照の温帯域土壌として供試した。土壌試料は孔径 2 mm の篩を通し、室温で風乾したのち放線菌の分離に供試した。

乳酸菌の分離源としてミャンマー中南部に位地するエーヤワディ地方域のパテイン地区より29点の発酵食品を入手して供試した（2014年11月）。また分類試験に同時に供試した NITE 保有乳酸菌は、ミャンマー中北部のチン州タウンジー地区より入手した26点の発酵食品を分離源とするものである。これらのサンプルの種類は、野菜の漬物21点、エビや魚の馴れ鮓11点、発酵ペースト9点、発酵米麺4点、発酵茶2点、納豆1点、エビの佃煮、米発酵酒、納豆せんべい、甘酒、蜂蜜、豆板醬を各1点ずつである。

### 分離

放線菌の分離培地は Humic acid-vitamin agar (HV agar; Hayakawa & Nonomura, 1987) を基本培地とし、これに抗カビ剤としてシクロヘキシミド 50 mg/l、カビサイジン 5 mg/l、抗細菌剤としてナリジキシム酸 20 mg/l を添加したものをを用いた。分離方法としては再水和-遠心沈殿法 (Hayakawa *et al.*, 2000) を用い遊走温度を通常の 30℃と 38℃に変更した2段階で行った。分離平板は室温（約 25℃）で2週間培養し、Yeast extract-Starch 培地にて純化を行い、コロニー形態や色などから放線菌 282株を選抜し、日本に持ち帰った。同定試験、有用性試験には、同じ再水和-遠心沈殿法により2004年にミャンマーから分離された NITE 保有の放線菌351株を加えた総計633株を供試した。また、対照として、再水和-遠心沈殿法により我が国の土壌から分離した放線菌530株を供試した。

乳酸菌の分離には MRS 寒天培地 (Difco 社製) を基本培地として、これに抗カビ剤としてシクロヘキシミド 50 mg/l と炭酸カルシウム 0.1 g/l を添加したものをを用いた。培養は 30℃にてアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学社製）を用いて嫌気培養を行った。各サンプル 1 g を 0.75% 生理食塩水に懸濁しサンプル希釈液を作製した。希釈平板法はサンプル希釈液を段階希釈後、各溶液

100  $\mu$ l を分離培地に塗布した。分離平板は48時間嫌気培養後にコロニーの生育を確認した。共培養法は、酵母3属3種 (*Saccharomyces cerevisiae* RIFY 1001, *Klyveromyces marxianus* RIFY 4040, *Pichia fermentans* RIFY 4078) を30℃で2日間培養したものを本培養とし、各酵母培養液50  $\mu$ l とサンプル希釈液50  $\mu$ l を、MRS液体培地2ml を分注した12ウェルプレート (Thermo Scientific 社製) に接種し、30℃で48時間嫌気培養を行った。希釈平板法と同様に培養液100  $\mu$ l を分離培地に塗布した後、再び30℃で48時間嫌気培養し、コロニーの生育を確認した。各分離法により生育したコロニーを色、形状の違いから選択し、総計148株を単離、純化した。日本へは炭酸カルシウムを含んだMRS高層寒天培地に穿刺培養したものを持ち帰った。同定試験、有用性試験には、2004年に希釈法によりミャンマーの発酵食品から分離されたNITE保有乳酸菌105株を加えた253株を供試した。

#### 同定試験

放線菌および乳酸菌分離株ゲノムDNAの抽出はPrepMan<sup>®</sup> ultra reagent (Applied Biosystems, CA, USA) を用いる定法により行った。これを鋳型DNAとしてPCRにてほぼ全長の16S rDNAを増幅させ、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。各菌株の塩基配列はATGC (ゼネティックス) でアッセンブルを行い、1,200 bp以上の塩基配列についてはEzTaxon (Kim *et al.*, 2012) にて同定性検索を行った。

放線菌については、Drancourt *et al.* (2000) および Stackebrandt & Ebers (2006) の研究結果に準じ、分離株の16S rDNA塩基配列の同定性が97%および98.7%以上の場合、便宜的に既知の属および種へ配属した。また、同定性が97%以下の放線菌株や希少性の高い菌株については電子顕微鏡による形態観察、さらに分子系統解析によっても同定の評価を行った。即ち、分離株の基生菌糸、気菌糸、胞子連鎖の形成の有無と形態等を確認するとともに、CLUSTAL\_X program (Thompson *et al.*, 1997) により分離株とデータベース中の16S rDNA塩基配列のアラインメントを行い、NJ法 (Saitou & Nei, 1987) によって分子系統樹を構築して解析した。

乳酸菌については同定性が99%以上を既知種へ配属した。それらについてさらに、位相差顕微鏡 (CX-41, オリンパス社製) を用いて形態観察を行った。また、代表株については走査型電子顕微鏡による観察も行った。

#### 多様性の解析

同定された放線菌の種の多様性は多様性指数 (Shannon 指数; Shannon & Weaver, 1949) を算出することによって定量的に評価、比較した。Shannon の多様性指数

$H'$  は群集に含まれる種の豊富さ (数) と均等度 (各種間の個体数の等しさ) を考慮に入れたもので、次の式により表される。 $H' = -\sum Pi \ln Pi$ : ここで  $Pi$  は  $i$  番目の種の個体数が群集の全個体数に占める割合。Shannon 指数の評価は Wilcoxon 符号付順位検定により行った (Flanagan *et al.*, 2007)。

#### 分離株の有用性調査

放線菌の医薬品探索源としての評価を行うため、抗菌活性試験を行った。即ち、ミャンマーで分離された *Actinoplanes* 属のうち、新種推定株55株 (既知種との16S rDNA塩基配列の同定性98.7%未満) について、真菌4株 (*Aspergillus niger* NBRC 9642, *Colletotrichum orbiculare* NBRC 33130, *Candida albicans* NBRC 1385, *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10217), グラム陽性菌3株 (*Bacillus subtilis* NBRC 13719, *Clavibacter michiganensis* NBRC 13762, *Staphylococcus aureus* NBRC 14462), グラム陰性菌2株 (*Escherichia coli* NBRC 13762, *Pseudomonas fluorescens* NBRC 14160) に対する抗菌活性を寒天重層法 (Goodfellow *et al.*, 1990) にて行った。さらに、遺伝子レベルで各菌株が生理活性物質を生産する可能性についてI型ポリケタイド合成酵素 (PKS-I: Type-I polyketide synthases) 遺伝子および非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS: nonribosomal peptide synthetases) 遺伝子をPCRにて増幅し、検出することで評価を行った。PKS-I, NRPS各遺伝子の増幅、検出の手法は Gonzalez *et al.* (2005) に従った。

乳酸菌を発酵分野へ応用するため、糖類発酵性試験を行った。即ち、糖類発酵性試験では単糖類、二糖類、糖アルコールなど17種類の糖源について発酵性を調査した。なお、供試菌株は共培養法などを用いて分離した菌株とNBRCから分譲を受けたミャンマー発酵食品由来の乳酸菌、計253株を用いた。MRS液体培地で前培養を行った供試菌株を滅菌生理食塩水で10倍に希釈し、希釈液20  $\mu$ l を各糖源を添加したGYP培地 (Hagi *et al.*, 2004) に接種した。30℃, 3日間培養後、pH測定と生育度の肉眼観察を行った。

## 結 果

#### 【放線菌】

##### 同定結果

分離株毎の16S rDNA塩基配列の同定性検索の結果から  $\geq 97\%$  および  $\geq 98.7\%$  の同定性をそれぞれ属および種の同定基準として同定を行った (Table 1, Table 2)。その結果、ミャンマー分離株633株は18科、47属、128種、日本分離株は19科、46属、1557と、それぞれ多様な分

**Table 1** Taxonomic diversity of actinomycetes isolated from Myanmar soils (118 samples) and Japanese soils (120 samples) using the rehydration and centrifugation method<sup>a)</sup>

Area	No. of isolates	No. of			Species diversity index <sup>b)</sup>
		Families	Genera	Species	
Myanmar	633	18	47	128	3.7
Japan	530	19	46	155	3.8

a) Isolates were identified using a phylogenetic analysis based on comparison of nearly complete 16S rDNA sequences (>1,200 bp).

b) Shannon & Weaver (1949).

**Table 2** Species composition of actinomycetes found in Myanmar and Japan.

Suborder	Family	Genus & Species*	No. of strains			
			Myanmar	Japan		
<i>Catenulisporineae</i>	<i>Catenulisporaceae</i>	<i>Catenulispora</i>				
		<i>subtropica</i>	1	0		
		<i>yoronensis</i>	1	0		
		unidentified	0	1		
		(Subtotal)	(2)	(1)		
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>				
		<i>acidivorans</i>	0	1		
		<i>amamiensis</i>	0	1		
		<i>aobensis</i>	2	2		
		<i>araoensis</i>	0	1		
		<i>arthritidis</i>	0	1		
		<i>brasiliensis</i>	1	1		
		<i>cyriacigeorgica</i>	0	2		
		<i>elegans</i>	2	2		
		<i>jiangxiensis</i>	0	1		
		<i>mikamii</i>	1	0		
		<i>niigatensis</i>	4	4		
		<i>nova</i>	0	7		
		<i>pneumoniae</i>	0	1		
		<i>spelunca</i>	1	1		
		<i>takedensis</i>	1	0		
		<i>testacea</i>	0	1		
		<i>vaccinii</i>	7	0		
		<i>vinacea</i>	0	1		
		unidentified	13	5		
			(Subtotal)	(32)	(32)	
				<i>Rhodococcus</i>		
				<i>canchipurensis</i>	0	1
		<i>erythropolis</i>	0	2		
		<i>maanshanensis</i>	0	2		
		<i>wratislaviensis</i>	0	1		
		unidentified	1	0		
		(Subtotal)	(1)	(6)		
		<i>Mycobacteriaceae</i>				
		<i>Mycobacterium</i>				
		unidentified	1	0		
		(Subtotal)	(1)	(0)		
<i>Frankineae</i>	<i>Cryptosporangiaceae</i>	<i>Cryptosporangium</i>				
		<i>arvum</i>	1	2		
		<i>aurantiacum</i>	3	0		
		<i>minutisporangium</i>	8	9		
		<i>mongoliense</i>	0	1		
		unidentified	1	1		
			(Subtotal)	(13)	(13)	
			unidentified genus	1	0	
			(Subtotal)	(1)	(0)	
			unidentified family	1	0	
	(Subtotal)	(1)	(0)			
	<i>Geodermatophilaceae</i>					
	<i>Geodermatophilus</i>					
	unidentified	1	0			
	(Subtotal)	(1)	(0)			
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i>				
		<i>lechevalierae</i>	0	1		
		(Subtotal)	(0)	(1)		
<i>Kineosporineae</i>	<i>Kineosporiaceae</i>	<i>Kineosporia</i>				
		<i>mesophila</i>	2	7		
		<i>mikuniensis</i>	1	0		
		<i>rhamnosa</i>	0	2		
		<i>succinea</i>	2	1		
		unidentified	2	2		
			(Subtotal)	(7)	(12)	
			unidentified genus	4	0	
	(Subtotal)	(4)	(0)			
<i>Micrococcineae</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i>				
		<i>flavigena</i>	0	2		
		unidentified	0	2		

Continued on the next page.

熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
		(Subtotal)	(0)	(4)
	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1	1
		(Subtotal)	(1)	(1)
	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Lapillicoccus jejuensis</i>	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Intrasporangium oryzae</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
		<i>Phycococcus ochangensis</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium arborescens</i>	1	0
		<i>flavescens</i>	0	1
		<i>jejuense</i>	0	1
		<i>oleivorans</i>	0	3
		<i>oxydans</i>	0	1
		<i>testaceum</i>	0	1
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(2)	(7)
		<i>Diaminobutyricibacter tongyongensis</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0	1
		<i>ureafaciens</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(2)
		<i>Micrococcus yunnanensis</i>	5	0
		<i>aloeverae</i>	1	0
		(Subtotal)	(6)	(0)
	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Isoptericola</i>		
		unidentified	2	0
		(Subtotal)	(2)	(0)
		<i>Luteimicrobium subarcticum</i>	0	1
		<i>album</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(2)
		<i>Myceligenans xiligouense</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinocatenisporia rupis</i>	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Actinoplanes abujensis</i>	3	4
		<i>brasiliensis</i>	5	18
		<i>campanulatus</i>	9	4
		<i>capillaceus</i>	4	2
		<i>couchii</i>	0	3
		<i>cyaneus</i>	0	8
		<i>digitatis</i>	16	20
		<i>durhamensis</i>	0	3
		<i>ferrugineus</i>	4	2
		<i>globisporus</i>	0	3
		<i>humidus</i>	0	1
		<i>lobatus</i>	1	3
		<i>nipponensis</i>	0	1
		<i>palleronii</i>	2	1
		<i>philippinensis</i>	8	3
		<i>rectilineatus</i>	4	3

Continued on the next page.

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
		<i>regularis</i>	4	11
		<i>rishiriensis</i>	0	2
		<i>sichuanensis</i>	1	0
		<i>tereljensis</i>	0	1
		<i>toeensis</i>	0	2
		<i>utahensis</i>	1	0
		<i>xinjiangensis</i>	0	3
		unidentified	124	78
		(Subtotal)	(186)	(176)
		<i>Asanoa</i>		
		<i>ishikariensis</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
		<i>Catelliglobospora</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Catenuloplanes</i>		
		<i>japonicus</i>	0	3
		<i>nepalensis</i>	1	0
		<i>niger</i>	0	3
		(Subtotal)	(1)	(6)
		<i>Couchioplanes</i>		
		<i>caeruleus</i>	31	13
		unidentified	2	1
		(Subtotal)	(33)	(14)
		<i>Dactylosporangium</i>		
		<i>aurantiacum</i>	1	15
		<i>fulvum</i>	0	3
		<i>luteum</i>	1	3
		<i>maewongense</i>	1	7
		<i>matsuzakiense</i>	2	5
		<i>roseum</i>	1	1
		<i>salmoneum</i>	2	2
		<i>siamense</i>	1	0
		<i>tropicum</i>	2	0
		<i>vinaceum</i>	4	0
		unidentified	2	1
		(Subtotal)	(17)	(37)
		<i>Hamadaea</i>		
		<i>tsunoensis</i>	2	0
		(Subtotal)	(2)	(0)
		<i>Krasilnikovia</i>		
		<i>cinnamonea</i>	123	30
		unidentified	1	2
		(Subtotal)	(124)	(32)
		<i>Luedemannella</i>		
		<i>helvata</i>	1	2
		<i>flava</i>	16	2
		unidentified	8	3
		(Subtotal)	(25)	(7)
		<i>Micromonospora</i>		
		<i>aurantiaca</i>	0	1
		<i>auratinigra</i>	1	0
		<i>carbonacea</i>	0	2
		<i>chaiyaphumensis</i>	1	1
		<i>chalcea</i>	2	1
		<i>chersina</i>	2	0
		<i>chokoriensis</i>	2	0
		<i>coxensis</i>	1	1
		<i>echinospora</i>	9	1
		<i>endophytica</i>	1	0
		<i>equina</i>	1	0
		<i>harpali</i>	1	0
		<i>humi</i>	1	0
		<i>krabiensis</i>	0	1
		<i>marina</i>	1	0
		<i>matsumotoense</i>	0	1
		<i>narathiwatensis</i>	1	1

Continued on the next page.

熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
		<i>tulbaghia</i>	3	0
		<i>wenchangensis</i>	7	0
		unidentified	5	7
		(Subtotal)	(39)	(17)
		<i>Planosporangium</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Phytohabitans</i>		
		unidentified	2	0
		(Subtotal)	(2)	(0)
		<i>Pseudosporangium</i>		
		<i>ferrugineum</i>	14	8
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(15)	(8)
		<i>Verrucosipora</i>		
		unidentified	1	2
		(Subtotal)	(1)	(2)
		<i>Virgisporangium</i>		
		<i>aliadipatigenens</i>	0	4
		<i>aurantiacum</i>	1	0
		<i>ochraceum</i>	2	1
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(4)	(5)
		unidentified genus	4	0
		(Subtotal)	(4)	(0)
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Nocardioideaceae</i>	<i>Aeromicrobium</i>		
		<i>tamlense</i>	0	2
		(Subtotal)	(0)	(2)
		<i>Kribbella</i>		
		<i>albertanoniae</i>	1	0
		<i>aluminosa</i>	0	1
		<i>flavida</i>	2	0
		<i>koreensis</i>	0	3
		<i>sancticallisti</i>	0	2
		<i>sandramycini</i>	1	4
		<i>swartbergensis</i>	1	2
		unidentified	0	1
		(Subtotal)	(5)	(13)
		<i>Mumia</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Marmoricola</i>		
		<i>korecus</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
		<i>Nocardioides</i>		
		<i>albus</i>	0	1
		<i>ganghwensis</i>	0	1
		<i>luteus</i>	2	1
		unidentified	0	5
		(Subtotal)	(2)	(8)
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinokineospora</i>		
		<i>baliensis</i>	2	0
		<i>enzanensis</i>	0	1
		<i>solis</i>	0	1
		(Subtotal)	(2)	(2)
		<i>Actinomycetospora</i>		
		<i>iriomotensis</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(1)
		<i>Actinophytocola</i>		
		<i>oryzae</i>	1	0
		unidentified	3	0
		(Subtotal)	(4)	(0)

Continued on the next page.

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
			<i>Continued.</i>	
		<i>Amycolatopsis</i>		
		<i>australiensis</i>	1	0
		<i>pretoriensis</i>	0	2
		<i>tolypomycina</i>	1	0
		unidentified	1	1
		(Subtotal)	(3)	(3)
		<i>Kibdelosporangium</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Kutzneria</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Lechevalieria</i>		
		<i>aerocolonigenes</i>	2	0
		<i>atacamensis</i>	1	0
		unidentified	5	1
		(Subtotal)	(8)	(1)
		<i>Lentzea</i>		
		<i>albida</i>	0	1
		<i>albidocapillata</i>	0	1
		<i>violacea</i>	0	1
		unidentified	0	1
		(Subtotal)	(0)	(4)
		<i>Pseudonocardia</i>		
		<i>antitumoralis</i>	1	0
		<i>halophobica</i>	0	2
		<i>khvsgulensis</i>	0	1
		<i>oroxyli</i>	0	1
		<i>zijingensis</i>	1	0
		unidentified	1	6
		(Subtotal)	(3)	(10)
		<i>Saccharopolyspora</i>		
		<i>spinosa</i>	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		unidentified genus	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Kitasatospora</i>		
		<i>cystarginea</i>	0	1
		<i>gansuensis</i>	0	2
		<i>mediocidica</i>	0	2
		<i>nipponensis</i>	0	1
		<i>paranensis</i>	0	1
		(Subtotal)	(0)	(7)
		<i>Streptacidiphilus</i>		
		<i>carbonis</i>	1	0
		<i>rugosus</i>	1	0
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(3)	(0)
		<i>Streptomyces</i>		
		<i>abietis</i>	0	5
		<i>albiaxialis</i>	0	1
		<i>anandii</i>	2	0
		<i>angustmycinicus</i>	1	1
		<i>atratus</i>	0	1
		<i>atroolivaceus</i>	0	1
		<i>aureus</i>	1	1
		<i>badius</i>	1	0
		<i>beijiangensis</i>	0	2
		<i>bungoensis</i>	0	1
		<i>caeruleatus</i>	1	0
		<i>carpaticus</i>	2	0
		<i>carpinensis</i>	1	0
		<i>cocklensis</i>	1	0
		<i>coeruleofuscus</i>	1	0
		<i>coeruleoprunus</i>	1	0
		<i>crystallinus</i>	1	0

*Continued on the next page.*

熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
		<i>drozdowniczi</i>	1	0
		<i>durhamensis</i>	0	1
		<i>ferraliis</i>	2	0
		<i>fildeensis</i>	0	1
		<i>flavotricini</i>	0	2
		<i>fradiae</i>	1	0
		<i>fumigatiscleroticus</i>	1	0
		<i>geysiriensis</i>	1	0
		<i>glauciniger</i>	0	2
		<i>glomeraurantiacus</i>	0	1
		<i>griseoplanus</i>	1	1
		<i>griseorubiginosus</i>	0	1
		<i>griseus</i>	0	1
		<i>hainanensis</i>	1	0
		<i>hygroscopicus</i>	0	1
		<i>hygroscopicus</i>	1	0
		<i>indigoferus</i>	0	2
		<i>kunningensis</i>	1	0
		<i>lydicus</i>	1	1
		<i>mauvecolor</i>	1	0
		<i>mirabilis</i>	0	2
		<i>noursei</i>	1	0
		<i>olivochromogenes</i>	0	4
		<i>paucisporeus</i>	0	1
		<i>phaeopurpureus</i>	1	0
		<i>pseudovenezuelae</i>	0	1
		<i>punicus</i>	1	0
		<i>rishiriensis</i>	0	6
		<i>rubidus</i>	2	0
		<i>sanglieri</i>	0	1
		<i>sannanensis</i>	1	0
		<i>sioyaensis</i>	1	1
		<i>sparsogenes</i>	0	1
		<i>spiralis</i>	1	0
		<i>spororaveus</i>	0	1
		<i>staurosporininus</i>	1	0
		<i>tauricus</i>	0	1
		<i>thioluteus</i>	1	0
		<i>turgidiscabies</i>	0	4
		<i>violascens</i>	2	0
		<i>vulcanius</i>	0	2
		<i>wuyuanensis</i>	0	1
		<i>xanthocidicus</i>	0	1
		<i>xantholiticus</i>	1	1
		<i>xiamenensis</i>	1	0
		unidentified	5	18
		(Subtotal)	(44)	(73)
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>		
		<i>dassonvillei</i>	1	0
		<i>flavescens</i>	0	1
		(Subtotal)	(1)	(1)
	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Microbispora</i>		
		<i>amethystogenes</i>	1	0
		<i>rosea</i>	0	2
		(Subtotal)	(1)	(2)
		<i>Nonomuraea</i>		
		<i>candida</i>	1	0
		<i>muscovyensis</i>	0	1
		<i>turkmeniaca</i>	1	1
		unidentified	0	1
		(Subtotal)	(2)	(3)
		<i>Planobispora</i>		
		unidentified	1	0
		(Subtotal)	(1)	(0)
		<i>Planomonospora</i>		
		<i>sphaerica</i>	2	0
		unidentified	4	0
		(Subtotal)	(6)	(0)

Continued on the next page.

Table 2 continued

Suborder	Family	Genus & Species	No. of strains	
			Myanmar	Japan
		<i>Sphaerisporangium melleum</i> (Subtotal)	0 (0)	1 (1)
		<i>Streptosporangium album</i>	0	2
		<i>amethystogenes</i>	0	1
		<i>vulgare</i> (Subtotal)	0 (0)	3 (6)
		unidentified genus (Subtotal)	1 (1)	0 (0)
	<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinoallomurus iriomotensis</i>	1	0
		unidentified (Subtotal)	0 (1)	0 (0)
		<i>Actinomadura bangladeshensis</i>	1	0
		<i>fibrosa</i>	2	0
		<i>maheshkhaliensis</i>	1	2
		<i>nitritigenes</i>	2	0
		unidentified (Subtotal)	4 (10)	0 (2)
		Total	633	530

\* 16S rDNA sequence similarity values of  $\geq 97.0\%$  and  $\geq 98.7\%$  were used as the criteria for identification at the genus and species levels, respectively.

類群へ配属された。種レベルの多様性(豊富さと均等度)を定量的に比べるため、Shannon 指数を求めると、ミャンマー 3.7, 日本 3.8 となり、Wilcoxon 符号付順位和検定では両国間の放線菌の多様性に有意な差は無かった。なお、既知属へ配属できない新属推定株(既知種との 16S rDNA 塩基配列の相同性 97.0% 未満)はミャンマー分離株中のみ 11 株 (1.7%) 認められた。また、新種推定株(既知種との 16S rDNA 塩基配列の相同性 98.7% 未満)はミャンマー分離株中 210 株 (33.2%), 日本分離株中 141 株 (26.4%) であり、その割合はミャンマーで有意 ( $p < 0.01$ ;  $\chi^2$  検定) に高かった。

#### 属種の比較

ミャンマーと日本で分離された放線菌の簡易同定の結果から分類名に基づいて属および種レベルの重複について両国間で比較を行ったところ (Fig. 1), 属レベルでは総計 68 属中 27 属 (39.7%), 種レベルでは総計 233 種中 52 種 (22.3%) しか重複しておらず、放線菌の種類分布は両地域で大きく異なっていることが示された。

両方の国で共通して検出された主要属の分離頻度(各地域の全分離株中に占める割合)についてみると (Table 2, Fig. 2), *Actinoplanes* 属が最も高く、ミャンマーでは 29.4% (186 株), 日本では 33.0% (176 株) であった。また、*Actinoplanes* 属の中で新種と推定される菌株はミャンマーでは 66.7%, 日本は 44.3% であり、ミャンマーの方が明らかに高かった (Table 2)。他の属で分離頻度の高かった

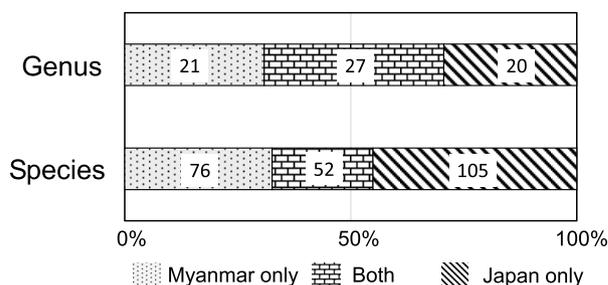


Fig. 1 Taxonomic overlaps of actinomycetes between Myanmar and Japan. The arabic numerals on the graph are the numbers of taxa.

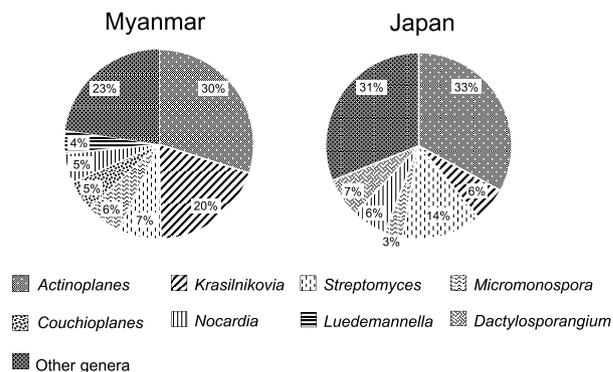
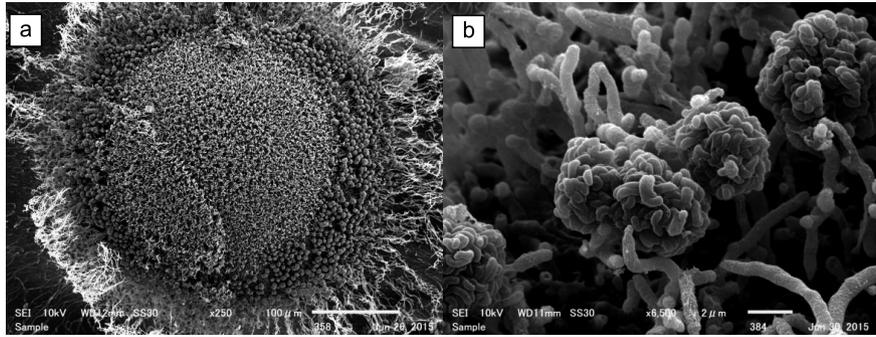


Fig. 2 Incidences of actinomycete genera in Myanmar and Japan. The percentages on the graphs are the frequencies of genera (above 3% are indicated).



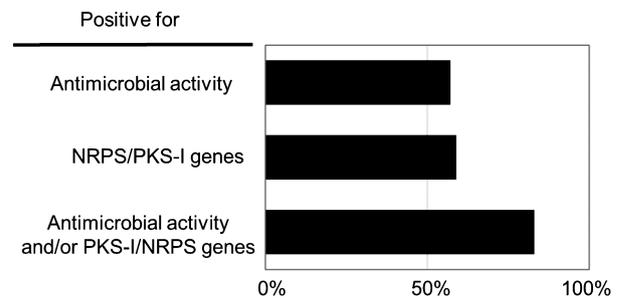
**Fig. 3** Scanning electron micrographs of *Krasilnikovia cinnamonea* MN14-A1084 isolated from Myanmar. a, a colony on HV agar. b, sporangium-like structures. White bars: a, 100  $\mu$ m; b, 2  $\mu$ m.

たのは *Krasilnikovia* 属, *Streptomyces* 属, *Micromonospora* 属, *Couchioplanes* 属, *Nocardia* 属, *Luedemannella* 属, *Dactylosporangium* 属などであった。これらの属の内, *Krasilnikovia* 属, *Micromonospora* 属, *Couchioplanes* 属, *Nocardia* 属, *Luedemannella* 属の分離頻度はミャンマーで高く, 逆に *Streptomyces* 属, と *Dactylosporangium* 属の分離頻度は日本の方が高い傾向が見られた。ミャンマーでのみ出現した放線菌属は, *Mycobacterium* 属 (1株), *Kineosporiaceae* 科の新属推定株 (4株), *Micrococcus* 属, *Isoptericola* 属 (6株), *Actinocatenispora* 属 (1株), *Cateliglobospora* 属 (1株), *Hamadaea* 属 (2株), *Planosporangium* 属 (1株), *Phytohabitans* 属 (2株), *Micromonosporaceae* 科の新属推定株 (4株), *Mumia* 属 (1株), *Actinophytocola* 属 (4株), *Kibdelosporangium* 属 (1株), *Kutzneria* 属 (1株), *Saccharopolyspora* 属 (1株), *Pseudonocardiaceae* 科の新属候補 (1株), *Streptoacidiphilus* 属 (3株), *Planobispora* 属 (1株), *Planomonospora* 属 (6株), *Streptosporangiaceae* 科の新属候補株 (1株), *Actinoallomurus* 属 (1株) であった。

種のレベルで分離頻度の高かったのは *Actinoplanes brasiliensis*, *Actinoplanes digitatis*, *Couchioplanes caeruleus*, *Krasilnikovia cinnamonea*, *Luedemannella flava* であり, これらの内, 後者の3種はミャンマーの方で明らかに分離頻度が高かった。*Krasilnikovia cinnamonea* 分離株のSEM像をFig. 3に示した。菌糸状に胞子のクラスターを形成する特徴が示されている。また, ミャンマーからのみ分離された種には *Cryptosporangium minutisporangium*, *Catenuloplanes nepalensis*, *Dactylosporangium tropicum*, *Planomonospora sphaerica* 等, 熱帯特有の種 (Tamura *et al.*, 1995) が含まれていた。

#### 新属新種の提案

新規性の高い一部の分離株については詳細な分類試験



**Fig. 4** Percentages of strains exhibiting antimicrobial activity and/or having genes that encode nonribosomal peptide synthetases (NRPS) or type I polyketide synthases (PKS-I) in 55 new-species candidates\* of *Actinoplanes* from Myanmar. \* Strains exhibiting <98.7% 16S rDNA sequence similarity with a deposited sequence.

を行っている。*Planomonospora* 属の新種については放線菌学会で発表を行い, この他に *Virgisporangium* 属の新種, *Krasilnikovia* 属の新種, *Kineosporiaceae* 科の新属, *Frankineae* 亜目の新科または新属について, 学術雑誌 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* および *Journal of Antibiotics* 上で提案を行う予定である。

#### 抗菌活性

ミャンマーから分離された *Actinoplanes* 属には多くの新属推定株が存在しており, これらの有用性を調査するため抗菌活性および二次代謝産物生合成関連遺伝子 (PKS-I, NRPS 遺伝子) の確認をPCR法にて行った。その結果, 55株中30株 (57%) が被試験菌 (カビ, 酵母, 細菌) のいずれかに対して抗菌活性を有しており, 二次代謝産物生合成関連遺伝子は32株 (59%) が保有し, 抗菌活性もしくは二次代謝産物生合成関連遺伝子のいずれかを有する数は46株 (83%) に及んだ (Fig. 4)。

## 【乳酸菌】

## 共培養分離法の有効性

共培養分離法と希釈平板法をミャンマーの同一サンプル（エビのなれ鮓）に適用し、乳酸菌を分離した結果を Table 3 に示した。共培養法を用いると通常の希釈平板法では得られない *Lactobacillus* 属の既知種株や新種推定株が分離できることがわかった。

## 同定結果

分離株につき 16S rDNA 塩基配列の相同性検索の結果から  $\geq 99\%$  の相同性を種の同定基準として同定を行った (Table 4, Table 5)。その結果分離株253株は4科、8属、30種と多様な分類群に配属された。属のランクでは *Lactobacillus* 属菌の分離頻度が最も高く、分離株の80% (202株) を占め、次いで *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* 属菌の順に多く分離された (Fig. 5a)。種のランクでは *Lactobacillus pentosus* (53株), *Lactobacillus fermentum* (28株), *Lactobacillus plantarum* (26株), *Lacto-*

*bacillus farciminis* (23株) 等の分離頻度が高かった。また、*Lactobacillus futsaii*, *Lactobacillus plajomi* といった熱帯地域特有の種 (Chao *et al.*, 2012; Miyashita *et al.*, 2015) も分離された (Fig. 5b)。なお、253分離株のうち12株は、既知種との16S rDNA 塩基配列の相同性が99.0%未満であり、新種推定株とした。253株を分離方法別の内訳をみるとコントロールとした希釈平板法から7属23種、共培養法から5属20種が認められた。一方、我々が独自にサンプリング、分離した結果 (148株) のみを比較すると、希釈平板法から5属14種、共培養法から4属22種が認められ、このうち共培養法で分離されたのは *Lactobacillus mudanjiangensis*, *Weissella cibaria* などの14種であった (data not shown)。

## 糖類発酵性

分離株253株につき17種類の糖類の発酵能を調べた結果を Fig. 6 に示した。生育度を観察した結果、137株 (54.2%) が全ての糖類で生育が認められた。糖類のうち、単糖類、二糖類では228株 (90.1%) の分離株が pH を4

**Table 3** Effect of co-culture method for the isolation of lactic acid bacteria from a food product of fermented shrimp and rice (Pazon Chin) in Myanmar

Closest species based on 16S rDNA sequence similarity rate (%)	Control dilution method	No. of isolates		
		Co-culture with;		
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 1001	<i>Klyveromyces marxinus</i> RIFY 4040	<i>Pichia fermentans</i> RIFY 4078
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1			
<i>Lactobacillus tuccei</i>		1		1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1			1
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>planatarum</i>			1	
<i>Lactobacillus</i> sp.			1*	

\* A new species candidate with 16S rDNA similarity of 98.5% compared to the most homologous prototype species.

**Table 4** Taxonomic diversity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Myanmar\*

Country	No. of isolates	No. of		
		Family	Genera	Species
Myanmar	253	4	8	30

\* Isolates were identified using a phylogenetic analysis based on comparison of nearly complete 16S rDNA sequences (>1,200 bp). A total of 55 samples (21 pickled vegetables, 11 fermented sushi, 9 fermented paste, 2 fermented rice, 1 Doubanjiang and others) were used.

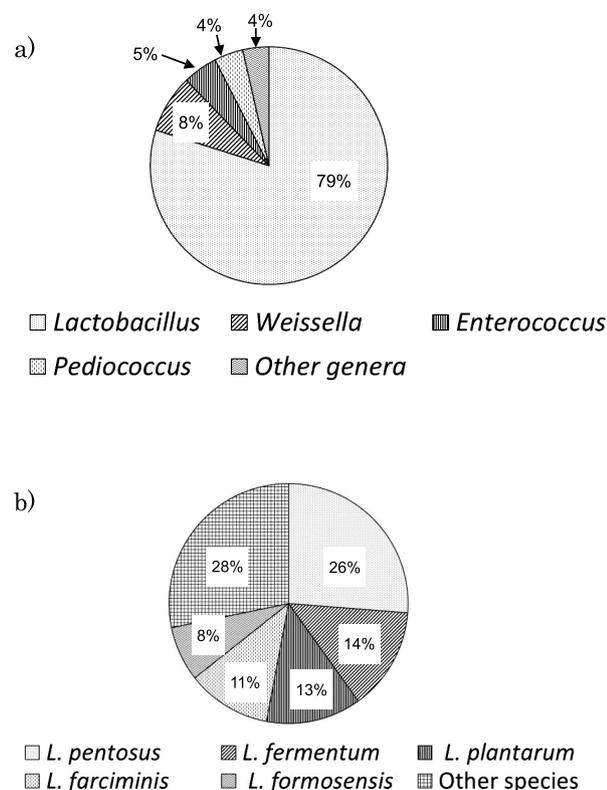
熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築

**Table 5** Genera and species of lactic acid bacteria found in traditional fermented foods in Myanmar

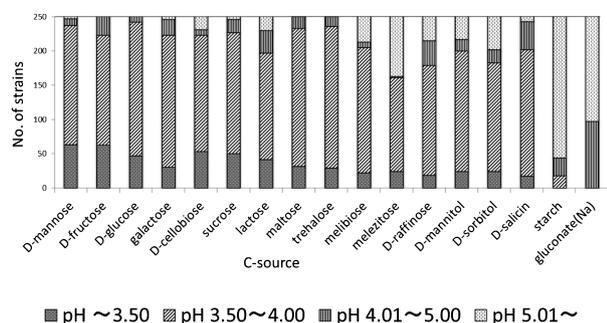
Family	Genus & Species*	No. of strains		
		Control method	Co-culture method	Total
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>			
	<i>casseliflavus</i>	12		12
	<i>Vagococcus</i>			
	unidentified	2		2
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>			
	<i>brevis</i>		7	7
	<i>collinoides</i>	4		4
	<i>curvatus</i>	2	1	3
	<i>farciminis</i>	15	8	23
	<i>fermentum</i>	13	15	28
	<i>formosensis</i>	3	12	15
	<i>futsaii</i>	9		9
	<i>gallinarum</i>	1		1
	<i>paralimentarius</i>	1		1
	<i>mindensis</i>	1		1
	<i>mudanjiangensis</i>		4	4
	<i>numrensis</i>	2	3	5
	<i>paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>		2	2
	<i>paracollinoides</i>	1		1
	<i>pentosus</i>	33	20	53
	<i>plajomi</i>	2		2
	<i>plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	11	15	26
	<i>pobuzihii</i>	1		1
	<i>songhuajiangensis</i>		1	1
	<i>tucceti</i>		1	1
	<i>versmoldensis</i>	2		2
	<i>vini</i>	3		3
unidentified	6	3	9	
<i>Pediococcus</i>				
<i>pentosaceus</i>	5	5	10	
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>			
	<i>citreum</i>	1		1
	<i>pseudomesenteroides</i>		2	2
	<i>Weissella</i>			
	<i>paramesenteroides</i>	2	12	14
	<i>thailandensis</i>		1	1
	<i>cibaria</i>		3	3
	<i>ghanensis</i>		1	1
unidentified	1		1	
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>			
	<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		2	2
	<i>Streptococcus</i>			
	<i>infantarius</i> subsp. <i>coli</i>	2		2
Total		135	118	253

\* 16S rDNA sequence similarity value of  $\geq 99.0\%$  was used as the criteria for identification at the species level.

以下に低下させる強い発酵能を示した。最も pH が低下したのはグルコースを糖源とした時の *Lactobacillus min-densis* RD524199 株で、培養に pH は 3.11 まで低下した。本菌はラクトースやメリビオースなどの二糖類、メレチトース、ラフィノースなどの三糖類、マンニトールやソルビトールなどの糖アルコールに対する発酵能は非常に低かったが、フルクトースやマンノースといった単糖類には高い発酵能を示した。



**Fig. 5** Incidences of lactic acid bacteria genera (a) and *Lactobacillus* species (b) in traditional fermented foods in Myanmar. The percentages on the graphs are the frequencies of genera (a) and species (b).



**Fig. 6** Assimilability of carbon sources by lactic acid bacteria isolates (253 strains).

## 考 察

1993年の生物多様性条約の発効により微生物を含む遺伝資源へのアクセスするためには遺伝資源提供国への「事前情報に基づく同意」と「利益配分」を行う事が基本原則となった。その後、利益配分については2014年の名古屋議定書によって遺伝資源提供国と遺伝資源利用国の双方に義務を課した国際的な取り決めが行われた(井上 2015)。これに伴い、本研究においてミャンマーの遺伝資源である放線菌および乳酸菌の収集とその解析を行うためにはこの生物多様性条約に則ったアクセスを行う必要がある。そこで、我々は製品評価技術基盤機構(NITE)の「ミャンマーにおける生物遺伝資源の保全と持続可能な利用に関する共同事業」に参画し、ミャンマー・パテイン大学を共同事業先として研究を開始した。

### 【放線菌】

東南アジアの熱帯地域における放線菌の生態および多様性に関する研究は、中国雲南(Xu *et al.*, 1996)、シンガポールの熱帯雨林(Wang *et al.*, 1999)、マレーシア(Muramatsu *et al.*, 2003)インドネシア(Lisdiyanti *et al.*, 2012; Widyastuti *et al.*, 2012)、ベトナム(Hop *et al.*, 2011)で行われており、ミャンマーからの報告はない。一方、分類学的な研究として新属新種の提案は熱帯域を起源とする報告は近年になってから比較的多くなっており、例えば、バングラデシュからは *Krasilnikovia* 属(Ara & Kudo, 2007a), *Luedemannella* 属(Ara & Kudo, 2007b), *Pseudosporangium* 属(Ara *et al.*, 2008)が提案され、タイからは *Actinocatenispora* 属(Thawai *et al.*, 2006), *Actinophytocola* 属(Indananda *et al.*, 2010)の提案が行われている。これら放線菌についてみると *Krasilnikovia* 属, *Luedemannella* 属, *Pseudosporangium* 属は本研究で日本からも分離されているが、ミャンマー連邦における分離頻度が非常に高く(Table 2), *Actinocatenispora* 属, *Actinophytocola* 属についてはミャンマー連邦でのみ分離されている。また, *Planomonospora* 属(Thiemann *et al.*, 1967)は発表から50年近く経過しているにも関わらず僅か4種のみが報告されている超希少放線菌属である。そして、興味深い事にこれら菌株はインド(*P. sphaeria*), スーダン(*P. alba*), ベネズエラ(*P. venezuelensis*), チリ(*P. parontospora* subsp. *parontospora*), アルゼンチン(*P. parontospora* subsp. *antibiotica*)といった熱帯域を起源としている。今回、熱帯域であるミャンマーからは *Planomonospora* 属が分離されているが、日本からの分離例は無かった。一方、種レベルの特徴としては, *Krasilnikovia cinnamonea*, *Couchioplanes caeruleus*, *Pseudosporangium ferrugineum*, *Luedemannella flava* は日本と

比較してミャンマーでの分離頻度が高く、また *Catenuloplanes nepalensis*, *Cryptosporangium minutisporangium*, *Dactylosporangium tropicum*, *Planomonospora sphaerica* 等はミャンマーからのみ分離されている。

新規分類群については既知種との 16S rDNA 相同性が 98.7% 未満を新属もしくは新種推定株としており、ミャンマー産放線菌分離株 633 株中の 210 株 (33%) にも達し、中には科、属レベルで新規性が高い株もあった。特に *Frankineae* 亜目からは新科、新属と推定される菌株が分離されている。この他に、*Micromonosporaceae* 科、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptosporangiaceae* 科からも新属と推定される放線菌株が分離されている。一方、日本からは新属となるような候補株は見出すことはできなかったことから、熱帯には日本では分離困難な「超希少微生物」が存在していると考えられる。なお、これらの新科・新属候補の放線菌株については現在詳細な分類学的な研究を行っている。

放線菌の有用性を評価する方法として、抗菌活性などのバイオアッセイ法が用いられてきたが、二次代謝生成遺伝子 (NRPS や PKS-I, -II, -III) を PCR で検出する遺伝子検出法との併用が現在では主流になりつつある (Meklat *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Bredholdt *et al.*, 2007)。本研究では、ミャンマー産の希少放線菌 *Actinoplanes* 属の中で新種推定株 55 株を選抜し、抗菌活性と NRPS 遺伝子および I 型 PKS 遺伝子の検出によって有用性の評価を行った。その結果、抗菌活性と二次代謝遺伝子のいずれかを持つ菌株の割合は 84% にも上った。これまでに *Actinoplanes* 属からは 120 以上の抗生物質の報告 (Lazzarini *et al.*, 2001) があることから、ミャンマー産の新種と推定される *Actinoplanes* 属は新規創薬資源として高いポテンシャルを有していると考えられる。

#### 【乳酸菌】

発酵食品に関わる乳酸菌の多様性の研究はヨーロッパやアジアなどの伝統的な発酵食品が多く食されている地域で多数報告されている (Tamang *et al.*, 2016)。特に野菜や魚介類を用いた発酵食品文化を有するアジア圏においては台湾の豆鼓や酸菜 (Chen *et al.*, 2010, 2012)、韓国のキムチ (Nam *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011)、タイのからし菜やフウチヨウソウ (Phithakpol *et al.*, 1995) の乳酸菌について多くの研究報告がある。また、発酵乳に関してはインド (Dewan & Tamang, 2006, 2007; Tamang *et al.*, 2000) やモンゴル (Watanabe *et al.*, 2008, 2009; Yu *et al.*, 2011) などで行われている。

一方、ミャンマーの発酵食品に関してはンガチンと呼ばれる小魚の馴れずしから乳酸菌を分離した報告があるが (Thwe *et al.*, 2011; Moe *et al.*, 2015)、網羅的な多様性

研究に関する報告はない。

本研究では魚を原料とする発酵ペーストや馴れずし、発酵茶、大豆製品、野菜の漬物など多様な発酵食品 55 点から乳酸菌を分離し、253 株、4 科、8 属、30 種におよぶ乳酸菌を取得した。宮下ら (Miyashita *et al.*, 2012) はタイの発酵食品 114 サンプルから 945 株を分離し、410 株について 16S rDNA 塩基配列を行い、6 属が認められたことを報告しているが、供試した試料数、分離株数がかなり少ないにもかかわらず本研究では極めて効率的に多様な乳酸菌が分離できたと考えられた。

乳酸菌を食品等に利用する上で糖源の発酵性は重要な特性の一つである。本研究では分離株の 17 種類の糖源に対する発酵性を調査した。供試菌株の約 80% を占める *Lactobacillus* 属にはラフィノースやメレチトース等に発酵能を示さない種が多数存在する (Khedida, *et al.*, 2006) が、本調査では 65% 以上の分離株がラフィノースやメレチトースに発酵能を示し、pH 4.0 以下となった。またグルコースやフルクトース等の単糖類、スクロースやラクトース等の二糖類では 90% 以上の分離株が pH 4.0 以下となった。スターチおよびグルコン酸ナトリウムを除くと、最も低い発酵能を示したメレチトースでも 71% の分離株に発酵能が認められた。この結果からミャンマーの発酵食品由来乳酸菌は全体的に発酵能が高いと考えられる。

#### 要 約

近年、熱帯域の各地で有用微生物の探索が始まっており、熱帯由来の新種が数多く記載されてきている。しかし分離技術が未開拓な菌種も多く、その分布は未だに不明な点が多い。本研究では、放線菌及び乳酸菌を対象とし、ミャンマーの土壌や伝統的な発酵食品から希少種や固有種の選択的分離法を構築するとともに、分離株の分類学的多様性や有用性を評価した。

【放線菌】 ミャンマー各地の土壌 113 点から再水和-遠沈法 (Hayakawa *et al.*, 2000) とその変法 (Maeno *et al.*, 2015) により希少放線菌 633 株 (NITE 保有株も含む) を得た。形態及び 16S rDNA 解析による簡易同定の結果、分離株は 17 科、48 属、127 種と多様な属種に配属された。同様な手法で日本から分離された希少放線菌相 (19 科、47 属、155 種) と比べると、属のランクでは 40%、種のランクでは 22% しか重複しておらず、ミャンマーの希少放線菌の種類組成は日本と明らかに異なっていることがわかった。属レベルでは *Krassilnikovia* 属菌の割合が顕著に高く、*Planomonospora*, *Actinophytocola* 各属菌はミャンマー試料のみから得られた。種のランクでは日本に比べて *K. cinnamomea*, *Couchioplanes caeruleus*, *Pseu-*

*dosporangium ferrugineum* 等の分離頻度が高く、*Catenuloplanes nepalensis*, *Cryptosporangium minutisporangium*, *Dactylosporangium tropicum*, *Planomonospora sphaerica* 等がミャンマーのみから分離された。また、既知種との 16S rDNA 相同性が 98.7% 未満の新種推定株 (超希少微生物) が 633 株中 210 株 (33%) にも達し、中には科、属レベルで新規性が高い株もあった。新種推定株は 84% (供試 55 株中 46 株) が抗菌活性もしくは二次代謝産物生成関連遺伝子 (PKS-I または NRPS 遺伝子) を有しており、新規創薬資源として期待される。なお、一部の菌株については詳細な分類試験 (形態, 化学組成, 生理生化学的性状, DNA 解析に基づく多相分類) が進行中であり、新種等として提案する予定である。

**【乳酸菌】** 既知種 (乳酸菌 15 種, 酵母 6 種) を用いた予備実験において、乳酸菌は特定の酵母とともに共培養すると、その生育が促進あるいは抑制される場合があることがわかった。このことから乳酸菌分離源の試料を *Saccharomyces cerevisiae* 等の酵母とともに液体培地中で前培養し、次いで平板分離する新法を構築した。この共培養法を発酵食品に適用することで、通常の集積培養法では分離することができない乳酸菌種が得られることがわかった。ミャンマーの発酵食品 55 点 (野菜の漬物, 魚やエビのなれ鮓, 発酵ペースト, 発酵米麴, 豆板醬等) から、酵母との共培養法及び集積培養法により 253 株 (NITE 保有株も含む) の乳酸菌を分離し、上記同様に 16S rDNA 解析による簡易同定を行なったところ、4 科, 8 属, 30 種に配属された。*Lactobacillus* 属菌が最も多く 80% (202 株) を占め、*Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 属菌等がそれに続いた。*Lactobacillus* 属分離株の中には熱帯域の台湾やタイの発酵食品から分離例のある *L. futsaii* や *L. plajomi* が含まれていた。16S rDNA 解析に基づく新種推定株は 12 株 (5%) であった。有用性試験においては、253 株中 137 株 (54%) が 17 種類の供試糖類全てを資化した。また、228 株 (90%) が単糖類, 二糖類の高い発酵能 (培地 pH 4 以下への低下) を示した。さらにバクテリオシン様の抗菌活性を持つ株も 5 株 (2%) あった。以上のように、ミャンマー産乳酸菌は分類学的に多様であり、発酵能が強いことから、新たな発酵食品開発への利用が期待できる。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Maeno, M., Miyazaki, S., Ikoma, K., Ando, K., Pay, N. & Hayakawa, M. 2015. Isolation of motile actinomycetes by using modified RC method from Japan and Myanmar. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi, Myanmar).
- 2) Maeda, K., Otoguro, M., Kishimoto, M., Hayakawa, M., Ando, K., Pay, N. & Yanagida, F. 2015. Development of new isolation method of lactic acid bacteria by co-culture. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi, Myanmar).
- 3) Yamamura, H., Miyazaki, S., Hamada, M., Ando, K., Pay, N. & Hayakawa, M. 2015. Taxonomical study of *Planomonospora* sp. RD501994 isolated from Myanmar. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi, Myanmar).
- 4) 前田康太郎, 乙黒美彩, 岸本宗和, 柳田藤寿. 2015. 共培養による乳酸菌の新規分離法の開発 (酵母エンハンス法). 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山).
- 5) 生駒航大, 山村英樹, 中川洋史, 安藤勝彦, Nyunt Phay, 早川正幸. 2015. ミャンマーで分離された希少放線菌における分類学的な多様性と二次代謝産物生成関連遺伝子の分布. 日本放線菌学会 2015 年度大会 (富山).
- 6) 宮崎頌矢, 生駒航大, 山村英樹, 中川洋史, 安藤勝彦, Nyunt Phay, 早川正幸. 2015. ミャンマーで分離された運動性希少放線菌 RD501994 の同定. 日本放線菌学会 2015 年度大会 (富山).
- 7) 乙黒美彩, 前田康太郎, 標 智仁, 岸本宗和, 安藤勝彦, Nyunt Phay, 早川正幸, 柳田藤寿. 2016. ミャンマー発酵食品からの共培養による乳酸菌の分離とその発酵特性. 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌).

## 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申し上げます。また、ミャンマー連邦におけるサンプリングおよび共同事業においてミャンマー・パテイン大学の Nyunt Pay 学長ならびに御製品評価技術基盤機構の安藤勝彦博士と職員の方々に多大なご協力を賜りましたことに感謝申し上げます。

## 文 献

- Ara, I. & Kudo, T. 2007a. *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae* and description of *Krasilnikovia cinnamonea* sp. nov. *Actinomycetologica* **21**: 1–10.
- Ara, I. & Kudo, T. 2007b. *Luedemannella* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae* and description of *Luedemannella helvata* sp. nov. and *Luedemannella flava* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**: 39–51.
- Ara, I., Matsumoto, A., Bakir, M.A., Kudo, T., Omura, S. & Takahashi, Y. 2008. *Pseudosporangium ferrugineum* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1644–1652.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, Jr., W., Pereira, J.O. & Araújo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron. J. Biotechnol.* **3**: 15–16.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L.P. & Zotchev, S.B. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ.*

- Microbiol. **9**: 2756–2764.
- Chao, S.H., Kudo, Y., Tsai, Y.C. & Watanabe, K. 2012. *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 489–494.
- Chen, Y.S., Wu, H.C., Liu, C.H., Chen, H.C. & Yanagida, F. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *jiang-sun* (fermented bamboo shoots), a traditional fermented food in Taiwan. J. Sci. Food Agric. **90**: 1977–1982.
- Chen, Y.S., Wu, H.C., Lo, H.Y., Lin, W.C., Hsu, W.H., Lin, C.W., Lin, P.Y. & Yanagida, F. 2012. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *jiang-gua* (fermented cucumbers), a traditional fermented food in Taiwan. J. Sci. Food Agric. **92**: 2069–2075.
- Dewan, S. & Tamang, J.P. 2006. Microbial and analytical characterization of *Chhu*, a traditional fermented milk product of the Sikkim Himalayas. J. Sci. Indus. Res. **65**: 747–752.
- Dewan, S. & Tamang, J.P. 2007. Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. Antonie van Leeuwenhoek **92**: 343–352.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P. & Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. **38**: 3623–3630.
- Flanagan, J.L., Brodie, E.L., Weng, L., Lynch, S.V., Garcia, O., Brown, R., Hugenholtz, P., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Wiener-Kronish, J.P. & Bristow, J. 2007. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. **45**: 1954–1962.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. & Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol. Ecol. **54**: 401–415.
- Goodfellow, M., Stanton, L.J., Simpson, K.E. & Minnikin, D.E. 1990. Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. Microbiology **136**: 19–36.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. & Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture **234**: 335–346.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. **65**: 501–509.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. 1989. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. Actinomycetologica **3**: 95–104.
- Hayakawa, M., Otaguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T. & Iimura, Y. 2000. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. Antonie van Leeuwenhoek **78**: 171–185.
- Hamada, M., Shibata, C., Nurkanto, A., Ratnakomala, S., Lisdiyanti, P., Tamura, T. & Suzuki, K. I. 2015. *Tropicihabitans flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Cellulomonadaceae*. Antonie van Leeuwenhoek **107**: 1299–1306.
- Hong, K., Gao, A.H., Xie, Q.Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.P., Yu, H.P., Li, J., Yao, X.S., Goodfellow, M. & Ruan, J.S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. Mar. Drugs **7**: 24–44.
- Hop, D.V., Sakiyama, Y., Binh, C.T., Otaguro, M., Hang, D.T., Miyadoh, S., Luong, D.T. & Ando K. 2011. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. J. Antibiot. (Tokyo) **64**: 599–606.
- 井上 歩. 2015. 名古屋議定書－遺伝資源へのアクセスと利益配分について－. 日本乳酸菌学会誌 **26**: 22–31.
- Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. & Thamchaipenet, A. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 1141–1146.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.W., Hahn, Y., Madsen, E.L. & Jeon, C.O. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Appl. Environ. Microbiol. **77**: 2264–2274.
- Khedida, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. & Zinedine, A. 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiol. Res. **164**: 81–91.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. & Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 716–721.
- Kim, B. Y., Kshetrimayum, J.D. & Goodfellow, M. 2011. Detection, selective isolation and characterisation of *Dactylosporangium* strains from diverse environmental samples. Syst. Appl. Microbiol. **34**: 606–616.
- Lan, C.H., Son, C.K., Ha, H.P., Florence, H., Binh, L.T., Mai, L.T., Tram, N.T.H., Khanh, T.T.M., Phu, T.V., Dominique, V. & Yves, W. 2013. Tropical traditional fermented food, a field full of promise. Examples from the Tropical Bioresources and Biotechnology programme and other related French–Vietnamese programmes on fermented food. Int. J. Food. Sci. **48**: 1115–1126.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. 2001. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek **79**: 399–405.
- Lisdiyanti, P., Tamura, T., Ratnakomala, S., Ridwan, R., Kartina, G., Lestari, Y., Ando, K. & Widyastuti, Y. 2012. Diversity of actinomycetes from soil samples collected from Lombok Island, Indonesia. Annales Bogorieneses **16**: 35–40.
- Maeno, M., Miyazaki, S., Ikoma, K., Ando, K., Pay, N. & Hayakawa, M. 2015. Isolation of motile actinomycetes by using modified RC method from Japan and Myanmar. The Second Myanmar–Japan Symposium (Patheingyi, Myanmar).
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F. & Lebrihi, A. 2011. Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. Appl. Environ. Microbiol. **77**: 6710–6714.
- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Kamakura, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanaka, N., Nakagawa, Y. & Suzuki, K. 2015. *Lactobacillus plajomi* sp. nov. and *Lactobacillus modestisalitolans* sp. nov., isolated from traditional fermented foods. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **65**: 2485–2490.

- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Kirtikara, K., Tanticharoen, M. & Suzuki, K. 2012. 16S rRNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Thailand. *Microbiol. Cult. Coll.* **28**: 1–9.
- Moe, N.K.T., Thwe, S.M., Shirai, T., Terahara, T., Imada, C. & Kobayashi, T. 2015. Characterization of lactic acid bacteria distributed in small fish fermented with boiled rice in Myanmar. *Fish Sci.* **81**: 373–381.
- Muramatsu, H., Shahab, N., Tsurumi, Y. & Hino, M. 2003. A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using a simple identification method based on partial 16S rDNA sequence. *Actinomycetologica* **17**: 33–43.
- Nam, Y.D., Chang, H.W., Kim, K.H., Roh, S.W. & Bae, J.W. 2009. Metatranscriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays. *Int. J. Food Microbiol.* **130**: 140–146.
- Nurkanto, A., Lisdiyanti, P., Hamada, M., Ratnakomala, S., Shibata, C. & Tamura, T. 2016. *Actinoplanes bogoriensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from leaf litter. *J. Antibiot. (Tokyo)* **69**: 26–30.
- Omura, S. 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**: 91–98.
- Phithakpol, B., Varayanond, W., Reungmaneevaitoon, S. & Wood, H. 1995. *The Traditional Fermented Foods of Thailand*. Kuala Lumpur: ASEAN Food Handling Bureau.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **33**: 152–155.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Ill.
- Tamura, T., Yokota, A., Huang, L. H., Hasegawa, T. & Hatano, K. 1995. Five New Species of the Genus *Catenuloplanes*: *Catenuloplanes niger* sp. nov., *Catenuloplanes indicus* sp. nov., *Catenuloplanes atrovinosus* sp. nov., *Catenuloplanes castaneus* sp. nov., and *Catenuloplanes nepalensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **45**: 858–860.
- Tamang, J.P., Dewan, S., Thapa, S., Lasupo, N.A., Schillinger, U., Wijaya, A. & Holzapfel, W.H. 2000. Identification and enzymatic profiles of predominant lactic acid bacteria isolated from soft-variety chhurpi, a traditional cheese typical of the Sikkim Himalayas. *Food Biotechnol.* **14**: 99–112.
- Tamang J.P., Watanabe, K. & Holzapfel, W.H. 2016. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* **7**: 1–28.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. & Kudo, T. 2006. *Actinocatenispora thailandica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1789–1794.
- Thiemann, J.E., Pagani, H. & Beretta, G. 1967. A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Planomonospora*, gen. nov. *Giornale di Microbiologia* **15**: 27–38.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882.
- Thwe, S.M., Kobayashi, T., Luan, T., Shirai, T., Onodera, M., Hamada-Sato, N. & Imada, C. 2011. Isolation, characterization, and utilization of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. *Fish Sci.* **77**: 279–288.
- Wang, Y., Zhang, Z.S., Ruan, J.S., Wang, Y.M. & Ali, S.M. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 178–187.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T. and Demberel, S. 2008. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in airag and tarag, traditional fermented milk products from Mongolia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1313–1325.
- Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J. & Demberel, S. 2009. *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1535–1540.
- Widyastuti, Y., Lisdiyanti, P., Ratnakomala, S., Kartina, G. & Ridwan, R. 2012. Genus diversity of actinomycetes in Cibinong science center, West Java. Indonesia. *Microbiol. Indonesia* **6**: 165–172.
- Xu, L., Li, Q. & Jiang, C. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 244–248.
- Yu, J., Wang, W.H., Menghe, B.L., Jiri, M.T., Wang, H.M., Liu, W.J., Bao, Q.H., Lu, Q., Zhang, J.C., Wang, F., Xu, H.Y., Sun, T.S. & Zhang HP. 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented daily products in Mongolia. *J. Dairy Sci.* **94**: 3229–3241.

## 発酵菌による細胞リプログラミング機構の解明

太田 訓正

熊本大学大学院生命科学研究部

〒860-8556 熊本市中央区本荘 1-1-1

## Molecular mechanism of cellular reprogramming by bacteria

Kunimasa Ohta

Department of Developmental Neurobiology, Graduate School of Life Sciences,

Kumamoto University

1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

Previously, we demonstrated cellular reprogramming by introducing lactobacilli into human dermal fibroblasts (HDFs), which could then differentiate into cells of the three germ layers *in vivo* and *in vitro* (Ohta *et al.*, 2012). The bacilli that causes leprosy had also been reported to expand their infection by the machinery of cellular reprogramming (Masaki *et al.*, 2013). Although the phenomenon of bacterial reprogramming has been reported, the molecules capable of determining the fate of human cells have not been identified (Ito & Ohta, 2015).

Here, we showed that the molecule of somatic cell reprogramming is ribosomes. The treatment of ribosomes to HDFs form cell clusters expressing stemness markers and inducible to trigerms layers derived cells. The ribosomes are incorporated to the cytoplasm and nucleus by activating endocytosis. As ribosomes are present in almost all living cells, their involvement in release of cell fate restraint suggests a new concept in the plasticity of cell differentiation, evolution, and generation.

Key words: Lactic acid bacteria, reprogramming, multipotency, stem cell

### 諸 言

腸の中では、様々な種類の菌が共生し一つの生態系を形作っている。乳酸菌とは、糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称であり、腸内フローラを構成する善玉菌（人体に有用な働きをする菌の総称）の一つである。乳酸菌には腸の働きをよくするだけでなく、アレルギーを抑え、細菌やウイルス、癌に対する抵抗力を高める力がある。乳酸菌やビフィズス菌がアトピー性皮膚炎や花粉症に予防効果があること、ヨーグルトを食べるとインフルエンザにかかりにくくなるといった報告から、腸内細菌は「現代医療のトップランナー」と言われるほど未知なる可能性を持っている。また、一般的な腸内細菌を無菌マウスの腸に過剰投与すると、腸の重要な機能（栄養吸収、粘膜防御など）に関わる様々な遺伝子の発現が変化することから、腸内フローラ内における腸内細菌が、

宿主細胞の遺伝子発現に影響を与える可能性が示されている (Hooper *et al.*, 2001)。しかしながら、腸内細菌による腸上皮細胞機能への直接的影響などの基礎的情報は、ほとんど明らかになっていない。

我々は、「乳酸菌のような善玉菌を細胞に取り込ませると、宿主細胞に何らかの変化をもたらすはずである」というアイデアから本研究をスタートし、乳酸菌をヒト皮膚細胞に取り込ませることにより、宿主細胞にリプログラミングが起り、乳酸菌を取り込んだ細胞が分化多能性を獲得するという発見を世界に先駆けて報告した (Ohta *et al.*, 2012)。興味深いことに、「ヒト成人由来のシュワン細胞は、ライ菌 (*Mycobacterium leprae*) に感染すると多能性を獲得する」という論文 (Masaki *et al.*, 2013) が発表されたことから、現在では、我々の研究がブレイクスルーとなり、1) バクテリアが細胞に感染すること、2) 取り込まれたバクテリアは宿主細胞をリプログラムし、その遺伝子発現に影響を与え、多能性を付与することが認識されている (Ito & Ohta, 2015)。

本申請において、我々は、乳酸菌由来のリプログラミング

E-mail: ohta9203@gpo.kumamoto-u.ac.jp

共同研究者：伊藤尚文（熊本大学大学院・生命科学研究部）

ング因子の同定を試み、その分子実体がリボソームであることを見出した (Ito *et al.*, 投稿中)。今振り返ってみると、「ヒト皮膚細胞が生きた乳酸菌を取り込むと細胞塊を形成し、多能性を獲得する」という現象は、乳酸菌体内に充満するリボソームに起因する結果であったと考えれば得心がいく。今後、マーギュリスが提唱した細胞内共生説 (Margulis, 1970: 嫌気性真核生物が好気性細菌を飲み込むことにより共生し、現在の真核細胞へと進化した) を実験的に検証することで、「細菌を飲み込むことにより細胞内にミトコンドリアや葉緑体といった独自にエネルギーを生み出す小器官をもつ真核細胞の起源の解明」が期待できる。

## 実験方法

### 細胞と菌株

HDF 細胞 (Human Dermal Fibroblast cells, Cell Applications, Inc. Cat No.106-05a)

乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus* JCM 1021)

大腸菌 (*Escherichia coli* JE28)

### 乳酸菌由来画分の調製

MRS 培地を高圧蒸気殺菌後、乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus* JCM1021) を MRS 培地 20 ml に植菌し、37℃ で 2 - 3 日間振盪培養した。次に、滅菌済みの前記培地 1L を含んだ 3L 振盪フラスコに植菌し、37℃ で 3 - 4 日間、振盪培養した。得られた培養液 1L から遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) により菌体を集めた。Phosphate-Buffered Saline (PBS) に懸濁し、遠心分離を 3 回繰り返して菌体を洗浄後、PBS (pH 7.0) 30 ml に懸濁した。菌体懸濁液を Branson ソニケーター 250D 超音波破碎装置 (Branson) で破碎した。得られた細胞抽出液に硫酸アンモニウム (硫酸) を添加し、4℃ で 2 時間冷却後、遠心分離により菌体残渣を除いた。上清を回収後、一晚冷蔵庫で冷却した。サンプルを遠心分離 (10,000 rpm, 20 min, 4℃) により、タンパク質を沈殿させた。沈殿を TEA 緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、透析膜に入れ、一晚 4℃ で TEA 緩衝液に対して透析を行い、低分子の物質を取り除いた。透析したサンプルを回収し、限外ろ過フィルター (Millipore) でろ過した後、膜を透過しなかった濃縮サンプルを回収し、乳酸菌由来画分とした。

### リボソームの精製

集菌 (1L あたり 2.5 - 3.0 g) した乳酸菌を TMA-I buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM 2-メルカプトエタノール) 40 ml に懸濁した。Sonication (GTC 1 hr, output 4, duty 50%) 後、顕微

鏡で細胞が壊れているのを確認した。8,000 rpm, 5 min で遠心し、上清を回収する。0.45 μm filter をとおした後、42,000 rpm, 30 min, 4℃ で遠心し、上清を回収する。次に 36,000 rpm, 6 hr, 4℃ で遠心後、上清を廃棄する。沈殿を TMA-I 500 μl で溶解した後、Suc30 TMA-I (30% sucrose in TMA-I) 3.5 ml に 500 μl を重層した。最後に、36,000 rpm, 15 hr, 4℃ で遠心した後、上清を廃棄し、沈殿を 2 ml TMA-I buffer に溶解して、液体窒素で急速凍結後 -80℃ で保存した。

### 細胞塊形成実験

10 cm シャーレで HDF 細胞を Fibroblast Growth Medium (Cell Applications, Inc) で培養した。10 ml の CMF (Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> フリーバッファー) で細胞を洗浄した。0.25% トリプシン溶液 (1 mM EDTA 含有) を 1 ml 加えて全体にいきわたらせ、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) に 5 分間入れた後、トリプシン阻害溶液 (Cell Application Inc.) 3 ml を加え懸濁し、細胞数を計数した。あらかじめ 24 well plate にサンプルを入れておき、1 × 10<sup>5</sup> の HDF 細胞を加えた。そのまま 37℃, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、数日後、細胞塊形成を確認した。

### 多能性マーカーの誘導

乳酸菌から 70S リボソームを調製し、HDF 細胞を用いて細胞塊を形成した。培養 2 週間後、マウス抗 α-Nanog 抗体 (ReproCELL), ラット抗 Oct3/4 抗体 (R&D), マウス抗 TRA-1-60 抗体 (Life Technologies), マウス抗 SSEA4 抗体 (Life Technologies), ラット抗 Sox2 抗体 (Life Technologies) で染色した。

### 細胞分化実験

HDF 細胞に乳酸菌由来の 70S リボソームを接触させた後、2 週間後に細胞塊を取り出し、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞に分化を誘導する培養液 (GIBCO; A10072-01, A10070-01, A10071-01) に交換し、さらに 3 週間 (3 日間おきに培養液を半分量交換) 培養した。各々の細胞塊を Oil Red O 染色法 (脂肪), Alizarin Red S 染色法 (骨), Alcian Blue 染色法 (軟骨) により染色し、細胞の分化誘導を確認した。

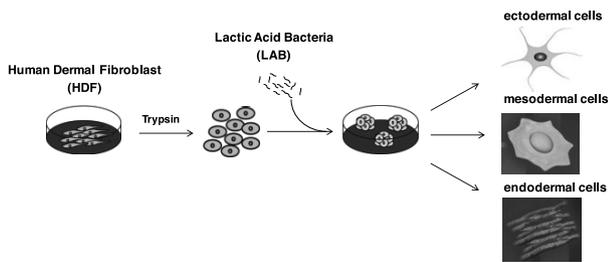
### エンドサイトーシス阻害実験

96 well plate に 70S リボソームを (0.5 μg / 50 μl / well) の割合で入れ、HDF 細胞 (20,000 cells / 100 μl) を加えた。各々のエンドサイトーシス阻害剤 (50 μl) を加えた後、CO<sub>2</sub> incubator で 2 日間培養した。細胞塊形成数を測定後、MTT アッセイによる細胞死を測定した。

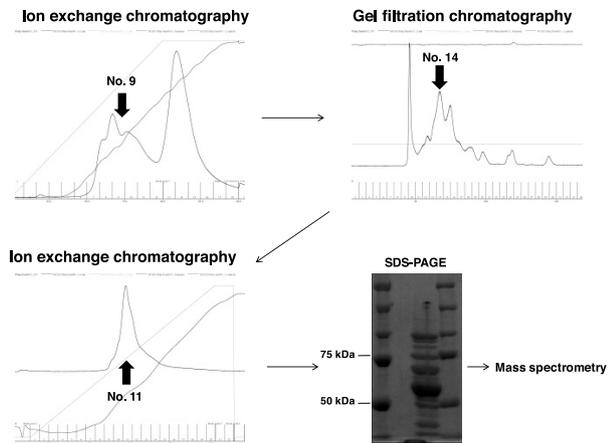
結果と考察

乳酸菌由来のリプログラム物質の探索

我々の研究グループは、ヒト皮膚細胞 (Human Dermal Fibroblasts) をトリプシン処理後、生きた乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus* JCM 1021) と混ぜると、ヒト皮膚細胞が乳酸菌を取り込むことにより細胞塊を形成し、三胚葉由来の細胞へと分化できる多能性を獲得することを報告した (Fig. 1; Ohta *et al.*, 2012). 次なる重要な問題は、乳酸菌由来の何がヒト皮膚細胞に多能性を付与するのか? ということである。乳酸菌を大量培養後、硫酸沈殿後のある画分を、最初のイオン交換カラム (QFF) にとおして細胞塊形成能を調べた。細胞塊形成活性が観察されたフラクション (No. 9) をピックアップし、次のゲルろ過交換カラム (GelF) にとおして、細胞塊形成活性があるピーク (No. 14) を見出した。さらに、このフ



**Fig. 1** Microorganisms reprogram the host cells. Cell clusters induced by LAB were transformed into cells of the three germ layers by cultivating under appropriate differentiation conditions (Ohta *et al.*, 2012).

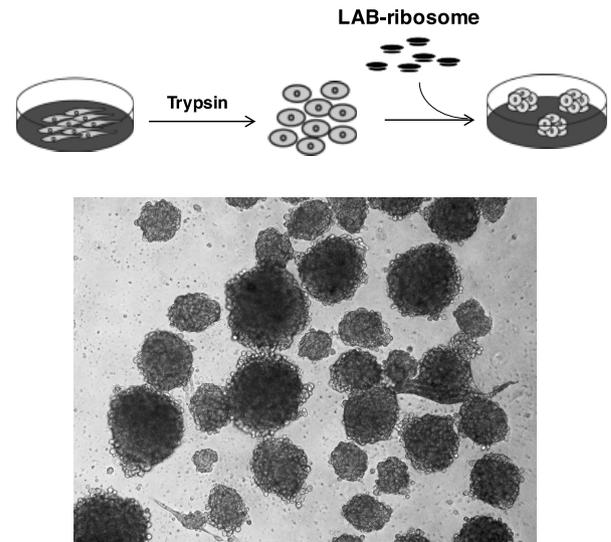


**Fig. 2** Identification of cell cluster formation activity from LAB. We fractionated the LAB lysate and observed the cell cluster forming activity by performing three column chromatography, SDS-PAGE, and LC/MS/MS analyses.

ラクシオンを別のイオン交換カラム (ReQ) にとおすと、シングルピーク (No. 11) に細胞塊形成能が存在することを見出した (Fig. 2). このフラクションを SDS-PAGE にかけてタンパク質を分離し、各々のバンドを切り出した後、質量分析解析法によりタンパク質を同定した。他の得られたタンパク質リストを眺めていると、リボソームを構成するタンパク質が幾つか見られたことから、リボソームがリプログラミングに関与しているのではと推測した。何故なら、リボソームを構成するタンパク質 (L12) を産生しない KO マウスを作製すると分化と形態が異常になり、リボソームを構成する個々のタンパク質は初期のかたち作りにおいて様々な機能を有することが示唆されているからである (Kondrashov *et al.*, 2011).

乳酸菌由来リボソームによる細胞塊形成

リボソームは、現存するすべての生命に共通したタンパク質合成マシンであると認識されている (Topisirovic & Sonenberg, 2011). リボソームは、50種類以上のタンパク質と少なくとも3種類の RNA との複合体からなる細胞内で最も大型で複雑な構造物で、大小2つのサブユニットから構成され、3分の2が RNA, 3分の1がタンパク質である。我々は、超遠心法を用いて乳酸菌からリボソームタンパク質を精製し、細胞塊形成実験を行ったところ、Fig. 3 に示すように細胞塊が形成された。



**Fig. 3** Ribosomes have the cell cluster formation activity. From Fig. 2 analyses, we speculated that ribosomes are the candidate reprogramming material and performed the cell cluster formation analysis. Note the formation of ribosomes-induced cell clusters from HDFs.

遺伝子発現解析

ヒト皮膚細胞に、乳酸菌由来リボソームを取り込ませて作製した細胞塊が、多能性を獲得したかを調べるために、遺伝子発現解析を行い、コントロールのヒト皮膚細胞と細胞塊間における多能性遺伝子の発現を比較した。Fig. 4 に示す遺伝子群は多能性マーカーであるが、上グループの遺伝子群はコントロールのヒト皮膚細胞では発現が弱い、細胞塊ではそれらの発現量が上昇している。逆に、下グループでは、ヒト皮膚細胞での発現が強く、細胞塊では発現量が減少している。この結果は、取り込まれたリボソームは宿主細胞の遺伝子発現に影響を与えることを示している。

リボソームを取り込んだ細胞塊の細胞分化

リボソームを取り込んだ細胞塊が多能性を有するのであれば、培養条件を変えることで様々な細胞へと分化できるはずである。そこで、リボソームを取り込ませて細胞塊を形成後、神経細胞または脂肪細胞へと分化誘導する培養液で細胞塊を培養し、その分化を観察した。神経細胞への分化は、神経マーカーである Tuj1 抗体を用いた免疫細胞染色法、脂肪細胞への分化は Oil Red O 染色法により調べた。Fig. 5 に示すように、神経細胞へ分化誘導を行った細胞は Tuj1 抗体により認識され（神経軸

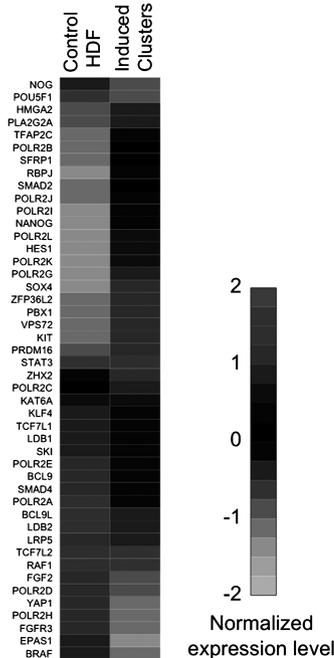


Fig. 4 Global gene-expression profiles in LAB-ribosomes-induced cell clusters for genes involved in stem cell maintenance. Fold-change in expression of differentially expressed genes between LAB-ribosomes induced cell clusters and control HDFs.

索が白く染まっている)、脂肪細胞へ分化誘導された細胞は Oil Red O 染色法により染色された（黒く染まっている細胞が脂肪細胞)。これらの結果は、リボソームを取り込んだ細胞は、多能性を獲得し、培養条件を変えることにより他の種類の細胞へと分化できることを示している。

大腸菌由来リボソームによる細胞塊形成と細胞分化

今までの実験では、主に超遠心法で精製した乳酸菌由来リボソームを用いていたが、他のバクテリア由来のリボソームでも同様の細胞塊形成能があるのかを検討した。スエーデンの Sanyal 研究グループが、人工的にリ

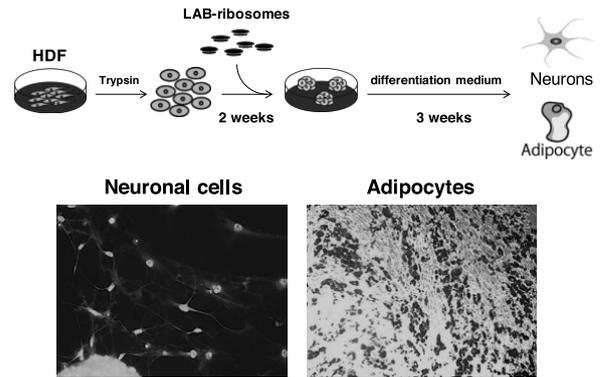


Fig. 5 Schematic drawing of cell cluster formation and cell differentiation procedure. LAB-ribosomes-induced cell clusters transformed into neuronal cells and adipocytes by cultivating under appropriate differentiation conditions.

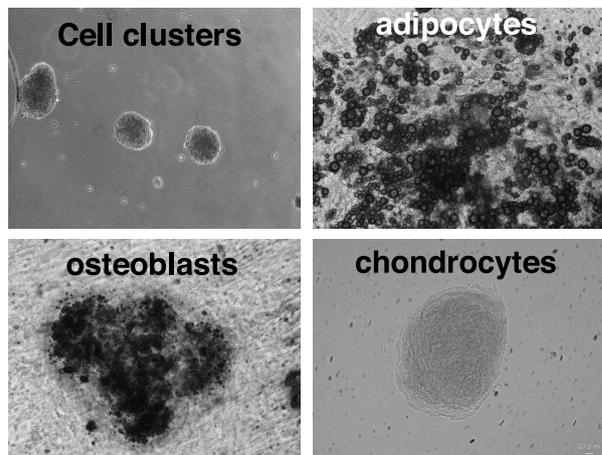


Fig. 6 Cell cluster formation and cell differentiation. Ribosomes derived from *Escherichia coli* also induced cell clusters and they were transformed into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes by cultivating under appropriate differentiation conditions.

ボソームタンパク質 L12 に His タグを付けた大腸菌を作製し、その精製方法を報告していた (Ederth *et al.*, 2009). 彼らから、この大腸菌 (JE28) の供与を受け、His タグカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施してリボソームを精製し、同様の細胞塊形成実験を行った。Fig. 6 に示すように、大腸菌由来のリボソームを取り込んだヒト皮膚細胞は、細胞塊を形成し、培養条件を変えることにより脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞へと分化した。また、本実験により、我々が超遠心法で精製した乳酸菌由来リボソームに何かか混入している可能性も排除できた。

### リボソームを細胞内に取り込むメカニズム

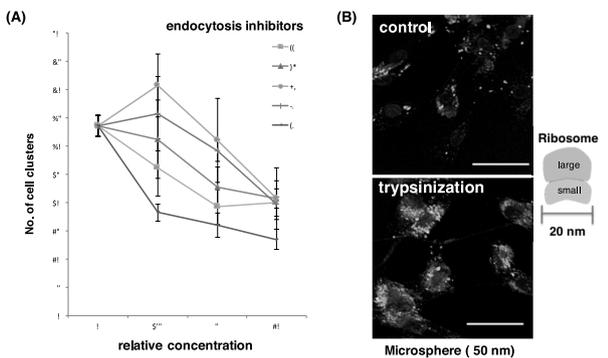
細胞外物質が細胞内に取り込まれるメカニズムとして、エンドサイトーシスの関与が考えられる。そこで、5 種類のエンドサイトーシス阻害剤の存在下で細胞塊形成実験を行った。Fig. 7A に示すように、すべてのエンドサイトーシス阻害剤は細胞塊形成を約 50% 抑制した。100% 抑制まで検討できなかったのは、阻害剤の濃度をあげると細胞が死んでしまうからである。Geloen 研究グループが、トリプシン処理後の細胞は、細胞外からの物質の取り込みが増強されるという論文を発表していた (Serdiuk *et al.*, 2014)。我々は、直径が 50 nm である蛍光ビーズを培養中のヒト皮膚細胞に直接加えてみたが、細胞質内への取り込みはほとんど観察されなかった。ところが、トリプシン処理直後のヒト皮膚細胞に蛍光ビーズ

を混合してみると、細胞質に多くの蛍光ビーズが取り込まれていた (Fig. 7B)。これらの結果は、細胞外から加えたリボソームは、エンドサイトーシスとトリプシン処理の相乗作用により細胞内に取り込まれることを示している。

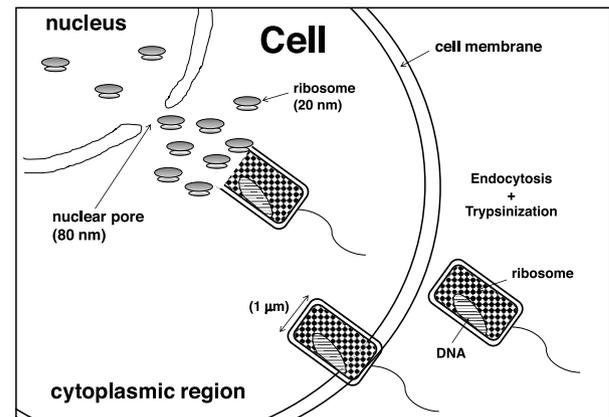
## 要 約

本申請では、乳酸菌由来のリプログラミング因子の同定を目標とし、その分子実体がリボソームであることを見出した。ヒト皮膚細胞がリボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、多能性マーカーの発現を誘導した。また、細胞塊を様々な分化誘導培養液で培養すると、三胚葉由来の細胞へと分化した。さらに、リボソームはエンドサイトーシスとトリプシン処理による相乗効果により細胞内に取り込まれ、リボソームは細胞質だけでなく核内に局在していた。乳酸菌以外にも、超遠心法やアフィニティークロマトグラフィーにより精製された大腸菌由来リボソームでも、同様の細胞塊形成能を発揮した。興味深いことに、ヒト皮膚細胞から精製したリボソームをヒト皮膚細胞に取り込ませても細胞塊が形成されることから、リボソームによる多能製獲得は普遍的な現象であると考えられる。

本研究報告は、確固たる実験結果に基づく提案であり、リボソームの発生・細胞生物学における新しい原理の発展に結びつく発展性がある。例えば、約 20 億年前に古細



**Fig. 7** Incorporation of ribosomes into the cell is enhanced by endocytosis and trypsinization. (A) Cell cluster formation was performed in the presence of the five endocytosis inhibitors. Note that the numbers of cell clusters were decreased with inhibitors. filipin (FP), genistein (GS), cytochalasin B (CC), 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EA), bafilomycin A1 (BM), concanamycin A (CM). (B) The incorporation of fluorescence beads (diameter: 50 nm) was enhanced by trypsinization.



**Fig. 8** Schematic drawing of LAB incorporation into the cell. The alive LAB were applied to the trypsinized HDFs extracellularly and they were incorporated into the cell by the endocytosis and the trypsin treatment. The cell wall of the incorporated LAB breaks down and the ribosomes flow out from the bacterial body, resulting in the localization of ribosomes in the nucleus as well as the cytoplasmic region.

菌と真正細菌の共生関係を経て誕生した真核細胞が、ミトコンドリアやクロロプラストを獲得した細胞内共生説 (Margulis, 1970) と同様に、リボソームによる細胞リプログラミングが低頻度ながらも進化の潮流になっている可能性がある。つまり、真核細胞は絶えず様々な細菌の感染に晒され、そのリボソームを細胞質や核内に取り込むことにより、細胞をリプログラミングしてより良い性質を有する細胞を進化させてきたのかもしれない (Fig. 8)。今後、リボソーム内に存在するリプログラミング機能ドメインを同定し、リボソーム構成タンパク質の新たな機能的な一面を解き明かせれば、発生・進化学に大きなインパクトを与えられると確信している。

## 本助成で得られた研究成果報告

### 口頭発表

- 1) 伊藤尚文, 河野利恵, 太田訓正. Human fibroblast reprogramming by lactic acid bacteria. 第47回日本発生生物学学会年会, 名古屋, 2014年5月27-30日
- 2) 太田訓正, 河野利恵, 伊藤尚文. Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotential Cells. 第12回幹細胞シンポジウム, 福岡, 2014年5月30-31日
- 3) 太田訓正. バクテリアと相互作用を介した細胞プログラミング. 北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー, 札幌, 2014年6月2日
- 4) Ohta, K. Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells, 12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June.18-21, 2014, Vancouver, Canada.
- 5) 太田訓正. バクテリアとの相互作用を介した細胞プログラミング. 金沢大学がん進展制御研究所セミナー, 金沢, 2014年7月25日
- 6) 太田訓正. 乳酸菌による細胞のプログラミング. 東京大学大学院 第998回生物科学セミナー, 東京, 2014年9月22日
- 7) 太田訓正. Lactic acid bacteria によるヒト皮膚細胞の reprogramming, 第7回 Retina Research Meeting, 東京, 2014年11月22日
- 8) 太田訓正. バクテリア由来物質による細胞プログラミング. 第37回日本分子生物学学会, 横浜, 2014年11月25-27日
- 9) 太田訓正. 乳酸菌による細胞のプログラミング. 九州大学 理学部セミナー, 福岡, 2014年12月9日
- 10) 太田訓正. 乳酸菌を用いた繊維芽細胞を多能性細胞に転換する技術とそのリプログラミング因子. 平成26年度バイオビジネスアワード, 大阪, 2015年2月9日
- 11) 太田訓正. Lactic acid bacteria-derived materials convert human fibroblasts to multipotent cells, 第13回幹細胞シンポジウム, 東京, 2015年5月29-30日
- 12) 太田訓正. Human cell reprogramming by defined factors isolated from lactic acid bacteria. 第48回日本発生生物学学会年会, つくば, 2015年6月2-5日
- 13) Ohta, K. Natural factors derived from lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells, 13th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 24-27, 2015, Stockholm, Sweden.
- 14) 太田訓正. 乳酸菌由来のリプログラム物質の固定とその特徴. 第17回日本RNA学会年会, 札幌, 2015年7月15-17日
- 15) 太田訓正, 伊藤尚文. 乳酸菌由来天然物質によるヒト繊維芽細胞の多能性細胞への変換. 日本プロテオーム学会2015年会, 熊本, 2015年7月23-24日
- 16) 太田訓正. Tsukushi を用いた体性幹細胞研究から, 乳酸菌由来リプログラム因子を用いた多能性細胞の創造へ, さきがけ研究会2015, 沖縄, 2015年9月20-22日
- 17) 太田訓正. リボソームによる細胞の多能性獲得機構. 創薬分子プロファイリング研究センターセミナー, 東京, 2015年9月29日
- 18) Ohta, K. Stem cell-based tissue regeneration research and education unit, development and adult Neurogenesis in the central nervous system2015, Oct,5-7, 2015, Baeza, Spain.
- 19) 太田訓正. 乳酸菌由来物質による癌細胞リプログラミング機構. (財)アステラス病態代謝研究会, 東京, 2015年10月16-17日
- 20) 太田訓正. リボソームによるヒト皮膚細胞の多能性獲得機構. 第38回日本分子生物学学会, 神戸, 2015年12月2-3日
- 21) 太田訓正. リボソームによる細胞の多能性獲得機構. 2015年度ヒト幹細胞情報化推進事業 SKIP セミナー #23, 東京, 2015年12月12-13日
- 22) 太田訓正. Ribosome converts human fibroblasts to multipotent cells, CiRA/ISSCR 2016 International Symposia, 京都, 2016年3月22-24日

### 原著論文

- 1) Ito, N. & Ohta, K. 2015. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Develop. Growth Differ.* **57**: 305-312.
- 2) 太田訓正. 2014. 乳酸菌による多能性細胞の創造. *日本乳酸菌学会誌* **25**: 13-17.

### 特許出願

- 1) 太田訓正, 伊藤尚文: 細胞の再プログラミング誘導法, および多能性細胞の製造方法 特願2014-98213
- 2) 太田訓正, 伊藤尚文: 細胞の再プログラミングを誘導する組成物, 及び該組成物を用いた多能性細胞の製造方法 特願2015-223656

## 謝 辞

本研究に対し、研究助成を頂いた公益財団法人発酵研究所に深く感謝致します。

## 文 献

- Ederth, J., Mandava, C.S., Dasgupta, S. & Sanyal, S. 2009. A single-step method for purification of active His-tagged ribosomes from a genetically engineered *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **37**: e15.
- Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk P.G. &

- Gordon, J.I. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**: 881–884.
- Ito, N. & Ohta, K. 2015. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Develop. Growth Differ.* **57**: 305–312.
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T. & Barna, M. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**: 383–397.
- Margulis, L. 1970. Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol* **26**: 337-342.
- Masaki, T., Qu, J., Cholewa-Waclaw, J., Burr, K., Raaum, R. & Rambukkana, A. 2013. Reprogramming adult schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell* **152**: 51-67.
- Ohta, K., Kawano, R. & Ito, N. 2012. Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells. *PLoS ONE* **7**: e51866.
- Serdiuk, T., Alekseev, S., Lysenko, V., Skryshensky, V. & Geloen, A. 2014. Trypsinization-dependent cell labeling with fluorescent nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **9**: 568.
- Topisirovic, I. & Sonenberg, N. 2011. Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**: 333–334.



# 胆汁酸を責任分子と想定した西欧食による 腸内細菌叢崩壊機構の解明

横 田 篤

北海道大学大学院農学研究院  
〒060-8589 北海道札幌市北区北9条西9丁目

## Clarification of the Mechanism Underlying Gut Microbiota Alteration by Western Diet Hypothesizing a Bile Acid as the Responsible Molecule

Atsushi Yokota

Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University  
Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

We have previously demonstrated that some bile acids, especially deoxycholic acid (DCA) have strong antimicrobial activity and regulate the composition of cecal microbiota in rats. As increased intestinal bile acid flow occurs in response to the administration of a high fat diet, bile acids may function as a selective pressure to alter the gut microbiota composition in response to a high fat diet, which we term the bile acid hypothesis. To evaluate bile acid as a host regulatory factor for gut microbiota composition, detailed information on the bactericidal activities of the diverse molecular species of bile acid in humans and rodents is required. We investigated the toxicity of 14 free bile acids (FBAs) in humans and rodents by monitoring intracellular pH, membrane integrity, and viability of a representative intestinal bacterium, *Bifidobacterium breve* JCM 1192<sup>T</sup>, upon exposure to these FBAs. Among them,  $\omega$ -muricholic acid ( $\omega$ MCA) showed the highest toxicity, approximately 10 times stronger than DCA. Based on the bactericidal activity of each FBA and their *in vivo* concentrations in rat feces, FBAs, particularly,  $\omega$ MCA,  $\beta$ -muricholic acid ( $\beta$ MCA), hyodeoxycholic acid, and DCA, may exhibit selective pressure and control the bacterial populations in the rodent intestine.

Next, the effects of high-fat diets on the bile acid secretion and the microbiota composition in rat cecum were studied. WKAH/Hkm Slc rats continuously fed high-lard (HL) diet exhibited the prominent increase in the amount of  $\omega$ MCA, DCA and  $\beta$ MCA compared to Control diet. HL diets induced phylum level alterations in the composition of the gut microbiota; *Firmicutes* predominated at the expense of *Bacteroides*. Analysis of operational taxonomic units (OTUs) revealed that specific bacteria at the genus levels from *Firmicutes* were highly concentrated in the HL group. In addition, we successfully isolated the member of OTUs corresponding to the genus *Blautia*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eisenbergiella* and *Lactobacillus*, which showed significantly higher proportions in HL group, and that of those corresponding the genus *Bacteroides* and *Parabacteroides* from *Bacteroidetes*, which showed low proportions in HL group. In DCA resistance test, those bacterial isolates belonging to the phylum *Firmicutes* showed higher resistance to DCA (in terms of IC<sub>50</sub> values) than those belong to the phylum *Bacteroidetes*. In correlation analysis between the total concentration of  $\omega$ MCA, DCA and  $\beta$ MCA and proportion of isolated intestinal bacteria in the whole population, the OTUs corresponding to the genus *Clostridium* and *Lactobacillus* were positively correlated with the total concentration of  $\omega$ MCA, DCA and  $\beta$ MCA in rat cecal contents fed HL and control diet, while the OTU corresponding to the genus *Bacteroides* were negatively correlated. The common OTUs that significantly increased or decreased in response to both the HL diet and cholic acid supplemented diet were detected. These results strongly supported the "bile acid hypothesis"

Key words: bile acids, high-fat diets, gut microbiota, host-microbe interaction, bile acid hypothesis.

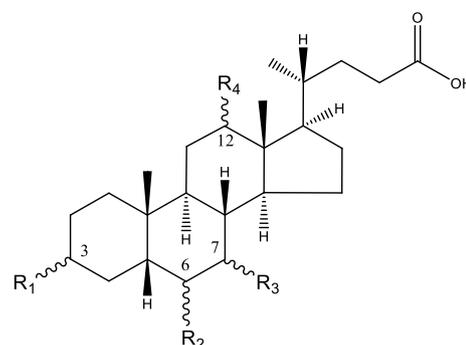
Abbreviations:  $\alpha$ MCA,  $\alpha$ -muricholic acid;  $\beta$ MCA,  $\beta$ -muricholic acid; CA, cholic acid; 5(6)-CFDA-SE, 5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; HL, high-lard; LC/MS, liquid chromatography/ mass spectrometry;  $\omega$ MCA,  $\omega$ -muricholic acid;  $\lambda$ MCA,  $\lambda$ -muricholic acid; SD rat, Sprague-Dawley rat; IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration 50; OTU, operational taxonomic unit; 3-oxo-12 $\alpha$ -3-oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid; 7-oxo-DCA, 7-oxo-deoxycholic acid; 7-oxo-LCA, 7-oxo-lithocholic acid; 12-oxo-LCA, 12-oxo-lithocholic acid; QIIME, Quantitative Insights Into Microbial Ecology; UCA, ursocholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; WKAH rat, Wistar King A Hokkaido rat

## 諸 言

今から約10年前に、肥満の発症に伴い腸内細菌叢の構成バランスが崩れることが動物モデルやヒト介入試験により報告されて以来、腸内細菌叢と健康の関係に注目が集まっている。その後次世代シーケンサーの普及に伴い、臨床研究においても肥満のみならず、2型糖尿病、大腸がん、炎症性腸疾患など様々な疾病の発症に伴う菌叢構成の変化が明らかにされてきた。現在は腸内細菌叢の変化と疾病発症の因果関係の解明に力が注がれている。とりわけ高脂肪食摂取に伴う肥満、それに連なる糖代謝異常、高脂血症、高血圧などのメタボリックシンドロームの発症に注目すると、菌叢変化と病態発症の関連性については未だに不明な点が多い。翻って考えるならば、高脂肪食の摂取により菌叢構成のバランスが変化する機構についてすら未だ不明なのである。そこで我々は微生物学研究者の責務として、高脂肪食摂取に伴う菌叢構成バランスの変化を引き起こす機構を解明することとした。我々はそのための作業仮説として胆汁酸の関与を推定した。なぜなら、胆汁酸は強い殺菌活性を持ち、高脂肪食摂取により分泌量が増大するため、高脂肪食摂取時に腸内細菌に対する選択圧として作用することが予想されたためである。胆汁酸の殺菌活性は古くから知られていたが、これが腸内細菌叢全体にどのような影響を与えているかについては、後述する我々の先行研究まで一世紀以上にわたって検討すらされていなかった。

ここで胆汁酸について簡単に説明する。胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、十二指腸に胆汁の主成分として分泌されるステロイド化合物であり、24位の炭素がカルボキシル基であるコラン酸を基本骨格としている。ヒトでは肝臓でコール酸 (CA) とケノデオキシコール酸 (CDCA) が合成され (各胆汁酸の構造式は Fig. 1

に示した)、これらは最終的に24位のカルボキシル基にタウリンあるいはグリシンがアミド結合した抱合胆汁酸として胆汁の構成成分となる。胆汁酸はその強い界面活性作用により小腸で食事の脂質や脂溶性ビタミン成分を乳化し、それらの消化吸収を補助する役割を担っている。高脂肪食を摂取すると、その分余分に胆汁酸が必要になるので、より多量の胆汁酸が分泌される。役目を終えた抱合胆汁酸は腸管循環により、小腸下部から再吸収され肝臓に戻される。しかし、ごく一部 (全体の5%) の胆汁酸は大腸へ流入し糞便と共に体外へ排泄される。こ



Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Cholic acid (CA)	$\alpha$ OH	H	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	$\alpha$ OH	H	$\alpha$ OH	H
Deoxycholic acid (DCA)	$\alpha$ OH	H	H	$\alpha$ OH
Ursocholic acid (UCA)	$\alpha$ OH	H	$\beta$ OH	$\alpha$ OH
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	$\alpha$ OH	H	$\beta$ OH	H
7-oxo-deoxycholic acid (7-oxo-DCA)	$\alpha$ OH	H	=O	$\alpha$ OH
7-oxo-lithocholic acid (7-oxo-LCA)	$\alpha$ OH	H	=O	H
12-oxo-lithocholic acid (12-oxo-LCA)	$\alpha$ OH	H	H	=O
3-oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (3-oxo-12 $\alpha$ )	=O	H	H	$\alpha$ OH
$\alpha$ -muricholic acid ( $\alpha$ MCA)	$\alpha$ OH	$\beta$ OH	$\alpha$ OH	H
$\beta$ -muricholic acid ( $\beta$ MCA)	$\alpha$ OH	$\beta$ OH	$\beta$ OH	H
$\omega$ -muricholic acid ( $\omega$ MCA)	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	$\beta$ OH	H
$\lambda$ -muricholic acid ( $\lambda$ MCA)	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	H
Hyodeoxycholic acid (HDCA)	$\alpha$ OH	$\alpha$ OH	H	H

Fig. 1 Structures of the tested free bile acids.

E-mail: yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

共同研究者：吹谷 智 (北海道大学大学院農学研究院),  
林 哲也 (九州大学大学院医学研究院),  
小椋義俊 (九州大学大学院医学研究院),  
石塚 敏 (北海道大学大学院農学研究院),  
萩尾真人 (東洋大学生命科学部)

の間に胆汁酸は大腸内の腸内細菌によってまず脱抱合されてタウリンあるいはグリシンが外れ遊離胆汁酸になった後、さらにデオキシコール酸 (DCA) やリトコール酸 (LCA), オキソ型や  $\beta$  型の二次胆汁酸に変換される。遊離胆汁酸や二次胆汁酸は分子の疎水性が増大するため、一般に強い殺菌活性を示すようになる。これは胆汁酸がリン脂質から構成される細菌の細胞膜に作用して膜損傷を起こすためである。中でも二次胆汁酸とりわけ DCA の殺菌活性は極めて強力で、*Lactobacillus* や *Bifidobacterium* 属細菌を用いた試験では CA の約10倍の殺菌活性を有することが示されている (Kurdi *et al.*, 2006)。また、DCA の殺菌活性は動物モデルやヒトの腸内の生理濃度で発揮される。以上のことから我々は、高脂肪食を摂取すると大腸内の DCA 濃度が高まり、それが選択圧となって菌叢構成が変化するのではないかと想定し、上述の作業仮説に至ったものである。

事実、先行実験として我々はまず、胆汁酸が腸内細菌叢を制御する宿主因子であることを見出した (Islam *et al.*, 2011)。すなわち CA を添加した胆汁酸添加食をラットに与えたところ、糞便中の総胆汁酸量および DCA 量が増大し、盲腸内において *Firmicutes* 門の上昇および *Bacteroidetes* 門の減少が観察された。興味深いことに、これは高脂肪食を摂取させたマウスモデルにおける変化 (Hildebrandt *et al.*, 2009; Turnbaugh *et al.*, 2008, 2009) と類似しており、両モデルで *Clostridia* 綱や *Erysipelotrichi* 綱の増加が観察されている。以上の結果から、我々は高脂肪食摂取による菌叢バランスの崩壊要因は、胆汁酸による選択圧の増大であることを強く確信し、これを「胆汁酸仮説」として提唱した (Yokota *et al.*, 2012)。今回の助成研究の目的は「胆汁酸仮説」を証明することである。本仮説が証明できれば、菌叢変化と肥満やメタボリックシンドロームなどの病態発症との因果関係を解明する上で有益な視点となる可能性がある。

本助成研究では、ラットを用いた動物試験により本仮説の証明を試みた。検討の流れとして、まずマウスやラットなどの齧歯類モデルの腸内に存在する様々な胆汁酸分子種の腸内細菌への殺菌活性 (細胞毒性) を *in vitro* の実験で検討した。齧歯類では固有の一次胆汁酸分子種として CA や CDCA に加え、 $\alpha$ -ムリコール酸 ( $\alpha$ MCA) や  $\beta$ -ムリコール酸 ( $\beta$ MCA) が肝臓で合成され、腸内細菌により  $\omega$ -ムリコール酸 ( $\omega$ MCA) や  $\lambda$ -ムリコール酸 ( $\lambda$ -MCA)、ヒデオキシコール酸 (HDCA) などの二次胆汁酸に変換されるため、ヒトよりも多種多様な胆汁酸が存在する。これまでに胆汁酸の殺菌活性については、CA, DCA, CDCA, 7-oxo-DCA, 3 $\beta$ -DCA の腸内細菌等への作用が報告されている (Stacey & Webb, 1947; Floch *et al.*, 1972; Kurdi *et al.*, 2006; Devlin & Fischbach, 2015)

のみで、齧歯類に存在する MCA 分子種を含めた包括的な解析は行われていない。そこで本研究では、腸内細菌 *Bifidobacterium breve* JCM 1192<sup>T</sup> を指標菌として、ヒトや齧歯類に存在する14種の胆汁酸分子の殺菌活性を決定した。次にこれらの実験結果を踏まえてラットモデルによる高脂肪食投与試験を行い、菌叢変化と胆汁酸分泌の関連性を *in vivo* で解析することで、胆汁酸仮説の証明を試みた。

## 実験方法

### 試薬

コール酸ナトリウム (CA), デオキシコール酸ナトリウム (DCA) および CDCA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から、ウルソデオキシコール酸ナトリウム (UDCA) および 7-oxo-LCA は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan), ウルソコール酸 (UCA) は Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Dallas, TX, USA) からそれぞれ購入した。 $\alpha$ -MCA,  $\beta$ -MCA,  $\omega$ -MCA,  $\lambda$ -MCA, HDCA, 7-oxo-DCA, 12-oxo-LCA および 12 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-5 $\beta$ -cholanic acid (3-oxo-12 $\alpha$ ) は Steraloids, Inc. (Newport, RI, USA) から購入した。

### 細胞内 pH 測定による胆汁酸の細胞膜損傷能の予測

我々はこれまで、遊離胆汁酸の殺菌活性の機構は細胞膜損傷作用であることを明らかにしている (Kurdi *et al.*, 2006)。この研究において我々は遊離胆汁酸による細胞膜損傷を評価する効果的な手法を確立している。それは細胞膜を隔てた水素イオンの濃度勾配を、*B. breve* JCM 1192<sup>T</sup> の細胞内 pH を蛍光法により測定することにより経時的に追跡する方法である。この方法では、まず本菌をグルコースによりエネルギー的に活性化する。この時、解糖反応により生成された ATP がプロトンポンプを駆動して細胞外にプロトンを排出するので、細胞内が細胞外に比べて相対的にアルカリ性になり、細胞内外に pH 差 ( $\Delta$ pH) が確立される。続いて遊離胆汁酸を細胞外に与えると、非解離型の遊離胆汁酸は疎水性が強いため、細胞膜を容易に通過し細胞内でプロトンを放出して細胞内 pH を低下させる。これを繰り返すと最終的に  $\Delta$ pH が消失する。このとき水素イオン以外のイオンや代謝中間体が損傷した細胞膜を通して細胞外に漏出し、細胞死がおこる。従って  $\Delta$ pH を消去する遊離胆汁酸濃度を決定することで、その胆汁酸が本菌に対して毒性を発揮する濃度域を予測することができる。本実験系を用いて、これまで我々は DCA および CDCA が CA の 1/10 の濃度で  $\Delta$ pH を消失させること、すなわち DCA や CDCA は CA よりも10倍高い細胞膜損傷作用を示すことを明ら

かにしている。

細胞内 pH の測定試験は Kurdi *et al.* (2006) の方法に基づいて行った。 *B. brevis* JCM 1192<sup>T</sup> 株を 0.025% L-システイン塩酸塩を含む 1/2 MRS 培地 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) で 37°C で嫌氣的に一晩前培養した。菌体を接種したネジ口試験管を N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>=8:1:1 の混合ガスで置換することで嫌気条件にした。この前培養菌体を初期 OD<sub>660</sub> が 0.05 になるように同培地に接種し、本培養を行った。OD<sub>660</sub> が 0.6 付近に達するまで同条件で 37°C で嫌氣的に培養後、培養液を遠心分離して菌体を回収した。Buffer 1 (50 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 1 mM 硫酸マグネシウム, 0.1 U/ml 西洋わさびペルオキシダーゼ) にて遠心洗浄後、Buffer 2 (150 mM リン酸カリウム (pH 6.5), 1 mM 硫酸マグネシウム, 1.0 U/ml 西洋わさびペルオキシダーゼ) にて OD<sub>660</sub> が 0.5 となるように懸濁した。細胞懸濁液に膜透過性の pH プローブ (5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (5(6)-CFDA-SE) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を終濃度 4 μM となるように添加後、37°C で 30 min 培養してプローブを細胞内に導入した。遠心分離後、Buffer 2 にて再懸濁し、グルコースを終濃度 10 mM となるように添加して 37°C で 1 時間培養することで、細胞内に結合しなかったプローブを細胞外に排出させた。細胞懸濁液を遠心分離後、Buffer 2 にて遠心洗浄した。等量の Buffer 2 にて再懸濁後、氷冷で保持して細胞内 pH 測定に供した。石英キュベットに調製した細胞懸濁液 2 mL を添加後、蛍光光度計 (PerkinElmer LS-50B) を用いて細胞内の蛍光強度を測定した。測定の際には、スターラーバーで攪拌しながら 37°C で保持し、混合ガス (100~200 mL/min) を流した。蛍光強度が安定後、グルコースを終濃度 10 mM になるように添加した。蛍光強度が安定後、各胆汁酸を蛍光強度が変化しなくなるまで添加した。20 μM Valinomycin 2 μL (膜電位 ΔΨ を除去) および 0.2 mM Nigericin 2 μL (ΔpH を除去) を添加し、ΔpH の消失を確認した。測定終了ごとに各 pH における蛍光強度を測定し、検量線を作成し、それを用いて細胞内 pH を求めた。

#### 細胞膜損傷試験

細胞膜損傷試験は Kurdi *et al.* (2006) の方法に基づいて行った。細胞内 pH 測定試験と同様の方法で菌体を培養後、遠心分離により菌体を回収し、Buffer 2 にて遠心洗浄した。Buffer 2 にて OD<sub>660</sub> が 0.3 となるように懸濁後、グルコース (終濃度 10 mM) および各種胆汁酸を添加して 37°C で 1 時間および 3 時間培養した。細胞懸濁液を回収して遠心分離後、等量の Buffer 2 にて再懸濁し

た。LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific) の SYTO9 と PI を等量混合した染色液を加えて 37°C で 15 min 保持した。蛍光光度計を使用して 480 nm で励起後、500–530 nm の面積 (Live area) と 620–650 nm の面積 (Dead area) を測定し、Live/Dead 比を算出した。各時間の未処理の Live/Dead 比を基準値として、各培養時間における membrane integrity (%) を算出した。

#### 生残率測定試験

生残率測定試験は Kurdi *et al.* (2006) の方法に基づいて行った。細胞膜損傷試験と同様の方法で調製した細胞懸濁液 100 μL を回収してプレートに添加し、0.025% システイン塩酸塩を含む 1/2 MRS 培地を加えて混濁培養を行った。嫌気パウチを入れたアネロバックを用いて 48 時間以上嫌気培養した。各時間の未処理サンプルの CFU を生残率 100% として、各培養時間における生残率を算出した。

#### 動物実験

3 週齢の雄 SD ラットおよび WKAH/Hkm Slc ラットを用いて、デキストリン食による 2 週間の予備飼育後、2 群 (n=5~6) に分け、それぞれにデキストリン食あるいはデキストリン食に 23% のラードを添加したデキストリン-高ラード食を与えて、8 週間の長期投与試験を行った (それぞれ対照群, HL 群)。食事の組成は Table 1 に示した。盲腸内容物を採取後、LC/MS を用いた胆汁酸分析およびメタ 16S 菌叢解析を行った。この

**Table 1** Compositions of control diet and HL diet.

Ingredient	g/kg diet	
	Control diet <sup>a</sup>	HL diet <sup>b</sup>
Dextrin	529.5	299.5
Casein	200.0	200.0
Sucrose	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0
Lard	-	230.0
Mineral mixture	35.0	35.0
Vitamin mixture	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0
Choline chloride	2.5	2.5
Cellulose	50.0	50.0

<sup>a</sup> Standard (Control) diet consisted mainly of dextrin.

<sup>b</sup> High-lard (HL) diet prepared by adding 230 g/kg lard to the standard diet at the expense of dextrin.

間、体重、摂食量、肝臓および脂肪重量などの宿主の基礎データを取得した。

#### LC/MS を用いた胆汁酸分析

胆汁酸分析は Hagio *et al.* (2009) の方法に基づいて行った。盲腸内容物 200 mg にエタノールとノルデオキシコール酸（終濃度 1  $\mu$ M）を内部標準として加えた。攪拌後、60  $^{\circ}$ C で 30 分、85  $^{\circ}$ C で 3 分間加熱した。遠心分離後、上清を回収して遠心濃縮した。上清の回収を 3 回繰り返した後、メタノールに懸濁し固相抽出カラムにて精製した。遠心濃縮後、メタノールに懸濁し、盲腸内容物中の胆汁酸量を LC/MS (Waters Quattro Premier XE tandem quadrupole mass spectrometer) で定量した。

#### メタ 16S 菌叢解析

DNA 抽出は Yu & Morrison (2004) の方法に基づいて行った。盲腸内容物 100 mg を Washing Buffer (200 mM Tris-HCl, 80 mM EDTA-2Na, pH 9.0) にて洗浄後、滅菌ビーズ（直径 0.1 mm）と Lysis buffer (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 4% SDS, pH 8.0) を加えてビーズショッカーにより菌体破碎した。遠心分離後、上清を酢酸アンモニウム処理後、遠心して上清を回収し、RNase A を終濃度 100  $\mu$ g/mL となるように添加して 37  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。フェノールクロロホルムおよびエタノール沈殿により精製後、TE buffer に溶解した。分光光度計にて DNA 濃度を測定し、電気泳動にてバンドを確認した。

細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅後、宮崎大学フロンティア科学実験総合センターにおいてメタ 16S 菌叢解析を行った。シーケンスには Roche diagnostics 社の 454 GS Junior を使用し、解析ソフトウェア QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) を用いてメタ 16S 菌叢解析を行った。SD ラットでは平均 7168 リードの配列が決定され、総計 78850 リードの配列を取得し、WKAH ラットでは平均 10330 リードの配列が決定され、総計 113637 リードの配列を取得した。

#### 盲腸内容物からの腸内細菌の分離と同定

胆汁酸耐性もしくは胆汁酸感受性を有する腸内細菌を分離するため、盲腸内容物を PBS (140 mM NaCl, 7.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.2) にて希釈後、1 mM DCA を添加もしくは無添加の 2  $\mu$ g/ml コリスチン含有 EG 寒天培地および *Brucella* 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) 寒天培地に接種し、 $\text{N}_2 : \text{CO}_2 : \text{H}_2 = 8 : 1 : 1$  の混合ガスで置換した嫌気チャンバーにて 37  $^{\circ}$ C で 4 日間嫌気培養した。生育した各コロニーを GAM (日本製薬:東京) -0.1 M MOPS (pH 7.0)

液体培地に接種し、嫌気チャンバーにて 37  $^{\circ}$ C で 2 日間嫌気培養した。アルカリボイル法により培養液より DNA を抽出後、前述のメタ 16S 菌叢解析と同じ方法により 16S rRNA 遺伝子シーケンスを行った。

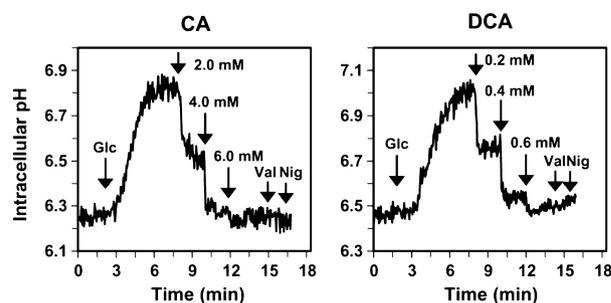
#### DCA 耐性試験

胆汁酸を含まない GAM-0.1 M MOPS 培地 (pH 7.0) 5 mL に各分離株を接種し、嫌気チャンバーにて 37  $^{\circ}$ C で嫌氣的に一晩前培養を行った。初期  $\text{OD}_{660} = 0.05$  になるように 0, 0.5, 0.75, 1.0 および 1.5 mM DCA を含む GAM-0.1 M MOPS 培地 5 mL に接種し同様の条件下で培養した。経時的に菌未接種の培地をブランクとして  $\text{OD}_{660}$  を測定した。0 mM DCA の対数増殖後期もしくは定常期の培養液の  $\text{OD}_{660}$  を 50% に低下させる DCA 濃度を  $\text{IC}_{50}$  値として算出した。

### 結果および考察

#### 細胞内 pH 測定による胆汁酸の細胞膜損傷能の予測

本研究ではこの実験系を用いてオキソ型や  $\beta$  型もしくは MCA を含むヒトや齧歯類に存在する 14 種類の胆汁酸分子の細胞膜損傷能を網羅的に評価した。Fig. 1 にはそれらの構造を示した。また、Fig. 2 には代表例として CA および DCA の細胞内 pH の測定結果を示した。その結



**Fig. 2** Effects of free bile acid on the intracellular pH of *Bifidobacterium breve* JCM 1192<sup>T</sup>. Internal pH measurements were conducted by fluorescence method using 5(6)-CFDA-SE. After cells were cultured until mid-exponential phase in 1/2 MRS medium containing 0.025% L-cysteine, harvested cells were preloaded with 5(6)-CFDA-SE and energized with 10 mM glucose (indicated as "Glc") in Buffer 2 (pH 6.5) to build up  $\Delta$ pH. The free bile acid was then added at the indicated final concentrations. Valinomycin (Val) and nigericin (Nig) were added to confirm complete dissipation of membrane potential and  $\Delta$ pH, respectively. The pH values were calculated based on the calibration curve created by measuring the fluorescence intensity of the deenergized cells at pH values between 6 and 8.

果、次に示す8種類の胆汁酸において  $\Delta$ pH の完全な消失が認められた (括弧内はそれぞれの  $\Delta$ pH 消失濃度を示す): DCA(0.6 mM), CDCA(0.6 mM), HDCA(2.0 mM), 3-oxo-12 $\alpha$ (2.0 mM),  $\beta$ MCA( $\sim$ 2.5 mM),  $\lambda$ MCA(3.0 mM), 12-oxo-LCA(4.0 mM), CA(4.0 $\sim$ 6.0 mM). 一方で次に示す胆汁酸では  $\Delta$ pH は顕著に低下したが、括弧内に示す添加濃度以上で沈殿が認められたため、それ以上の添加は行わなかった:  $\omega$ MCA(0.15 mM), 7-oxo-LCA(1.5 mM), UDCA(2.0 mM), また、次の胆汁酸では試験した濃度範囲で沈殿は起こらなかったが、 $\Delta$ pH 低下作用が極めて弱く、 $\Delta$ pH に殆ど影響を与えなかった (括弧内は試験した最大濃度を示す):  $\alpha$ MCA(5 mM), 7-oxo-DCA(10 mM), UCA(3 mM). これらの結果から、 $\omega$ MCA がこれまで最も強力な殺菌活性を持つと考えられていた DCA や CDCA よりもさらに10倍程度強い細胞膜損傷作用を有

すること、HDCA, 3-oxo-12 $\alpha$ ,  $\beta$ MCA, 7-oxo-LCA,  $\lambda$ MCA, 12-oxo-LCA および UDCA が DCA, CDCA と CA の間の中程度の細胞膜損傷作用を示すこと、また  $\alpha$ MCA, 7-oxo-DCA および UCA は細胞膜損傷作用を殆ど示さないこと、などが予測された。

#### *B. breve* JCM 1192<sup>T</sup> に対する胆汁酸の細胞膜および生残率への影響

上述の各胆汁酸分子種の  $\Delta$ pH 消失濃度に基づいて、Live/Dead 染色法による細胞膜損傷解析および生残率測定試験を行った。その結果、14種類中8種類の胆汁酸において  $\Delta$ pH 消失濃度付近で高い細胞膜損傷作用および大幅な生残率の低下が認められた (括弧内の数値は生残率が20%以下に低下する濃度を示す) (Table 2には代表例としてCAおよびDCAの結果を示した): DCA

**Table 2** Membrane integrity and viability of *B. breve* JCM 1192<sup>T</sup> upon exposure to free bile acids.

Bile acid (mM)	Membrane integrity (%) <sup>a</sup>		Viability (%) <sup>b</sup>	
	1 h	3 h	1 h	3 h
CA				
0.1	93.01	101.44	84.76	101.81
1	87.42	92.27	81.40	91.65
2	66.94	63.60	66.11	53.80
4	40.45	43.46	41.79	26.55
6	34.59	23.59	40.17	18.22
8	23.15	9.62	19.67	6.20
10	12.01	4.52	9.25	0.84
12	6.22	4.78	2.67	0.09
DCA				
0.01	118.50	92.85	106.77	99.54
0.1	125.23	101.44	90.51	96.60
0.2	91.73	87.75	77.72	81.84
0.4	77.21	66.14	39.77	31.24
0.6	6.38	4.07	1.12	0.29
0.8	5.43	6.72	$2.07 \times 10^{-4}$	$1.15 \times 10^{-5}$

Data are means of two independent experiments that gave similar results.

<sup>a</sup> Cells were cultured until mid-exponential phase in 1/2 MRS medium containing 0.025% L-cysteine and harvested cells were washed with Buffer 2 and re-suspended in the same buffer. After this cell suspension was incubated with the free bile acid at the indicated concentrations for 1 h or 3 h, membrane integrity was monitored using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit.

<sup>b</sup> The same cell suspension as that used for the measurement of the membrane integrity was appropriately diluted to monitor its viability by pour plate method using 1/2 MRS agar plates containing 0.025% L-cysteine.

(0.6 mM), CDCA (0.6 mM),  $\beta$ MCA (1.0 mM), HDCA (1.0 mM), 3-oxo-12 $\alpha$  (1.0 mM),  $\lambda$ MCA (3.0 mM), 12-oxo-LCA (2.0 mM), CA (6.0~8.0 mM). また、次の3種類の胆汁酸については最大溶解濃度(括弧内の数値)において高い細胞膜損傷作用を示し、生残率が20%以下に減少した： $\omega$ MCA (0.08 mM), 7-oxo-LCA (1.5 mM), UDCA (2.0 mM). 一方で、細胞内 pH 試験で弱い細胞毒性を示した次の胆汁酸では、括弧内に示す添加濃度において細胞膜損傷および生残率の低下はほとんど認められなかった： $\alpha$ MCA (2.0 mM), 7-oxo-DCA (10 mM), UCA (3.0 mM). このように、試験した胆汁酸分子種が細胞膜を損傷する濃度と生残率を低下させる濃度が一致することから、これまで報告されている胆汁酸の殺菌メカニズムは、CA や DCA などの  $\alpha$  型の胆汁酸だけでなく、 $\beta$  型やオキソ型の胆汁酸、またラットに存在する MCA にも適用できることが明らかとなった。生残率測定試験に基づき、胆汁酸の殺菌活性を5段階に区分した一覧表を Table 3 に示した。これらの結果より、試験した胆汁酸の中で  $\omega$ MCA が最も高い殺菌活性を示すこと、 $\alpha$  型の胆汁酸 (CA, DCA および CDCA) は  $\beta$  型の胆汁酸 (UCA および UDCA) やオキソ型の胆汁酸 (7-oxo-DCA, 3-oxo-12 $\alpha$ , 12-oxo-LCA および 7-oxo-LCA) よりも高い殺菌活性を示

**Table 3** Classification of human and rodent free bile acids according to their bactericidal activities on *B. breve* JCM 1192<sup>T</sup> cells.

Free bile acid	Concentration for viability loss (mM) <sup>a</sup>
$\omega$ MCA	$\leq 0.08$
DCA	0.6
CDCA	
HDCA	
3-oxo-12 $\alpha$	1.0~2.0
$\beta$ MCA	
7-oxo-LCA	
UDCA	3.0~6.0
$\lambda$ MCA	
CA	
$\alpha$ MCA	$\geq 6$
7-oxo-DCA	
UCA	

<sup>a</sup> Based on the results of viability test in Table 2, "Concentration for viability loss (mM)" was defined as the free bile acid concentration that gave a viability < 20% of that of the untreated cells after exposure to the free bile acid for 3 h.

すことが明らかになった。

Hagio *et al.* (2011) は6週齢の DA/Slc ラットを通常食で7週間飼育したときの糞便中の各胆汁酸濃度を測定している。そこで、本試験により明らかにした各胆汁酸の殺菌活性を示す濃度と糞中に存在する濃度(括弧内)とを比較したところ、 $\omega$ MCA (2.79 $\pm$ 0.80 mM), DCA (0.58 $\pm$ 0.14 mM),  $\beta$ MCA (0.60 $\pm$ 0.17 mM) および HDCA (1.96 $\pm$ 0.63 mM) が生理的濃度で強い細胞毒性を示す胆汁酸であることが示唆された。すなわちラットの盲腸内では、 $\omega$ MCA, DCA,  $\beta$ MCA および HDCA が *in vivo* において菌叢変化の選択圧として寄与していると予想された。

### 動物試験

次に胆汁酸仮説を検証するため、SD ラットと WKAH ラットの2種類のラットを用い、通常食(対照群)もしくは高ラード食(HL 群)を投与した8週間の長期高脂肪食投与試験を行った。8週飼育後の体重はSD ラットでは対照群に比べてHL 群で有意に増加したが(469.92 $\pm$ 7.21 $\Rightarrow$ 534.18 $\pm$ 19.22 g), WKAH ラットでは対照群と HL 群間で有意差はなかった(348.00 $\pm$ 10.22 $\Rightarrow$ 355.28 $\pm$ 13.88 g)。摂食量は両ラットともに対照群と比較してHL 群で有意に減少した(SD : 1419.18 $\pm$ 26.53 $\Rightarrow$ 1282.52 $\pm$ 33.81 g, WKAH : 1014.29 $\pm$ 51.30 $\Rightarrow$ 750.22 $\pm$ 23.07 g)。一方で、肝臓重量は両ラットともに対照群と HL 群で有意な差を示さず(SD : 4.25 $\pm$ 0.16 $\Rightarrow$ 4.03 $\pm$ 0.14 g/100 g body weight, WKAH : 3.43 $\pm$ 0.44 $\Rightarrow$ 3.51 $\pm$ 0.09 g/100 g body weight), 脂肪組織重量も対照群と HL 群で増加したものの有意な差を示さなかった(SD : 2.29 $\pm$ 0.20 $\Rightarrow$ 2.94 $\pm$ 0.35 g/100 g body weight, WKAH : 2.68 $\pm$ 0.16 $\Rightarrow$ 2.87 $\pm$ 0.10 g/100 g body weight)。一方で、肝臓にはいずれのラットにおいてもHL 群で脂肪の蓄積が認められ、脂肪肝の症状が観察された(data not shown)。

### 胆汁酸組成分析

LC/MSにて盲腸内胆汁酸濃度を測定した結果を Table 4 に示した。SD ラットでは対照群と比べHL 群で総胆汁酸濃度の有意な変化は観察されなかった(対照群: 2.026 $\pm$ 0.215 $\Rightarrow$ HL 群: 2.572 $\pm$ 0.093  $\mu$ mol/g)。また生理濃度で殺菌活性を示す胆汁酸については、DCA および  $\beta$ MCA で増加傾向が認められるもの(DCA, 対照群: 0.585 $\pm$ 0.058 $\Rightarrow$ HL 群: 0.746 $\pm$ 0.091  $\mu$ mol/g) ( $\beta$ MCA, 対照群: 0.493 $\pm$ 0.056 $\Rightarrow$ HL 群: 0.595 $\pm$ 0.058  $\mu$ mol/g), 殺菌活性の強い  $\omega$ MCA は顕著な変化を示さなかった(対照群: 0.433 $\pm$ 0.087 $\Rightarrow$ HL 群: 0.477 $\pm$ 0.131  $\mu$ mol/g)。一方で、WKAH ラットでは対照群と比べHL 群で総胆汁酸濃度の有意な増加が認められ(1.336 $\pm$ 0.264 $\Rightarrow$ 3.210 $\pm$ 0.566  $\mu$ mol/g),  $\omega$ MCA, DCA および  $\beta$ MCA の増加傾

**Table 4** Effect of high-fat diet feeding on cecal bile acid composition in SD and WKAH rats.

Bile acid	SD rat		WKAH rat	
	Control	HL	Control	HL
CA	0.021 ± 0.006	0.096 ± 0.061	0.039 ± 0.012	0.668 ± 0.174*
DCA	0.585 ± 0.058	0.746 ± 0.091	0.318 ± 0.077	0.481 ± 0.081
βMCA	0.493 ± 0.056	0.595 ± 0.058	0.333 ± 0.080	0.770 ± 0.178
ωMCA	0.433 ± 0.087	0.477 ± 0.131	0.412 ± 0.086	0.653 ± 0.124
HDCA	0.006 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.005 ± 0.001
Others	0.488 ± 0.042	0.652 ± 0.020*	0.230 ± 0.035	0.634 ± 0.105*
Total	2.026 ± 0.215	2.572 ± 0.093	1.336 ± 0.264	3.210 ± 0.566*

After SD and WKAH rats were continuously fed Control or HL diets for 8 weeks, cecal bile acid composition was analyzed using LC/MS. Each value represents mean ± SEM (n = 5-6). \* $p < 0.05$  vs control group.

向が観察された ( $\omega$ MCA, 対照群:  $0.412 \pm 0.086 \Rightarrow$  HL 群:  $0.653 \pm 0.124 \mu\text{mol/g}$ ) (DCA, 対照群:  $0.318 \pm 0.077 \Rightarrow$  HL 群:  $0.481 \pm 0.081 \mu\text{mol/g}$ ) ( $\beta$ MCA, 対照群:  $0.333 \pm 0.080 \Rightarrow$  HL 群:  $0.770 \pm 0.178 \mu\text{mol/g}$ ). この結果より, 対照群と HL 群間の  $\omega$ MCA, DCA および  $\beta$ MCA 総濃度の変化は SD ラットよりも WKAH ラットにおいてより大きいことが示された. 対照群と HL 群間の胆汁酸濃度の変化が, SD ラットと WKAH ラットにおいて異なる理由については不明であるが, WKAH ラットは近交系であることが影響しているかもしれない.

#### 腸内細菌叢解析

SD および WKAH ラットの盲腸内容物から DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅後, メタ 16S 菌叢解析を行った. その結果, SD ラットでは *Firmicutes* 門の割合や *Bacteroidetes* 門の割合は群間で差異は認められなかった (*Firmicutes* 門, 対照群:  $58.82 \pm 4.33 \Rightarrow$  HL 群:  $62.18 \pm 5.25\%$ ) (*Bacteroidetes* 門: 対照群  $33.92 \pm 3.99 \Rightarrow$  HL 群:  $32.10 \pm 4.72\%$ ). また, 属レベルにおいても *Firmicutes* 門細菌の上昇および *Bacteroidetes* 門細菌の有意な減少は認められなかった (data not shown). 一方, WKAH ラットでは *Firmicutes* 門の割合が有意に上昇し, *Bacteroidetes* 門の割合が有意に減少した (*Firmicutes* 門, 対照群:  $31.22 \pm 1.89 \Rightarrow$  HL 群:  $76.77 \pm 5.36\%$ ) (*Bacteroidetes* 門, 対照群:  $59.00 \pm 1.89 \Rightarrow$  HL 群:  $19.42 \pm 4.98\%$ ). 属レベルにおいても *Firmicutes* 門の *Blautia* 属が有意に増加し, *Bacteroidetes* 門の *Bacteroides* 属および *Parabacteroides* 属が有意に減少した (data not shown). これらの結果より, 高脂肪食摂取により腸内の胆汁酸濃度が増加する WKAH ラットでは菌叢変化が認められ, 胆汁酸濃度の

増加が少ない SD ラットでは菌叢変化が認められないことが明らかになった. すなわち, ラットの系統の差をこえて胆汁酸濃度の変動が菌叢変化に結びつく可能性が示唆された. WKAH ラットについて operational taxonomic unit (OTU) 解析を行ったところ, 1 ラットあたりの対照群と HL 群の総リード数が 10 リード以上の OTU は 71 個存在した. その中で対照群より HL 群において増加する *Firmicutes* 門に属する OTU は 39/48 個であり, そのうち有意に増加する OTU は 15 個存在した. 一方で, 対照群より HL 群において減少する *Bacteroidetes* 門に属する OTU は 20/23 個であり, そのうち有意に減少する OTU が 12 個存在した. この結果より, 高脂肪食摂取による胆汁酸濃度の増大により, 存在比が変化した OTU が数多く検出され, 胆汁酸が門さらには属を超え, OTU レベルで菌叢構成に影響する可能性が示唆された.

本試験では腸内細菌叢の変動と肥満との関連性は認められなかった. 菌叢変化による宿主への影響について, 遺伝的に過食性のマウス (ob/ob) では腸内細菌叢が門レベルで変化し, *Bacteroidetes* 門に対する *Firmicutes* 門の比率 (F/B) が増大すること (Turnbaugh *et al.*, 2006), 肥満のヒトを脂質制限低カロリーダイエット食により減量させたところ, 腸内細菌叢の F/B 比が低下して痩せ形のヒトの F/B 比に近づいたこと (Ley *et al.*, 2006), 野生型マウスに高脂肪食を与えて肥満を誘起すると腸内細菌叢の F/B 比が増大すること (Turnbaugh *et al.*, 2008), など, 肥満と F/B 比の増大が相関することが示されている. 本試験では 8 週間の投与試験により解析を行ったが, WKAH ラットではさらに長期の高脂肪食摂取により肥満になることが判明している (unpublished data). 今後, 肥満時のラットの菌叢構成を明らかにすることで,

菌叢変化と肥満の因果関係が明らかになると思われる。

#### 高脂肪食摂取により選択される特徴的な腸内細菌の分離

上記の解析により、高脂肪食摂取により盲腸内胆汁酸濃度と盲腸内細菌叢の変化が観察されたが、*Firmicutes* 門が *Bacteroidetes* 門に比べて優勢になる理由は明らかでない。そこで高脂肪食摂取により増減を示す *Firmicutes* 門および *Bacteroidetes* 門の OTU に対応する腸内細菌の分離を試みた。盲腸内容物を PBS に懸濁後、コリスチンを添加した EG および *Brucella* 寒天培地にて培養した。生育した約 700 コロニーについて、コリスチンを添加した GAM+MOPS 培地にて液体培養後、生育が認められた約 300 株について 16S rRNA 遺伝子のシーケンス (V3-V4 領域) を行った。同定した部分配列をもとにメタ 16S 菌叢解析の OTU に帰属させたところ、対照群より HL 群で増加する *Firmicutes* 門細菌として *Blautia gluceracea* (OTU1564), *Clostridium symbiosum* (OTU517), *Clostridium hathewayi* (OTU1049), *Lactobacillus taiwanensi* (OTU517), *Ruminococcus gnavus* (OTU218), *Eisenbergiella tayi* (OTU85) および *Clostridium orbiscindens* (OTU1288) を同定し、対照群より HL 群で減少する *Bacteroidetes* 門細菌として *Bacteroides sartorii* (OTU1353), *Parabacteroides distasonis* (OTU214), *Bacteroides acidifaciens* (OTU1528), *Bacteroides nordii* (OTU86) を同定した。

#### DCA 耐性試験

*Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門の分離株において胆汁酸耐性に違いがあるかを検証するため、*in vitro* における DCA 耐性試験を行い、50% 生育阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。その結果、7 種の *Firmicutes* 門細菌 [*B. gluceracea* (OTU1564), *C. symbiosum* (OTU517), *C. hathewayi* (OTU1049), *L. taiwanensi* (OTU517), *R. gnavus* (OTU218), *E. tayi* (OTU85) および *C. orbiscindens* (OTU1288)] の IC<sub>50</sub> 値 (0.6~1.5 mM) は 3 種の *Bacteroidetes* 門細菌 [*B. sartorii* (OTU1353), *P. distasonis* (OTU214), *B. nordii* (OTU86)] の IC<sub>50</sub> 値 (0.3~0.5 mM) に比べて有意に 2~5 倍の高い値を示した。*Bacteroidetes* 門細菌の IC<sub>50</sub> 値は高脂肪食摂取において増加する DCA 濃度 (0.481 mM) で十分に生育阻害される濃度である。本結果は高脂肪食摂取により *Firmicutes* 門細菌が優勢になることと矛盾せず、胆汁酸耐性の違いが菌叢変化に寄与することが明らかになった。

#### 胆汁酸組成と腸内細菌叢の組成の相関

ラットの個体別の胆汁酸濃度と腸内細菌の盲腸内存在比との関連性を検討するため、盲腸内濃度が殺菌活性を示す濃度に達している  $\omega$ MCA, DCA および  $\beta$ MCA の胆汁酸濃度の総和と、*Firmicutes* 門細菌および *Bacteroidetes*

門細菌の各 OTU の存在比との相関解析をおこなった。その結果、*Firmicutes* 門の *C. hathewayi* (OTU1049) ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.483$ ) および *L. taiwanensi* (OTU517) ( $p < 0.01$ ,  $R^2 = 0.728$ ) の 2 株において正の相関が認められ、*Bacteroidetes* 門の *B. acidifaciens* (OTU1528) ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.313$ ) において負の相関が認められた。

#### 胆汁酸添加食投与試験との比較

我々は先行研究において、スクロースを糖原とした胆汁酸 (CA) 添加食をラットに投与し、いくつかの OTU に属する菌株が異常増殖することを報告している (Islam *et al.*, 2011)。そこで本試験の高脂肪食投与試験と先行実験の胆汁酸添加食投与試験の結果を比較したところ、*B. gluceracea* (OTU1564) および *C. symbiosum* (OTU517) が胆汁酸添加食においても盲腸内で増加し、*P. distasonis* (OTU214) および *B. acidifaciens* (OTU1528) が減少することが判明した。高脂肪食投与によって増減する複数の菌株が胆汁酸投与においても一致した挙動を示すことから、胆汁酸に対する耐性度が相対的に強い *Firmicutes* 門の細菌が胆汁酸による選択圧を駆動力として腸内細菌叢で優勢になるものと推測され、「胆汁酸仮説」が成立するものと結論づけた。

## 要 約

ヒトやげっ歯類に存在する 14 種類の胆汁酸について *B. breve* JCM 1192<sup>T</sup> を指標菌として毒性試験を行い、全ての胆汁酸の殺菌活性を明らかにすると共に、 $\omega$ MCA がこれまで殺菌性が強いと考えられていた DCA や CDCA よりも約 10 倍強い殺菌活性を示すことを見出した。胆汁酸のラット盲腸内の生理濃度と殺菌活性との比較により、*in vivo* では DCA に加え  $\omega$ MCA や  $\beta$ MCA, HDCA が菌叢制御に関与している可能性が示唆された。ラットを用いた高脂肪食投与試験を行い、WKAH ラットでは対照群に比べて HL 群において、DCA に加え  $\omega$ MCA や  $\beta$ MCA さらに総胆汁酸濃度が増大し、*Bacteroidetes* 門細菌に対する *Firmicutes* 門細菌の比が顕著に増大した。盲腸内容物の菌叢解析により、HL 群において有意に増減する OTU が検出された。盲腸内容物より多数の菌株を分離し、16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定し、菌叢解析の OTU に帰属させた。その結果、HL 群において有意に増加する OTU に対応する株として *Firmicutes* 門では *Blautia*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eisenbergiella* および *Lactobacillus* 属細菌を、減少する OTU に対応する株として *Bacteroidetes* 門細菌では *Bacteroides* および *Parabacteroides* 属細菌をそれぞれ同定した。分離株について DCA 耐性試験を行ったところ、*Firmicutes* 門細菌の IC<sub>50</sub>

は *Bacteroidetes* 門細菌の IC<sub>50</sub> に比べて有意に高い値を示し、前者は後者よりも高い DCA 耐性を有することが判明した。ラットの個体別で見た DCA, ωMCA, βMCA 総濃度に対するこれらの OTU 存在比においても、*Clostridium* および *Lactobacillus* 属細菌の二つの OTU では正の相関が、*Bacteroides* 属細菌の一つの OTU では負の相関が見られた。先行研究の胆汁酸添加食投与試験との比較により、分離株の中で *B. gluceracea* および *C. symbiosum* に相当する OTU が高脂肪食および胆汁酸添加食で共に増加し、*P. distasonis* および *B. acidifaciens* に相当する OTU が共に減少することが判明した。これらの結果は「胆汁酸仮説」を強く支持しており、菌叢制御因子として胆汁酸が重要な役割を果たすことが示唆された。

### 本助成で得られた研究成果の報告

#### 口頭発表

- 1) 渡辺真通, 萩尾真人, 藤田祐己, 李 慈英, 馬場菜那子, 小椋義俊, 林 哲也, 清水英寿, 石塚 敏, 吹谷 智, 横田 篤. 2015. 高脂肪食摂取がラット盲腸内容物の胆汁酸分泌および菌叢変化に与える影響. 日本農芸化学会 2015年度大会 (岡山)
- 2) 渡辺真通, 吹谷 智, 横田 篤. 2015. *Bifidobacterium breve* JCM 1192<sup>T</sup> を指標菌としたラット腸内に存在する胆汁酸分子種の細胞毒性評価. 日本農芸化学会北海道支部会2015年度大会 (札幌)
- 3) 渡辺真通, 萩尾真人, 李 慈英, 小椋義俊, 林 哲也, 清水英寿, 石塚 敏, 吹谷 智, 横田 篤. 2016. 高脂肪食ラットの盲腸内菌叢の変化における腸内細菌の胆汁酸耐性の寄与. 日本農芸化学会2016年度大会 (札幌)
- 4) 渡辺真通, 萩尾真人, 李 慈英, 小椋義俊, 林 哲也, 清水英寿, 石塚 敏, 吹谷 智, 横田 篤. 2016. 高脂肪食摂取ラットの盲腸内菌叢の変化における胆汁酸の寄与: 「胆汁酸仮説」の証明にむけて. 第20回腸内細菌学会 (東京)

### 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深く感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり多大なご尽力をいただいた北海道大学大学院農学研究院連携研究部門特任助教の渡辺真通先生に深謝致します。

### 文 献

- Devlin, A. S. & Fischbach, M. A. 2015. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat. Chem. Biol.* **11**: 685–690.
- Floch, M. H., Binder, H. J., Filburn B. & Gershengoren, W. 1972. The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1418–1426.
- Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H. & Ishizuka, S. 2009. Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS. *J. Lipid. Res.* **50**: 173–180.
- Hagio, M., Matsumoto, M. & Ishizuka, S. 2011. Bile acid analysis in various biological samples using ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC/ESI-MS). *Methods Mol. Biol.* **708**: 119–129.
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F. & Wu, G. D. 2009. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* **137**: 1716–1724.
- Islam, K. S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T. & Yokota, A. 2011. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* **141**: 1773–1781.
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K. & Yokota, A. 2006. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J. Bacteriol.* **188**: 1979–1986.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022–1023.
- Stacey, M. & Webb, M. 1947. Studies on the antibacterial properties of the bile acids and some compounds derived from cholic acid. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **134**: 523–537.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. & Gordon, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027–1031.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**: 213–232.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R. & Gordon, J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **1**: 6ra14.
- Yokota, A., Fukiya, S., Islam, K. S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Hagio, M. & Ishizuka, S. 2012. Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet? *Gut Microbes* **3**: 455–459.
- Yu, Z. & Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* **36**: 808–812.

## 難培養性アナモックス細菌の生理・生態学の 全容解明に向けてのポストゲノム解析

岡 部 聡

北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門

〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目

### Post-genome Research on Ecophysiology of Anaerobic Ammonium-oxidizing (Anammox) Bacteria

Satoshi Okabe

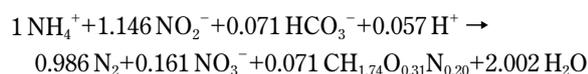
Division of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University  
North-13, West-8, Kita-ku, Sapporo Hokkaido, 060-8628, Japan

Anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria are ubiquitously distributed in natural and engineered ecosystems and significantly contributing to the global nitrogen cycle. So far, about 20 different anammox species divided over five genera have been proposed, but none of these are in pure culture. Although nitrogen metabolism of anammox bacteria have been studied using an enrichment culture of "*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis", those of other anammox bacteria are still poorly understood. Draft genome sequences have been determined for the members of "*Ca. Kuenenia*", "*Ca. Brocadia*", "*Ca. Jettenia*" and "*Ca. Scalindua*", which accelerate our understanding of anammox bacterial physiology. Here, we studied the anammox metabolism of "*Ca. Brocadia sinica*" that does not possess the genes encoding canonical NO-forming nitrite reductases (NirS or NirK) in its genome. It is proposed that "*Ca. K. stuttgartiensis*" reduces  $\text{NO}_2^-$  to NO, which is catalysed by NirS. However, this study revealed that "*Ca. B. sinica*" reduces  $\text{NO}_2^-$  to hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) with as yet unidentified nitrite reductases. We attempted to purify and identify the as yet unidentified "*Ca. B. sinica*" nitrite reductase; however it was unfortunately failed. Furthermore, we investigated the hydrazine ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) synthesis, which is a downstream reaction of  $\text{NO}_2^-$  reduction in anammox metabolism. "*Ca. B. sinica*" hydrazine synthase (Hzs) and cells could utilize  $\text{NH}_2\text{OH}$  and  $\text{NH}_4^+$ , but not NO and  $\text{NH}_4^+$ , for  $\text{N}_2\text{H}_4$  synthesis. These results clearly demonstrate that the metabolic pathway of "*Ca. B. sinica*" is  $\text{NH}_2\text{OH}$ -dependent and different from the one of "*Ca. K. stuttgartiensis*", indicating metabolic diversity of anammox bacteria.

Key words: anammox bacteria, enrichment cultures, nitrite reductase, hydrazine synthase, hydroxylamine

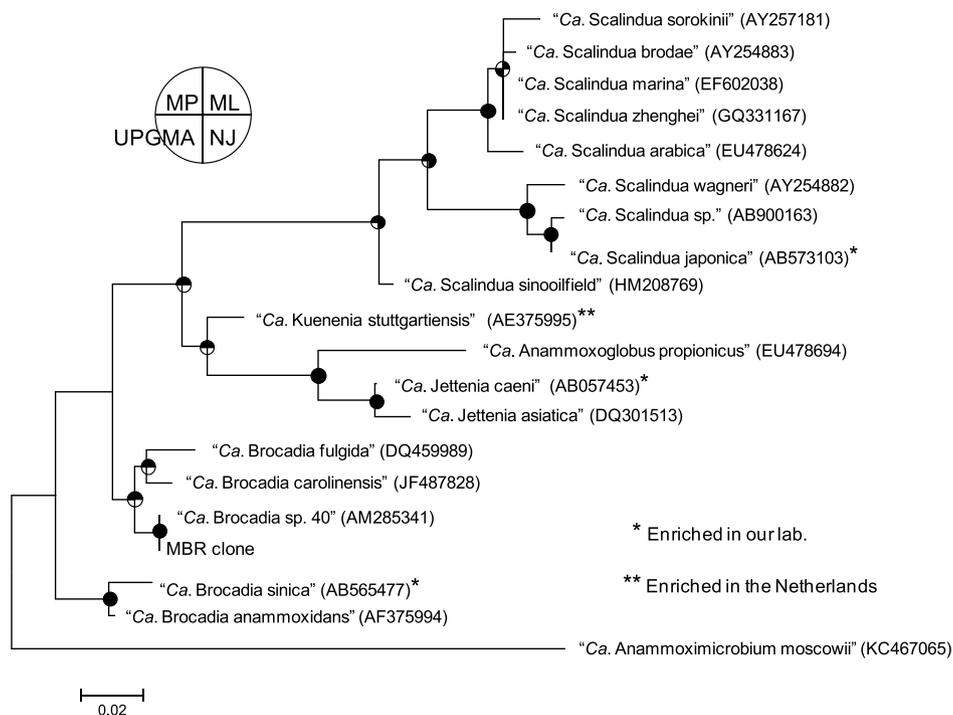
#### 諸 言

嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）反応は、嫌気条件下でアンモニアを電子供与体、亜硝酸を電子受容体としてヒドラジン（ $\text{N}_2\text{H}_4$ ）を中間生成物として直接窒素ガス（ $\text{N}_2$ ）へ変換する微生物反応であり、以下の化学式論式で示される（Strous *et al.*, 1999; Lotti *et al.*, 2014）。

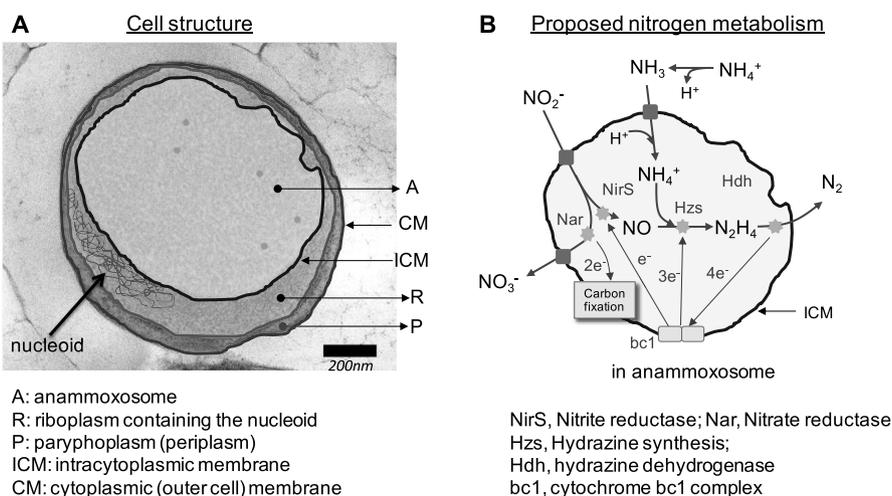


アナモックス反応を担う細菌は、*Planctomycetes* 門に属する独立栄養嫌気性細菌であり、海洋、湖沼、下水処理場など様々な環境中に幅広く存在している。これまでに5属約20種が報告されているが（Jetten *et al.*, 2009）（**Fig. 1**），その難培養性および増殖速度の遅さから、未だ純粋培養株は得られていない。また集積培養系の確立も困難であり、その生理生態は依然として未解明な部分が多い。アナモックス細菌は、原核生物でありながらラゲラン脂質で囲まれた anammoxosome と呼ばれる細胞内小器官を有するユニークな特徴を持っている（Damste *et al.*, 2002; van Niftrik *et al.*, 2008）（**Fig. 2A**）。

アナモックス反応の詳細な代謝経路は、Strous *et al.*



**Fig. 1** Phylogeny of anammox bacteria estimated based on partial 16S rRNA gene sequence. 16S rRNA gene sequences were aligned using the ClustalW program (version 1.83). The tree was constructed with the maximum likelihood (ML), neighbour joining (NJ), and maximum parsimony (MP) method using MEGA 6.06 software. The ML tree is shown here. Pie charts at nodes represent the confidence of branch topology, and bootstrap values greater than 80% are shown in black. Scale bar represents 2% sequence divergence. Anammox species with \* and \*\* indicate available enrichment cultures in our lab (*i.e.*, “*Ca. Brocadia sinica*”, “*Ca. Jettenia caeni*” and “*Ca. Scalindua japonica*”) and Prof. Jetten’s lab in the Netherlands (*i.e.*, “*Ca. Kueneenia stuttgartiensis*”), respectively.



**Fig. 2** Cell structure of “*Ca. B. sinica*”. A transmission electron micrograph and corresponding diagram were overlaid (A). Proposed anammox metabolism by “*Ca. K. stuttgartiensis*” (B), which is considered to occur in anammoxosome. Anammox metabolisms by other anammox species have not been investigated yet.

**Table 1** Summary of the reported draft genomes of different anammox bacteria.

	"Ca. B. sinica"	"Ca. S. japonica"	"Ca. K. stuttgartiensis"	"Ca. J. caeni"	"Ca. B. fulgida"
Nucleotide sequence (bp)	4,077,002	4,813,083	4,218,325	4,087,350	4,947,964
GC contents	41%	38.8%	41%	40%	50%
Contigs	3	47	5	4	2,786
CDSs	3,912	4019	4,664	3600	7,235
tRNAs	47	44	44	47	36
<i>rrn</i> operon(s)	[16S-23S-5S]×1	[16S-5S-23S]×1	[16S-23S-5S]×1	[5S-23S-16S]×1	5S×3 16S×1 23S×2
Data resource	BAFN01000001-BAFN01000003†	BAOS01000001-BAOS01000047.	CT030148†	BAFH00000000†	2225789020‡
Reference	Oshiki <i>et al.</i> , 2015	Oshiki <i>et al.</i> , (unpublished)	Strous <i>et al.</i> , 2006	Hira <i>et al.</i> , 2012	Gori <i>et al.</i> , 2011

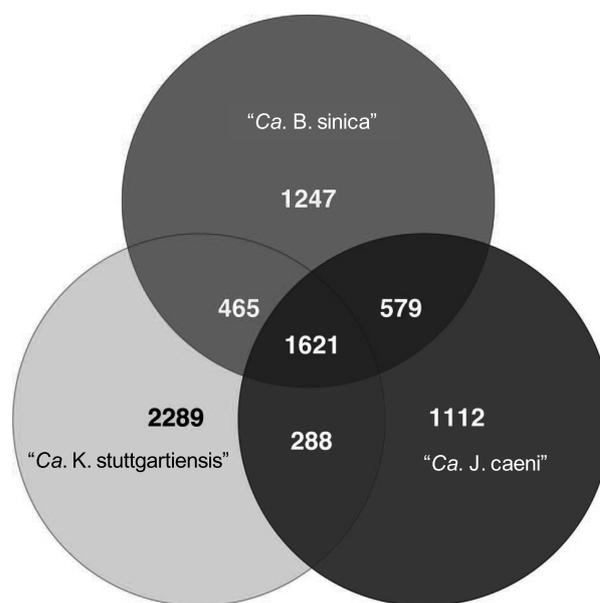
†Accession number at The National Center for Biotechnology Information

‡Taxon Object ID at The Integrated Microbial Genomes with Microbiome Samples (21 May 2012)

(1998) が集積培養した "*Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis*" を対象とし、メタゲノム解析に基づき見いだされた遺伝子群から推定されている (Strous *et al.*, 2006). "*Ca. K. stuttgartiensis*" のアナモックス反応は、三段階; 1) 亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^-$ ) の一酸化窒素 (NO) への還元, 2) 生成された NO とアンモニア ( $\text{NH}_4^+$ ) からヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) の生成, 3)  $\text{N}_2\text{H}_4$  の窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) への酸化, で anammoxosome の中で進行すると推察された (Fig. 2B). 近年, Kartal *et al.* (2013) は, 1) "*Ca. K. stuttgartiensis*" の細胞内に NO が存在する, 2) NO 生成を阻害した場合アナモックス活性が消失する, 3) アナモックス反応をアセチレンで阻害すると NO の蓄積が生じる, 4) NO と  $\text{NH}_4^+$  を基質として  $\text{N}_2\text{H}_4$  が合成されることを実証した. これらの研究成果により, 当初, 推察されたようにアナモックス反応は,  $\text{NO}_2^-$  は NO を経て  $\text{N}_2\text{H}_4$  に変換されると考えられている.

このように, "*Ca. K. stuttgartiensis*" の窒素代謝に関して研究は進行しているが, 他のアナモックス細菌については全く研究されていない. この理由として, "*Ca. K. stuttgartiensis*" 以外のアナモックス細菌の集積培養系が確立されていないことが挙げられる. 著者らはこれまでに, 膜分離型リアクター (Oshiki *et al.*, 2013) を用いて, 3 種類のアナモックス細菌; "*Ca. Brocadia sinica*", "*Ca. Jettenica caeni*" および "*Ca. Scalindua japonica*" の集積培養に成功した (Fig. 1). これらの集積培養系を用いて, 生理生態学的特徴付けおよびメタゲノム解析を行った (Table 1) (Ali *et al.*, 2015; Awata *et al.*, 2013; Oshiki *et al.*, 2011; Oshiki *et al.*, 2015).

集積培養に成功した "*Ca. B. sinica*" は, 他のアナモックス細菌と比べて増殖速度が速く基質親和性が低いという特徴を有する (Oshiki *et al.*, 2011). 集積バイオマスを用いたメタゲノム解析の結果, 3つのコンティグから成るドラフトゲノム (4,07 Mb, 3912 CDS, 47 tRNAs,



**Fig. 3** Venn diagram analysis for comparison of the genetic background among "*Ca. B. sinica*" (red), "*Ca. K. stuttgartiensis*" (yellow) and "*Ca. J. caeni*" (formerly *Planctomycetes* KSU-1) (blue): The homology search was performed for the amino acid sequences by the BLAST search (blastP threshold: > 25 % identity and > 30 % overlap ratio in amino acid sequences).

1 *rrn*, 保存遺伝子の有無に基づく推定完成度 > 98%) を再構築することに成功した (Oshiki *et al.*, 2015). "*Ca. K. stuttgartiensis*" と "*Ca. J. Caeni*" のゲノムと比較した結果, 1,247 CDS (全 CDS の 31.9%) は, "*Ca. B. sinica*" の固有遺伝子であり, アナモックス細菌の遺伝的多様性の高さを示している. さらに, プロテオーム解析を行った結果, 1,175 CDS のタンパク質発現が確認された (Fig. 3).

ゲノム情報に基づいて窒素代謝関連遺伝子を探索した結果, "*Ca. B. sinica*" は, これまでに報告されている NO 生

成を伴う亜硝酸還元酵素 (NIR) をコードする遺伝子 *nirK* および *nirS* のいずれも保有しておらず、新規の亜硝酸還元酵素が関与していると考えられた。確認のため従属栄養性脱窒細菌 (Braker *et al.*, 1998) またはアナモックス菌の *nirS* および *nirK* 遺伝子に特異的なプライマーを用いてそれぞれ PCR を行なったが、“*Ca. B. sinica*” のゲノム DNA から *nirK* および *nirS* を検出することは出来なかった。この結果は、“*Ca. B. sinica*” は、*nirS* を保有し  $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NO}$  へ還元する“*Ca. K. Stuttgartiensis*” (Kartal *et al.*, 2011) とは異なる代謝機構でアナモックス反応を行なっている可能性を示唆している。

そこで本研究では、“*Ca. B. sinica*” の窒素代謝経路の解明を目的とし、1) アナモックス反応の第一段階である  $\text{NO}_2^-$  還元反応の中間代謝物の同定、2) この反応を触媒する亜硝酸還元酵素の単離・同定を試みた。さらに、アナモックス反応の第二段階であるヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) 合成を触媒する酵素 (Hzs) の基質特異性についても検討した。本稿に記した内容の一部は、Oshiki *et al.* (2016) で報告済みである。

## 実験方法

### バイオマスの培養および採取

アナモックスバイオマスは、上向流カラムリアクター (Tsushima *et al.*, 2007) または膜分離型リアクター (MBR) (Oshiki *et al.*, 2013) から採取した (Fig. 4)。上向流カラムリアクターにおいてバイオマスはグラニュール状で存在しており、スターラー攪拌によって微細化した後、回分試験へ供した。なお、グラニュールバイオマスにおいて、“*Ca. B. sinica*” がバイオマス全体の 95% 以上を占めることを FISH 解析で確認した。MBR

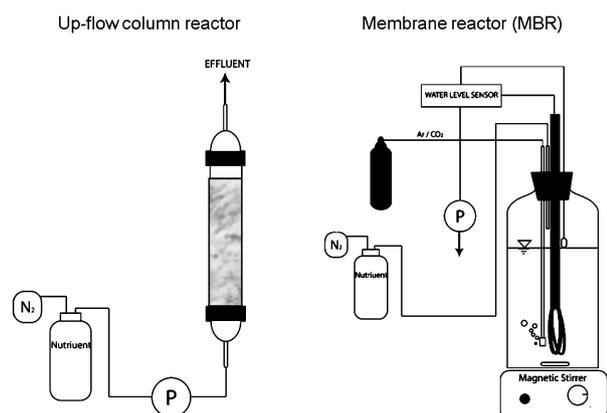


Fig. 4 Schematic diagrams of a up-flow column reactor and a membrane bioreactor (MBR) used in this study.

から採取したバイオマスは、Percoll (GEヘルスケア) を用いた密度勾配遠心分離し得られたバイオマスを用いた。この操作により、“*Ca. B. sinica*” の純度はバイオマス全体の 99.9% 以上であった。

### バイアル試験

“*Ca. B. sinica*” によるアナモックス反応の第一段階である、 $\text{NO}_2^-$  還元反応の中間代謝物を同定する ( $\text{NO}$  ではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  が中間代謝物質であることを証明する) ために、4種類の試験：1)  $\text{NO}$  生成阻害剤 (PTIO) 添加試験、2)  $\text{NO}$  染色剤 (DAF) による細胞内  $\text{NO}$  の検出、3) アセチレン阻害試験、4)  $^{15}\text{NO}$  および  $\text{NH}_2\text{OH}$  トレーサー試験を行なった。

バイオマスが無機栄養塩培地 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 mM,  $\text{KHCO}_3$  5 mM, Trace element solution 1 ml  $\text{L}^{-1}$ , HEPES (pH 7.6) 2 mM) (van de Graaf *et al.*, 1995) に懸濁させ、血清ガラスバイアル (10 ml) へ分注した。バイアルのヘッドスペースをヘリウムガス (G1 グレード, +0.5 atm) で置換した後、 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。翌日、アナモックス基質を添加し、スターラーによる攪拌を行ないながら  $37^\circ\text{C}$  で所定時間培養した。バイアル試験で用いた  $^{15}\text{N}$  標識化合物および標識率は以下の通りであり、SIサイエンス社より入手した： $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$  > 98%,  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  99%,  $^{15}\text{NH}_2\text{OH HCl}$  98%,  $^{15}\text{NO}$  ガス 98%,  $^{15-15}\text{N}_2$  ガス 98%。

### $\text{NO}$ 生成阻害剤 (PTIO) 添加試験

PTIO (Carboxyl-PTIO, 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, sodium salt) (同仁化学) は、 $\text{NO}$  を瞬時に  $\text{NO}_2^-$  へ転換 (消去) する。従って、PTIO 存在下では  $\text{NO}$  が生成しても PTIO により瞬時に消去されるため、見かけ上  $\text{NO}$  が存在しないような状況となる (Kartal *et al.*, 2011)。

バイアルに  $^{15}\text{NH}_4^+$  と  $^{14}\text{NO}_2^-$  (終濃度各 2.5 mM) および PTIO (終濃度 0.1 または 2.5 mM) となるよう添加した。6 時間の培養過程における  $^{29}\text{N}_2$  の生成をモニタリングしガス生成速度を比較した。実験には上向流カラムリアクターのバイオマスを用いた。

### $\text{NO}$ 染色剤を用いた細胞内 $\text{NO}$ の検出

Diaminofluorescein-FM (DAF-FM) (積水メディカル) は細胞透過性試薬であり、細胞内へ透過後、細胞内エステラーゼ活性によって細胞内に保持される。この際、 $\text{NO}$  が細胞内で生成した場合、 $\text{NO}$  と DAF が反応し蛍光応答型に変化する (Kojima *et al.*, 1999)。

バイアルへ  $^{15}\text{NH}_4^+$  と  $^{14}\text{NO}_2^-$  (終濃度各 2.5 mM) を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 min 培養した。ヘッドスペースガスを

分析し、 $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成および  $\text{NO}_2^-$  の残存を確認した後、DAF を投与し細胞染色を説明書に従って行なった。DAF 染色のポジティブコントロールとして、脱窒反応過程で NO を生成することが明らかとなっている *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を亜硝酸塩培地、 $30^\circ\text{C}$  で培養し、対数増殖期に採取した細胞を用いた。

#### アセチレン阻害による中間代謝物の同定・定量

アセチレンは低濃度 ( $4\ \mu\text{M}$ ) において好気性アンモニア酸化細菌の ammonia monooxygenase を阻害し、高濃度 ( $0.3\text{--}4\ \text{mM}$ ) においては従属栄養性脱窒細菌の nitrous oxide reductase を阻害することが知られている。また、詳細な阻害機構は明らかではないが、 $30\ \mu\text{M}$  程度のアセチレン存在下でアナモックス細菌の  $^{29}\text{N}_2$  生成活性が消失することが報告されている (Jensen *et al.*, 2007)。

バイアルにアセチレン飽和水 ( $40\ \text{mM}$ , TOC 濃度測定により確認) を終濃度  $5\ \mu\text{M}$  または  $50\ \mu\text{M}$  となるように添加し、5 分間静置した後、基質 ( $^{14}\text{NH}_4^+$  および  $^{15}\text{NO}_2^-$ ) を添加した。 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間培養し、15 分間隔でヘッドスペースガスおよび液体試料を採取した。ヘッドスペースガスは ( $\text{N}_2$ :  $m/z$  28, 29, 30,  $^{15}\text{NO}$ :  $m/z$  31) について分析を行った。液体試料については、 $\text{NO}_2^-$ , NO,  $\text{NH}_2\text{OH}$  濃度の定量を行なった。実験には、MBR から採取し Percoll 密度勾配遠心分離によって精製したバイオマスを用いた。なお、 $\text{NH}_2\text{OH}$  の蓄積を検証する場合には、プール化合物として、非標識の  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $100\ \mu\text{M}$  で添加した。

#### $^{15}\text{NO}$ または $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ によるトレーサー試験

NO または  $\text{NH}_2\text{OH}$  の利用性を検証するため、安定同位体標識化合物を用いたバイアル試験を行い、生成した  $\text{N}_2$  ガス種を分析した。バイアルへ  $^{14}\text{NH}_4^+$  ( $3\ \text{mM}$ ) と  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  ( $3\ \text{mM}$ ) または  $^{15}\text{NO}$  (液中中で  $2.5\ \text{mM}$  相当) を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。経時的にヘッドスペースガスおよび液体試料を採取した。ヘッドスペースガスは ( $\text{N}_2$ :  $m/z=28, 29, 30$ ) について、液体試料については、 $\text{NH}_2\text{OH}$ , NO,  $\text{N}_2\text{H}_4$  について比色分析を行なった。

#### 化学分析

ヘッドスペースガス分析には GC/MS 装置 (QP-2010 SE, 島津製作所) を用いた。キャピラリーカラムには CP-PoraBOND Q (Varian) を用いた。分析条件は既報の条件に従った (Isobe *et al.*, 2011; Waki *et al.*, 2010)。ヘッドスペースガス  $50\ \mu\text{l}$  をスプリット注入し、 $m/z=28, 29, 30, 31$  についてモニタリングを行なった。検量線は  $^{15-15}\text{N}_2$  ガスを用いて作成した。

液中中の NO 濃度は、微小電極法またはミオグロビン

比色法により定量した。微小電極法ではバイアルを嫌気チャンバー内で開栓し、NO 微小電極 (Schreiber *et al.*, 2008) (Unisense, 検出下限  $0.1\ \mu\text{M}$ ) を液相へ挿入し電流値の測定を行なった。ミオグロビン比色法は Hogg & Kalyanaraman (1998) に従った。ミオグロビンを亜ニチオン酸で還元した後、Sephadex G-25 担体 (GEヘルスケア) によって精製し、密栓ガラスセル (光路長  $1\ \text{cm}$ , GLサイエンス) へ分注した。ガラスセルを He ガス置換した後、試料を  $100\ \mu\text{l}$  ずつ添加し  $580\ \text{nm}$  の吸光度変化を測定した。検量線作成には NO 飽和水を用い、モル吸光度係数には  $\Delta\epsilon = 10,300\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いた。本法の検出下限値は  $20\ \mu\text{M}$  である。分析過程における NO の自然酸化を防止するため、培養後のバイアルを  $50\ \text{ml}$  遠心管に入れ、スイングバケットローターを用いて  $1000\times g$ ,  $10\ \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  で遠心分離し菌体を沈殿させた。沈殿を乱さぬように遠心管からバイアルを取り出し、菌体を含まない上澄をガスタイトシリンジで採取し測定へ供した。

$\text{NH}_2\text{OH}$  濃度は比色法または GC/MS 法で測定した (Peng *et al.*, 1999)。比色法は Frear & Burrell (1955) に従って行なった。試料とアセトンを混合し、混合試料  $1\ \mu\text{l}$  を GC/MS ヘスプリットレス注入した。分析では  $\text{NH}_2\text{OH}$  とアセトンが反応して精製するアセトンオキシム ( $\text{MW}=73$ ) を定量するため、 $m/z=73.1$  および  $74.1$  を SCAN モードでモニタリングした。本法の定量下限値は数  $\mu\text{M}$  オーダーであり、検量線は段階希釈した非標識の  $\text{NH}_2\text{OH}$  を試料と同様に処理・分析することで作成した。 $\text{NO}_2^-$  および  $\text{N}_2\text{H}_4$  濃度は、それぞれナフチルエチレンジアミン法 (Association & Federation, 2005) および Watt & Chrisp (1952) の方法により測定した。

#### $\text{NH}_2\text{OH}$ 生成を伴う亜硝酸塩還元酵素の精製

“*Ca. B. sinica*” のバイオマスをテフロンホモジナイザで分散し、抽出バッファー A ( $20\ \text{mM}$  リン酸カリウムバッファー pH 7.5,  $0.2\ \text{M}$  KCl,  $1\%$  コール酸ナトリウム,  $1\ \text{mM}$  DTT) に懸濁させ、 $4^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌した。懸濁物を遠心分離 ( $10,000\times g$ ,  $60\ \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) し、可溶性および不溶性画分を分離した。ここで得られた不溶性画分について、以下の通り再抽出操作を行なった。不溶性画分を抽出バッファー B ( $20\ \text{mM}$  リン酸カリウムバッファー pH 7.5,  $1\ \text{mg/ml}$  Lysozyme,  $1\ \text{mM}$  DTT) に懸濁させ、 $4^\circ\text{C}$  で 1 時間攪拌した。その後、 $n\text{-Octyl-}\beta\text{-D-glucoside}$  を終濃度  $1\%$  (w/v) 添加し、さらに 1 時間攪拌した。懸濁物を遠心分離 ( $10,000\times g$ ,  $60\ \text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) 後、得られた可溶性画分を crude extract とし、以下の精製試験へ供した。

初期精製に陰イオン交換、中間精製に疎水性相互作用カラム、最終精製にゲル濾過クロマトグラフィーを用い

た。陰イオン交換では、Sepharose Q XL 担体を充填した HiTrap Q XL カラム (5 ml 容積, 強陰イオン性) を用いた。Crude extract をアプライした後, 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5, 0.1% n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside, 1 mM DTT) を 5 カラムボリューム (CV) 通水し, 未吸着タンパク質を溶出させた。吸着タンパク質の溶出は, 0–1 M NaCl のリニアグラジエントによって行なった。溶出フラクションを回収し, ヒドロキシルアミン生成活性を測定した。活性が高いフラクションを混合し中間精製へ供した。

中間精製には, 高分離能を持つ陰イオン交換担体 (Source Q15) が充填された Resource Q カラム (1 ml 容積) を用いた。初期精製で回収したフラクションを 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5, 0.1% n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside, 1 mM DTT) で 5 倍希釈しカラムへアプライした。20 mM Tris バッファー (pH 7.5, 0.1% n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside, 1 mM DTT) を 5 CV 通水し未吸着タンパク質を溶出させた。吸着タンパク質の溶出は, 0–1 M NaCl のリニアグラジエントによって行なった。溶出フラクションを回収し, ヒドロキシルアミン生成活性を測定した。活性が高いフラクションを混合し最終精製へ供した。

最終精製には Superdex 200 担体充填カラム (HiLoad 16/60 Superdex 200) を用いた。中間精製で回収したフラクションをカラムへアプライし, 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% Octyl- $\beta$ -D-glucoside, 1 mM DTT) を通水することで溶出を行なった。溶出フラクションのヒドロキシルアミン生成活性を測定し, 最も高い活性を示したフラクションを最終精製物とした。また, 分子量サイズを推定するため, 分子量マーカー kit (12–200 kDa, Sigma) 付属タンパク質, カタラーゼ (232 kDa), Ferritin (440 kDa) を用いて, 溶出ボリュームと分子量について検量線を作成した。

#### 亜硝酸塩還元 $\text{NH}_2\text{OH}$ 生成活性の測定

以下の組成となるように活性測定溶液を調製した: 90  $\mu\text{l}$  50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.5), 試料 (6  $\mu\text{g}$  -BSA), cytochrome C (ウマ心臓由来, 25  $\mu\text{M}$ ), sodium dithionite (20 mM)。活性測定溶液を 37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 分間保温した後, 10  $\mu\text{l}$  の反応基質 (2 mM  $^{15}\text{NO}_2^-$ , 200  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$ ) を添加し反応を開始させた。37  $^{\circ}\text{C}$  で 20 分反応させた後, 5 分間激しく攪拌することで反応を停止させた。反応物とアセトン 4  $\mu\text{l}$  を混合し, ヒドロキシルアミンをアセトンオキシム ( $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_2$ ) へ誘導体化した後, GC/MS によって定量分析を行なった (van de Graaf *et al.*, 1997)。分析には GC/MS-QP2010SE (Shimadzu), カラムには CP-PoraBOND Q Fused Silica (25 m  $\times$  0.32 mm) (Varian) を, 分析条件は以下の通りとした: 50  $^{\circ}\text{C}$  1 min から 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で 200  $^{\circ}\text{C}$  まで昇温, injector 80  $^{\circ}\text{C}$ , MS

インターフェイス 220  $^{\circ}\text{C}$ , スプリットレス 1  $\mu\text{l}$  注入, キャリアガス He (1 ml/min)。定量する場合は, SIM モードにて m/z 73.1 ( $\text{C}_6\text{H}_9^{14}\text{NO}_2$ ) および 74.1 ( $\text{C}_6\text{H}_9^{15}\text{NO}_2$ ) をモニタリングした。検量線は市販のヒドロキシルアミン塩酸塩 (試薬特級, Wako) を段階希釈し, アセトンによって誘導体化した試料を用いて作成した。タンパク質濃度の定量は Lowry 法または Bradford 法で行ない, 標準物質として牛血清アルブミンを用いた。

#### タンパク質の同定

SDS-PAGE を行なった後, N 末アミノ酸配列の決定によってタンパク質の同定を行なった。SDS-PAGE には NuPAGE 泳動装置 (Invitrogen) を用いた。試料を 4  $\times$  LDS buffer および DTT 溶液と混合後, 70  $^{\circ}\text{C}$  10 min で還元処理を行なった。還元処理済みのサンプルを 10% BisTris ゲルへアプライし泳動を行なった。分子量マーカーには Novex Sharp PS PROT STD を用いた。泳動ゲルからタンパク質を PVDF 膜へ転写し, PVDF 膜を CBB 染色 (0.1% CBB-R250) し, 検出されたバンドをクッターナイフで切り出した。切り出した膜片について, 脱色操作 (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 30% アセトニトリル) を行なった後, エドマン分解法による N 末アミノ酸配列決定を行なった。

#### ヒドラジン合成酵素 (Hzs) の精製, 比活性試験

“*Ca. B. sinica*” バイオマス (20 g-wet) を, 50 mL のリン酸バッファー (20 mM, pH 7) に懸濁した (0.4 g-wet  $\text{ml}^{-1}$ )。ビーズビーディング (5,000 rpm, 1 min, 3 回) によって菌体を破碎した後, 遠心分離 (13,400  $\times g$ , 60 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) により上澄みを回収した。初期精製には陰イオン交換 (Q sepharose XL 担体) を用いた。20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8) 中の NaCl 濃度を段階的に上昇させることで担体と結合した Hzs を溶出させ, 限外濾過 (30 kDa) によって濃縮した。最終精製にはゲル濾過クロマトグラフィーを (Superdex 200 担体) を用い, 20 mM リン酸バッファー (pH 7.5, 0.15 M NaCl) を通水することで Hzs を溶出させた。回収した Hzs を限外濾過 (30 kDa) によって濃縮し最終精製物とした。Hzs の純度は SDS-PAGE によって確認し, nanoLC/MS/MS 解析によってタンパク質同定を行った。

Hzs の比活性を測定するため,  $\text{NH}_2\text{OH}$  または NO を基質として培養を行った。アッセイバッファー 1 ml (2.6 mg Hzs, 50  $\mu\text{M}$  cytochrome c, 1 mM  $^{15}\text{NH}_4^+$ , 1 mM  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$ ) を 1.8 ml バイアルへ分注し, 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した後,  $^{20}\text{N}_2$  ガス生成を GC/MS により測定した。また,  $\text{NH}_2\text{OH}$  の代わりに 300  $\mu\text{l}$  の  $^{14}\text{NO}$  を基質として同様に培養を行った。

**Table 2** Effects of PTIO addition on  $^{29}\text{N}_2$  gas production rates of “*Ca. B. sinica*”.

	$^{29}\text{N}_2$ gas production rate ( $\mu\text{mol vial}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	SD	Biomass (mg BSA $\text{vial}^{-1}$ )	$^{29}\text{N}_2$ gas production rate ( $\text{amol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
No PTIO addition (n=4)	0.51	0.11	0.8	14
2.5 mM PTIO (n=5)	0.53	0.08	0.8	15

## 結果および考察

### NO 生成阻害剤 (PTIO) 添加試験

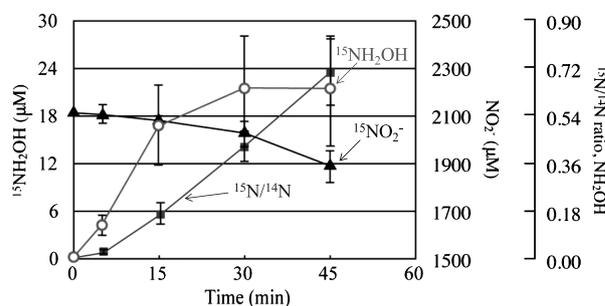
NO 生成阻害剤である PTIO を添加し、非添加系との  $^{29}\text{N}_2$  ガス生成速度を比較した。PTIO 添加系および非添加系において、 $^{29}\text{N}_2$  ガス生成速度に有意な差は認められなかった (Table 2)。既往の研究で *nirS* を保有することが確認されている “*Ca. Scalindua japonica*” では、PTIO 添加系では  $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成が完全に阻害された。この結果は、“*Ca. B. sinica*” による亜硝酸塩還元反応の中間代謝物は NO 以外であることを示唆するものである。

### NO 染色剤を用いた細胞内 NO の検出

活発な  $^{29}\text{N}_2$  ガス生成を確認した “*Ca. B. sinica*” バイオマスおよび亜硝酸呼吸条件で培養した *P. aeruginosa* PAO1 を、NO 蛍光染色剤である DAF によって染色し、顕微鏡観察を行なった。*P. aeruginosa* の菌体からは DAF の蛍光を検出することができたが、“*Ca. B. sinica*” の菌体からはできなかった。この結果は、アナモックス反応の中間代謝物として NO が細胞内で生成していないことを示すものである。しかしながら、アナモックス反応は、細胞内の anammoxosome と呼ばれる小器官で生ずると考えられており、NO が生成していたのであれば anammoxosome 内に存在したと考えられる。DAF の膜透過性は通常細菌の細胞膜で確認されているが、anammoxosome に対する透過性は現在のところ不明であり、さらなる検討が必要であると考えられる。

### アセチレン阻害による中間代謝物の同定

アセチレンによりアナモックス反応を阻害した際、 $\text{NH}_2\text{OH}$  が蓄積するか否かを検討した。“*Ca. B. sinica*” バイオマスを基質 ( $^{14}\text{NH}_4^+$  および  $^{15}\text{NO}_2^-$ 、各 2 mM) とアセチレン (50  $\mu\text{M}$ ) が含まれる培地で培養した。 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の変換速度が速いためプール化合物として  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  (0.1 mM) を添加し、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の蓄積を容易に確認できるようにした (Fig. 5)。アセチレン添加系では、 $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成量が非添加系と比較して 90% 以



**Fig. 5** “*Ca. B. sinica*” was anoxically incubated with 2 mM  $^{14}\text{NH}_4^+$ , 2 mM  $^{15}\text{NO}_2^-$ , 0.1 mM  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  and 50 mM acetylene. The concentration of  $^{15}\text{NO}_2^-$  decreased concurrently with increasing  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  concentration.  $^{15}\text{NO}_2^-$  was reduced to  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ , and the pool substrate,  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$ , was concomitantly consumed under this condition, which resulted in an increase in the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotopic ratio of  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Error bars indicate the standard deviations of triplicate vials. (This figure is slightly modified from Figure 1 (Oshiki *et al.*, 2016))

上阻害されていた。 $^{15}\text{NO}_2^-$  の消費に伴い  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  が蓄積し、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}/^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  比も増加した。培養開始30分間で消費された  $^{15}\text{NO}_2^-$  の 10–31% は、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  として蓄積した。この転換率は、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の消費が完全に阻害されているわけではないので、過小評価されている可能性がある。 $^{29}\text{N}_2\text{H}_4$  および  $^{30}\text{N}_2\text{H}_4$  の蓄積は確認されなかった。また、気相および液相中の  $^{15}\text{NO}$  濃度を GC/MS 法 (検出限界値 < 5 ppm)、微小電極法 (< 0.1  $\mu\text{M}$ )、ミオグロビン法 (< 20  $\mu\text{M}$ ) で測定したが、いずれも検出下限値以下であった。この結果は “*Ca. B. sinica*” の窒素代謝は NO を中間代謝物とせず、“*Ca. K. Stuttgartiensis*” の窒素代謝 (NO の蓄積が確認) とは異なることを示唆するものである。

一方、 $^{15}\text{NH}_4^+$  および  $^{14}\text{NO}_2^-$  を基質として培養した場合は、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の蓄積が認められなかった。これは、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  が  $^{15}\text{NO}_2^-$  の還元によって生成したことを示している。また、バイオマス非添加および滅菌バイオマス添加系では、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の蓄積は認められなかった。以上の結果より、 $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  の蓄積は生物学的反応に由来

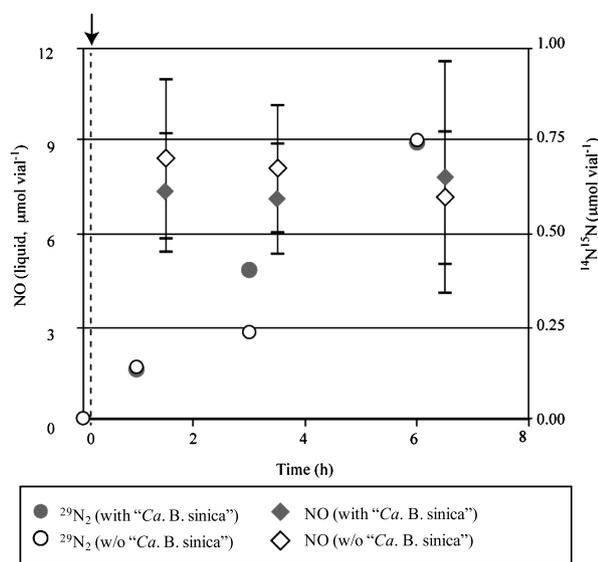
するものである。さらに同様の培養をプール化合物として  $^{14}\text{NO}$  ( $10\ \mu\text{M}$ ) を添加して行った結果、還元された  $^{15}\text{NO}_2^-$  の僅か2%が  $^{15}\text{NO}$  として検出された。

上記の実験結果はすべて、“*Ca. B. sinica*”によるアナモックス反応の中間代謝物は、NOではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  であるということを示唆するものであり、メタゲノム解析においてNO生成を伴う亜硝酸塩還元酵素 *nirS* 遺伝子が検出されなかった結果と一致する。

### $^{15}\text{NO}$ および $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ の利用性評価

NOの利用性を評価するために、“*Ca. B. sinica*”を  $^{14}\text{NH}_4^+$  および  $^{15}\text{NO}$  を基質として培養し、生成する  $^{29}\text{N}_2$  と  $^{30}\text{N}_2$  ガスおよび液相中のNO濃度の経時変化を測定した (Fig. 6)。培養6時間における  $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成速度を求めた結果、“*Ca. B. sinica*” バイオマス添加系で  $0.123 \pm 0.0045$  (s.d, n=4)、非添加系で  $0.120 \pm 0.0190$  (s.d, n=4)  $\text{mM h}^{-1} \text{vial}^{-1}$  であり、有意な差は認められなかった。この結果は、“*Ca. B. sinica*”がNOをアナモックス反応の基質として利用できないことを示している。

次に、“*Ca. B. sinica*”の  $\text{NH}_2\text{OH}$  利用性を評価するため、 $^{14}\text{NH}_4^+$  および  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  を基質として培養し、生成する  $^{29}\text{N}_2$  と  $^{30}\text{N}_2$  ガスおよび液相中の  $\text{NH}_2\text{OH}$  濃度の経



**Fig. 6** “*Ca. B. sinica*” was anoxically incubated with  $^{15}\text{NO}$  gas and  $3\ \text{mM } ^{14}\text{NH}_4^+$ . An arrow indicates when the substrates were added. Error bar indicates the standard deviations of triplicate measurements of NO concentration in liquid phase by the myoglobin absorbance measurement. Abiotic production of  $^{29}\text{N}_2$  gas occurred in the vial without the cells of “*Ca. B. sinica*”, due to the high reactivity of NO. (This figure is slightly modified from Figure S2 (Oshiki *et al.*, 2016))

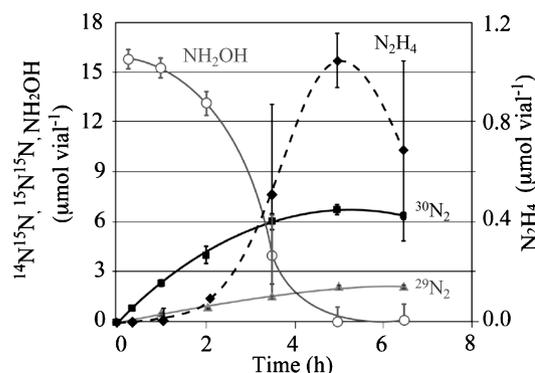
時変化を測定した (Fig. 7)。  $\text{NH}_2\text{OH}$  が消費されるに伴って、 $^{29}\text{N}_2$  および  $^{30}\text{N}_2$  ガスが生成した。  $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成は、  $\text{NH}_2\text{OH}$  がアナモックス反応の電子受容体として利用されたことを示している。また、  $^{30}\text{N}_2$  ガスの生成は  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  二分子から  $\text{N}_2$  ガスを生成することを示唆している。この反応は過去にも報告があり (Hu *et al.*, 2011)、  $\text{N}_2\text{H}_4$  の生成を担うヒドラジン合成酵素の基質特異性が低いことに起因すると考えられている。

以上の結果を総合すると、“*Ca. B. sinica*”によるアナモックス反応において、1)  $\text{NO}_2^-$  が還元される過程で  $\text{NH}_2\text{OH}$  が蓄積すること、2)  $\text{NH}_2\text{OH}$  がアナモックス反応の基質として利用され、  $\text{N}_2$  ガスを生成することが実験で証明された。従って、“*Ca. B. sinica*”によるアナモックス反応では、中間代謝物質はNOではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  である可能性が高い。この結果は、アナモックス細菌発見時の Van der Graaf *et al.* (1997) による報告と一致する。しかし、Strous *et al.* (2006) によって提唱され、Kartal *et al.* (2011) によって検証された “*Ca. K. Stuttgartiensis*” の代謝経路とは異なり、アナモックス反応の代謝経路には少なくとも2つのパターンが存在する。こうした窒素代謝経路の違いが環境中での生存やニッチ分化に及ぼす影響は現在のところ不明であるが、アナモックス細菌の多様な代謝の一部を明らかにすることができた。

次に、“*Ca. B. sinica*”による  $\text{NO}_2^-$  の  $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元反応を触媒する酵素の単離・同定を試みた。

### 亜硝酸還元 $\text{NH}_2\text{OH}$ 生成酵素の精製

各精製工程におけるタンパク質および  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  生成活性の回収率を Table 3 に示した。最終生成物である Superdex 200 elute において、単位タンパク質当りの活性値が80倍まで上昇した。Superdex 200 elute の溶出時



**Fig. 7** “*Ca. B. sinica*” was anoxically incubated with  $1.5\ \text{mM } ^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  and  $3\ \text{mM } ^{14}\text{NH}_4^+$ .  $^{15}\text{N}$ -labeled  $\text{N}_2\text{H}_4$  was produced from  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  and  $^{14}\text{NH}_4^+$ , which leads the production of  $^{29}\text{N}_2$  or  $^{30}\text{N}_2$  gas. Error bars indicate the standard deviations of triplicate vials.

**Table 3** Recovery of total protein and  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  production activity during the protein purification

	Total protein		Total (mgBSA)	Recovery	$^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ production activity			
	Concentration (mgBSA ml <sup>-1</sup> )	Volume (ml)			Activity (μM gBSA <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Total (nM min <sup>-1</sup> )	Recovery	Fold change
Crude extracts	0.68	1,000	676	100 %	0.2	164	100 %	1.0
1st purification Sephacryl Q XL	1.06	36.0	38	6 %	0.9	36	22 %	4.5
2nd purification ResourceQ	0.56	4.5	2.5	0.4 %	5.2	13	8 %	26
3rd purification Superdex200	0.03	8.0	0.25	0.04 %	19	5	3 %	95

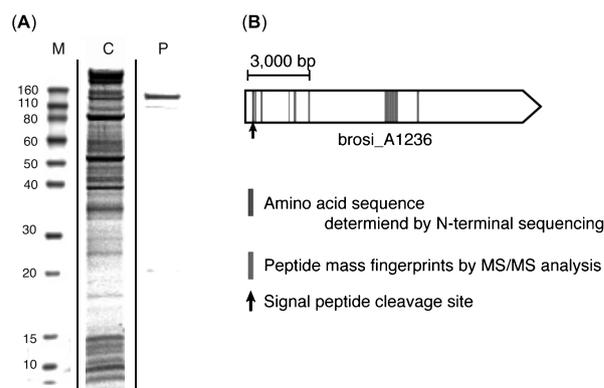
The purified protein (6 mg-BSA) was incubated at 37 °C and pH 7.5 with the addition of 2 mM  $^{15}\text{NO}_2^-$ , 0.2 mM  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$ , 25 mM cytochrome *c* and 20 mM sodium dithionite. After 20 minutes of incubation, the sample was mixed with acetone for the derivatization of  $\text{NH}_2\text{OH}$ . The concentration of  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  derivatives was determined by the GC-MS analysis.

間から、目的タンパク質の分子量サイズを推定したところ、280–420 kDa の範囲に存在すると予想された。

精製されたタンパク質は cytochrome *c* を電子供与体として  $^{15}\text{NO}_2^-$  を  $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$  へ還元する活性を有し、その活性は 1 mM EDTA, 1 mM アジ化ナトリウムまたは 4 °C 以下および 70 °C 以上で失活した。そこで、精製タンパク質を減圧濃縮し、SDS-PAGE 解析を行なった。その結果、Superdex 200 elute の泳動レーンからほぼ単一と見なしうるバンドが 150 ± 10 kDa の位置に検出された (Fig. 8)。このバンドの N 末端アミノ酸配列解析を行ない、相同性検索を行なった結果、“*Ca. B. sinica*” のゲノムから見いだされた brosi\_1236 遺伝子にコードされるタンパク質と一致した。NCBI に登録されている全タンパク質を対象に blastP 検索を行なったところ、brosi\_1236 のホモログ遺伝子は “*Ca. K. Stuttgartiensis*” のゲノムからのみ見いだされた。“*Ca. K. Stuttgartiensis*” が保有する kustd1514 遺伝子との相同性は、アミノ酸配列で 43.4% であった。

一方、他の anammox 細菌、“*Ca. B. fulgida*” および “*Ca. Scalindua sp.*” からはホモログ遺伝子は検出されなかった。brosi\_1236 はシグナルペプチドであり、シグナルペプチド部位を除いた分子量サイズは 154 kDa であった。ゲル濾過カラムにおける推定分子量は 280–420 kDa であったことから、目的タンパク質は brosi\_1236 の 2 量体 (308 kDa) であると考えられる。また、シグナルペプチドであることから、anammox 反応の反応場である anammoxosome 内に局在すると考えられる。brosi\_1236 遺伝子のタンパク質発現レベル (1,175 CDS 中、上位 48 番目) とホモログ遺伝子である kustd1514 遺伝子の mRNA 転写レベルが極めて高いことから、本遺伝子は、“*Ca. B. sinica*” および “*Ca. K. Stuttgartiensis*” の代謝に強く関与していると考えられる。

しかしながら、van Teeseling *et al.* (2014) の報告によ



**Fig. 8** An attempt to purify and identify as yet unknown nitrite reductase from “*Ca. B. sinica*”. SDS-PAGE analysis was performed with the molecular size standard marker (lane M, unit: kDa), the crude extract (lane C) and the 3rd purified protein fraction (A). A major protein band appeared in the lane P at 150 ± 10 kDa and subsequently identified to be the brosi\_A1236 protein by determining the N-terminal amino acid sequence and the peptide mass fingerprints (B). The brosi\_A1236 gene is illustrated as an arrow-shaped box, and the regions highlighted with green or brown color represent where the amino acid sequence matched with the N-terminal amino acid sequence or peptide mass fingerprints determined from the 3rd purified protein, respectively. A black arrow represents the signal peptide cleavage site. Scale bar indicates the 3,000 bp of nucleotide sequences. However, the brosi\_A1236 protein is most likely localized in the membrane S-layer (*i.e.*, outermost cell compartment) and thus is not a nitrite reductase (for more details, see results and discussion).

れば, kustd1514 タンパクは, グリコシル化された S-layer タンパク質であり, アナモックス反応が生じていると考えられている anammoxosome とは存在する位置が異なる. さらに, Pfam によるドメイン解析の結果, brosi\_A1236 タンパク質は, 既存の補酵素やコファクターの結合サイトを有していないことが明らかとなった. これらの知見を総合的に判断すると, brosi\_A1236 タンパク質を含有する画分は, 高い  $\text{NH}_2\text{OH}$  生成活性を示したが, brosi\_A1236 タンパク質は  $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NH}_2\text{OH}$  へ還元する機能を持っていない酵素であると考えられる. 今後, 更なる新規亜硝酸還元酵素の解析が必要である.

#### ヒドラジン合成酵素 (Hzs) の精製, 比活性試験

“*Ca. B. sinica*” によるアナモックス反応の第一段階で,  $\text{NO}_2^-$  は  $\text{NH}_2\text{OH}$  へ還元されることが明らかとなった. この結果を受けて, 後段であるヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) 合成において, “*Ca. B. sinica*” は  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4^+$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を合成可能か検証した. 実験方法に従い “*Ca. B. sinica*” の Hzs を抽出・精製し, 基質特異性を評価した.

精製タンパク質から 3 本のバンド (B1, B2, B3) が観察され, nanoLC/MS/MS 解析によって, それぞれ, hydrazine synthase subunit  $\alpha, \beta, \gamma$  であると同定された. Hzs に  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $^{15}\text{NH}_4^+$ , cytochrome *c* を添加し培養を行った結果,  $^{29}\text{N}_2$  ガスが生成し, 培養中にヒドラジンが 0.086 mM 程度蓄積した. これは “*Ca. B. sinica*” の Hzs が  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  と  $^{15}\text{NH}_4^+$  から  $^{29}\text{N}_2\text{H}_4$  を合成し, さらに  $^{29}\text{N}_2\text{H}_4$  を  $^{29}\text{N}_2$  ガスまで酸化したことを示している. 一方,  $^{14}\text{NH}_2\text{OH}$  ではなく,  $^{14}\text{NO}$  を基質とした場合は,  $^{29}\text{N}_2$  ガスの生成は確認されなかった. 以上の結果より, “*Ca. B. sinica*” の Hzs は,  $\text{NO}$  ではなく  $\text{NH}_2\text{OH}$  を基質とすることが明らかとなった. この結果は上述の  $\text{NH}_2\text{OH}$  生成を伴う亜硝酸還元反応の結果と一致する.

“*Ca. K. stuttgartiensis*” が保有するヒドラジン合成酵素 (Hzs) は基質特異性が異なり,  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{HN}_4^+$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を合成することができない (Kartal *et al.*, 2011). しかし, 昨年, “*Ca. K. stuttgartiensis*” のヒドラジン合成酵素 (Hzs) が単離され, x 線結晶構造解析によりその反応機構が推定された (Dietl *et al.*, 2015). この報告によれば, “*Ca. K. stuttgartiensis*” のヒドラジン合成は 2 ステップ, 1)  $\text{NO}$  の  $\text{NH}_2\text{OH}$  への還元, 2)  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_3$  の縮合による  $\text{N}_2\text{H}_4$  の生成で進行すると考えられている. すなわち, “*Ca. B. sinica*” と “*Ca. K. stuttgartiensis*” の Hzs の基質はともに  $\text{NH}_2\text{OH}$  であるが,  $\text{NH}_2\text{OH}$  の供給経路が異なる. “*Ca. B. sinica*” の *hzsBGA* 遺伝子は, “*Ca. K. stuttgartiensis*” の遺伝子とそれぞれ 79%, 86%, 82% の相同性を有していることから, “*Ca. B. sinica*” の Hzs の構造解析も待ち望まれる.

## 要 約

“*Ca. K. stuttgartiensis*” の窒素代謝に関して研究は進行しているものの, 他のアナモックス細菌については全く研究されていない. そこで本研究では, “*Ca. B. sinica*” の窒素代謝経路の解明を目的とし, 1) アナモックス反応の第一段階である  $\text{NO}_2^-$  還元反応の中間代謝物の同定, 2) この反応を触媒する亜硝酸還元酵素の単離・同定, 3) アナモックス反応の第二段階であるヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) 合成を触媒する酵素の基質特異性についても検討した. その結果, “*Ca. B. sinica*” のアナモックス反応機構は以下のように要約される.

- 1) 亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^-$ ) はヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) に還元される.
- 2)  $\text{NO}$  と  $\text{NH}_4^+$  ではなく,  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4^+$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を合成する ( $\text{NO}$  をアナモックス反応の基質として利用できない).

“*Ca. B. sinica*” は  $\text{NO}_2^-$  を  $\text{NH}_2\text{OH}$  に還元し, 生成された  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{NH}_4^+$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を合成し, 最終的に  $\text{N}_2\text{H}_4$  を  $\text{N}_2$  に酸化する. この反応機構はこれまでに報告されている “*Ca. K. stuttgartiensis*” のアナモックス反応機構とは異なる. また, “*Ca. B. sinica*” は  $\text{NO}$  生成を伴う亜硝酸還元酵素 *nirS* および *nirK* のいずれも保有していないというゲノム情報に一致する. “*Ca. B. sinica*” の  $\text{NH}_2\text{OH}$  生成を伴う亜硝酸還元酵素の単離・同定を試みたが, 最終的に単離には至らなかった. 抽出, 精製条件等を再度検討し, 単離・同定する予定である. このように, アナモックス細菌の集積培養系を構築し, ゲノム情報をもとに未解明である窒素および炭素代謝経路を明らかにすることは, 今後の重要な研究課題である.

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 成田柚子, Lei Zhang, Muhammad Ali, 岡部 聡. 2016. Anammox 細菌 “*Candidatus Brocadia sp. 40*” の生理学的特性. (ポスター発表) 第50回日本水環境学会年会 (3月16-18日, 徳島)
- 2) 小林香苗, 押木 守, 金田一智規, 眞壁明子, 岡部 聡. 2016. Anammox 細菌の窒素同位体分別に関する研究. (ポスター発表) 第50回日本水環境学会年会 (3月16-18日, 徳島)
- 3) Okabe, S. 2015. Advances in innovative nitrogen removal from wastewaters: Anammox-based technologies. IEEC2015, Keynote Speech. BEXCO, Busan, Korea.
- 4) Okabe, S. 2015. Anammox Process: from microbiology to practical application. Peradeniya University International Research Sessions (iPURSE 2015), Keynote Speech. University of Peradeniya, Sri Lanka.
- 5) Okabe, S. & Ali, M. 2015. Efficient start-up of anam-

mox-based nitrogen removal processes. Deammonification 2015: State-of-the-art and future perspectives. Chung Yuan Christian University, Taoyuan, Taiwan.

- 6) Okabe, S. 2015. Ecophysiology of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in engineered systems. ICoN4. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- 7) Okabe, S. & Ali, M. 2015. Rapid development of anammox process with a minimum amount of biomass. IANAS 2015. CBEAD, Dalian, China.
- 8) Lei, Z. Ali, M. & Okabe, S. 2015. Rapid achievement of anammox planktonic cells in membrane bioreactor. IANAS 2015, CBEAD, Dalian, China, Aug. 7-9.
- 9) Lei, Z. Oshiki, M. Ali, M. & Okabe, S. 2015. Competition between "*Candidatus Brocadia sinica*" and "*Candidatus Jettenia caeni*", The 3rd International Life-Science Symposium, Hokkaido University Conference Hall, Sapporo, Japan. Nov. 26.

#### 原著論文

- 1) Oshiki, M., Ali, M., Shinyako-Hata, K., Satoh, H., & Okabe, S. 2016. Hydroxylamine-dependent anaerobic ammonium oxidation (anammox) by "*Candidatus Brocadia sinica*". Environ. Microbiol. accepted. DOI: 10.1111/1462-2920.13355
- 2) Oshiki, M., Satoh, H. & Okabe, S. 2016. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. Environ. Microbiol. accepted. DOI: 10.1111/1462-2920.13134
- 3) Ali, M. & Okabe, S. 2015. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues. Chemosphere **141**: 144-153.
- 4) Ali, M., Oshiki, M., Rathnayake, L., Ishii, S., Satoh, H. & Okabe, S. 2015. Rapid and successful start-up of anammox process by immobilizing the minimal quantity of biomass in PVA-SA gel beads. Water Res. **79**: 147-157.

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、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いたします。タンパク質抽出・精製にあたって、森川正章教授（北海道大学環境科学院）には精製装置の使用や貴重なご助言をいただきました。ここに記して深く感謝いたします。

#### 文 献

- Ali, M., Oshiki, M., Awata, T., Isobe, K., Kimura, Z., Yoshikawa, H., Hira, D., Kindaichi, T., Satoh, H., Fujii, T. & Okabe, S. 2015. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium "*Candidatus Jettenia caeni*". Environ. Microbiol. **17**: 2172-2189.
- Association, A. P. H. A. W. W. & Federation W. E. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21st Edition). Washington D.C., USA.
- Awata, T., Oshiki, M., Kindaichi, T., Ozaki, N., Ohashi, A. &

- Okabe, S. 2013. Physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium belonging to the "*Candidatus Scalindua*" group. Appl. Environ. Microbiol. **79**: 4145-4148.
- 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.
- Damste, J., Strous, M., Rijpstra, W., Hopmans, E., Geenevasen, J., van Duin, A., van Niftrik, L. & Jetten, M. S. M. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. Nature **419**, 708-712.
- Dietl, A., Ferousi, C., Maalcke, W. J., Menzel, A., de Vries, S., Keltjens, J.T., Jetten, M. S. M., Kartal, B. & Barends, T. R. 2015. The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex. Nature **527**: 394-397.
- Frear, D. S. & Burrell, R.C. 1955. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. Anal. Chem. **27**(10): 1664-1665.
- Gori, F., Tringe, S. G., Kartal, B., Machiori, E. & Jetten, M. S. M. 2011. The metagenomic basis of anammox metabolism in "*Candidatus Brocadia fulgida*". Biochem. Soc. Trans. **39**: 1799-1804.
- Hira, D., Toh, H., Migita, C. T., Okubo, H., Nishiyama, T., Hattori, M., Furukawa, K. & Fujii, T. 2012. Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome *cd1*. FEBS Lett. **586**: 1658-1663.
- Hogg, N. & Kalyanaraman, B. 1998. The use of NO gas in biological systems. Methods Mol. Biol. **100**: 231-236.
- Hu, A., Zheng, P., Mahmood, Q., Zhang, L., Shen, L. & Ding, S. 2011. Characteristics of nitrogenous substrate conversion by anammox enrichment. Bioresour. Technol. **102**: 536-542.
- Hu, Z., Speth, D. R., Francoijs, K. J., Quan, Z. X., & Jetten, M. S. M. 2012. Metagenome analysis of a complex community reveals the metabolic blueprint of anammox bacterium "*Candidatus Jettenia asiatica*". Front. Microbiol. **3**: 366.
- Isobe, K., Koba, K., Ueda, S., Senoo, K., Harayama, S. & Suwa, Y. 2011. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. J. Microbiol. Methods **84**: 46-51.
- Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., Kuenen, J. G. & Strous, M. 2009. Family I. "*Candidatus Brocadiaceae*" fam. nov. pp. 918-925. In N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, W. Ludwig, & W. B. Whitman (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, Springer-Verlag, New York, USA.
- Jensen, M. M., Thamdrup, B. & Dalsgaard, T. 2007. Effects of specific inhibitors on anammox and denitrification in marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 3151-3158.
- Kartal, B., Maalcke, W. J., de Almeida, N. M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H. J. M., Harhangi, H. R., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H. G., Keltjens, J. T. & Jetten, M. S. M. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. Nature **479**: 127-130.
- Kartal, B., de Almeida, N. M., Maalcke, W. J., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M. & Keltjens, J. T. 2013. How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. FEMS Microbiol. Rev.

- 37: 428–461.
- Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Hirata, Y. & Nagano, T. 1999. Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 3209–3212.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Lubello, C., & van Loosdrecht, M.C.M. 2014. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture. *Water Res.* **60**: 1–14.
- Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. & Okabe, S. 2011. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium “*Candidatus Brocadia Sinica*”. *Microbiology* **157**: 1706–1713.
- Oshiki, M., Awata, T., Kindaichi, T., Satoh, H. & Okabe, S. 2013. Cultivation of planktonic anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria by using membrane bioreactor. *Microbes Environ.* **28**: 436–443.
- Oshiki, M., Shinyako-Hata, K., Satoh, H. & Okabe, S. 2015. Draft genome sequencing of anaerobic ammonium oxidizing bacterium, “*Candidatus Brocadia sinica*”. *Genome Announcement* **3**: e00267–15.
- Oshiki, M., Ali, M., Shinyako-Hata, K., Satoh, H. & Okabe, S. 2016. Hydroxylamine-dependent anaerobic ammonium oxidation (anammox) by “*Candidatus Brocadia sinica*”. *Environ. Microbiol.* accepted. DOI: 10.1111/1462–2920. 13355
- Peng, S. X., Strojnowski, M. J., Hu, J. K., Smith, B. J., Eichhold, T. H., Wehmeyer, K. R., Pikul, S. & Almstead, N. G. 1999. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of hydroxylamine for monitoring the metabolic hydrolysis of metalloprotease inhibitors in rat and human liver microsomes. *J. Chromatog. B.* **724**: 181–187.
- Schreiber, F., Polerecky, L. & de Beer, D. 2008. Nitric oxide microsensor for high spatial resolution measurements in biofilms and sediments. *Anal. Chem.* **80**: 1152–1158.
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 589–596.
- Strous, M., Kuenen, J. G. & Jetten, M.S.M. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3248–3250.
- Strous, M. & 35 authors. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790–794.
- Tsushima, I., Ogasawara, Y., Kindaichi, T., Satoh, H. & Okabe, S. 2007. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Res.* **41**: 1623–1634.
- Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Sakai, T., Suzuki, N., Suzuki, R., Matsuba, K., Yokoyama, H., Ogino, A., Tanaka, Y., Ueda, S., Takeuchi, M., Yamagishi, T. & Suwa, Y. 2010. Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. *Biores. Technol.* **101**: 2685–2690.
- Watt, G. W. & Chrisp, J. D. 1952. A spectrophotometric method for the determination of hydrazine. *Anal. Chem.* **24**: 2006–2008.
- van De Graaf, A. A., Mulder, A., Bruijn, P. D., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1246–1251.
- van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten M. S. M. & Kuenen, J. G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, **143**: 2415–2421.
- van Niftrik, L., Geerts, W. J. C., van Donselaar, E. G., Humbel, B. M., Yakushevskaya, A., Verkleij, A. J., Jetten, M. S. M. & Strous, M. 2008. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *J. Struct. Biol.* **161**: 401–410.
- van Teeseling, M. C., de Almeida, N. M., Klingl, A., Speth, D. R., Op den Camp, H. J., Rachel, R., Jetten, M. S. M. & van Niftrik, L. 2014. A new addition to the cell plan of anammox bacteria: *Kuenenia stuttgartiensis* has a protein surface layer (S-layer) as outermost layer of the cell. *J. Bacteriol.* **196**: 80–89.

## 平成22年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：平成22年 4 月～平成28年 3 月



# 極限環境微生物のゲノムに認められる機能未知遺伝子の 機能解析とその応用

河原林 裕

九州大学大学院農学研究院極限環境微生物ゲノム機能開発学

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

## Functional analyses of the hypothetical gene detected within the genomic data of extremophiles and its application

Yutaka Kawarabayasi

Laboratory of Functional Genomics of Extremophiles, Graduate School of Agriculture, Kyushu University  
Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

In the entire genomic data of microorganisms, many hypothetical genes were identified. To elucidate their actual function or activities, two different groups of genes were chosen: the one is genes annotated by sequence similarity, and the other is hypothetical genes without similarity to any data in database. Among genes annotated in hyperthermophilic archaea *Sulfolobus tokodaii* and *Pyrococcus horikoshii*, three genes encoding glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase, phosphoglucosamine mutase and bifunctional protein with phosphomannose isomerase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase activities were chosen as targets for analyses. These were expressed in *E. coli* and purified proteins were used for analyses of their activity or function. The first one indicated that only three-residue shorter form exhibited the expected activity. The candidate protein predicted as phosphomannomutase/phosphoglucomutase protein exhibited phosphoglucosamine mutase activity. It was shown that the sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activity on *P. horikoshii* bifunctional protein, PH0925 protein, was capable of catalyzing glucose-1-phosphate and glucosamine-1-phosphate as well as mannose-1-phosphate. Also fructokinase and phosphorylated amino-sugar epimerase activities, which were not predicted by sequence similarity, were purified from the *S. tokodaii* cell free extract. The novel nuclease, EndoQ, was detected and purified from cell free extract of *Pyrococcus furiosus*. The enzymatic activities of the protein identified from thermophilic archaea were successfully improved by introduction of single substitution, deletion or insertion. Also the expression system using bacterial cell was developed for efficient expression of thermostable proteins from extremophiles.

### 第1章 研究の背景と研究の設定

生物が有する遺伝子の本体であるDNAの塩基配列の解読を簡便に行える様にしたのが同時期に発表されたマクサム・ギルバート法とサンガー法であった。その後、使いやすいM13系やpUC系のベクター並びにダイデオキシ法などの簡便な反応系の開発が進み、DNA分子の塩基配列解読は一般的な技術として普及してきた。しかし、1990年位までは、一つの遺伝子の塩基配列を決定するのが一般的であった。その後スラブゲルを用いる自動シーケンサーが、次いでキャピラリー自動シーケンサーが開発され、DNAの塩基配列解読の効率が飛躍的に向

上した。それでもこの頃の塩基配列解読では、クローニングや鋳型プラスミドの調製等の作業があり、現在の次世代シーケンサーでの作業に比べると格段に多くの労力と長い時間とを要するものであった。

約25年前、微生物ゲノムの全塩基配列を解読する際に、ホールゲノムショットガン法という、微生物のゲノムDNAをランダムに切断した分子の塩基配列を解読し、得られたデータをコンピュータ上で結合していくという戦略が用いられるようになった。従来要していたサブクローン・ライブラリの構築・各プラスミド等の調製・反応・自動シーケンサーによる塩基配列の解読とデータ収集というステップの内、サブクローン・ライブラリの構築がこの戦略を用いることで必要なくなった。大量のデータを収集し、コンピュータ上で連結し、データが不

足してつながらない部分については別の作業としてつなげていき、完全な塩基配列を構築するというものである。この方法の普及により微生物のゲノム塩基配列は効率的に決定されるようになった。この決定された塩基配列からは、遺伝子情報を抽出する必要がある。塩基配列そのものが遺伝子の情報となるリボソーム RNA、トランスファー RNA、その他の小さな RNA 等をコードする遺伝子は、配列の比較から見出すことが出来る。しかしながら本来最も必要としている情報は、蛋白質をコードしている遺伝子の情報で、まず遺伝子の位置を特定する必要がある。微生物の場合、蛋白質をコードする遺伝子の大部分にはイントロンがないので、比較的容易に遺伝子領域を推定することが出来る。遺伝子領域を推定したら次は各遺伝子がコードする蛋白質が有している機能を推定しなくてはならない。通常このステップでは、各遺伝子にコードされている蛋白質のアミノ酸配列を、過去に機能が解明されている蛋白質のアミノ酸配列と比較し、配列が似ていれば機能も似ているものとして、ゲノム情報から見いだされた遺伝子産物の機能を推定する。この段階で、データベース中の機能が明らかになっている蛋白質と同一性が見いだされない場合、その蛋白質の機能を推定することができない。この蛋白質は機能が推定できない「機能未知蛋白質」、それをコードする遺伝子は「機能未知遺伝子」と呼ばれる。筆者がゲノム解析に携わっていた当時3か月から半年という膨大な時間と労力を要して決定した3種の超好熱アーキアのゲノム情報を Table 1 にまとめた (Kawarabayasi *et al.*, 1998; Kawarabayasi *et al.*, 1999; Kawarabayasi *et al.*, 2001)。機能未知遺伝子とのみ同一性を有するものを含めて約 60% の遺伝子の機能が推定出来ないものであった。次世代シーケンサーが普及した現在、4,000 個程度の微生物ゲノムの全塩基配列が決定されているが、これらのどの微生物からも機能未知遺伝子は一定の割合で見いだされてくる。

**Table 1** Summary of the genome analysis data of three hyperthermophilic archaea

	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	<i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7
ORFs over 100 a.a.	2002	2618	2558
annotatable	537 (26.9%)	609 (23.3%)	842 (32.9%)
with similarity to hypothetical protein	429 (21.4%)	483 (18.5%)	746 (29.2%)
with significant motif	148 ( 7.4%)	190 ( 7.3%)	122 ( 4.8%)
no similarity to database	888 (44.4%)	1336 (51.0%)	848 (33.2%)
ORFs 50 - 99 a.a.	59	76	268
annotatable	22 (37.3%)	23 (30.3%)	70 (26.1%)
with similarity to hypothetical protein	22 (37.3%)	41 (54.0%)	174 (64.9%)
with significant motif	15 (25.4%)	12 (15.8%)	24 ( 9.0%)

これらの機能未知蛋白質の中には各微生物の中で非常に重要な機能を有しているものも隠れている可能性がある。まだわれわれヒトがその機能を見出せずにいるものも多数存在する。そこで、これら機能未知遺伝子・蛋白質の機能の解明と得られた遺伝子資源の応用を課題として当寄付講座は研究をスタートした。

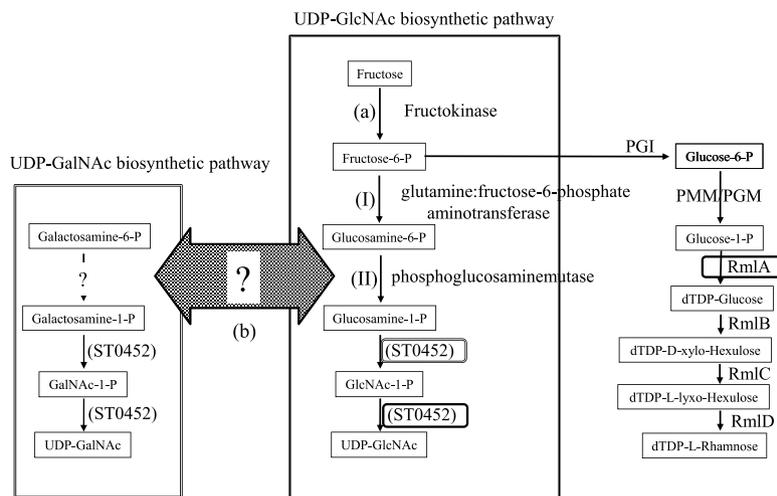
#### 1) 同一性から機能が推定されている超好熱アーキアの蛋白質・酵素の機能解明

前段で機能が全く推定できない、「機能未知遺伝子」がゲノム中に見いだされてくることを示した。しかし、蛋白質の機能が同一性から推定されていても、実際の実験的な解析で得られる機能・活性については、同一性からの推定と反応特異性、基質特異性、補酵素・金属特異性などが異なる場合などが、特に超好熱アーキアの蛋白質で数多く見出されてきた。

例えば、超好熱アーキアから単離されたホスホフルクトキナーゼやヘキソキナーゼでは、バクテリア由来の類縁酵素が ATP を用いるのと異なり、ADP をリン酸供与体として用いることが、実際の組換え蛋白質の実験的解析から明らかにされてきた (Sakuraba *et al.*, 2002)。また、我々のグループが過去に報告した超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来の糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素は、データベースとの同一性の結果では、グルコース-1-リン酸と TTP を結合する活性を有することが推定されていた。しかし、実際に大腸菌内で生産させた組換え蛋白質についての実験的解析から *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合させる活性も有していることが明らかとなっている (Zhang *et al.*, 2005)。

これらの例が示すように、過去に機能が解明された蛋白質やそれをコードする遺伝子との同一性が存在して機能や酵素活性が推定されていたとしても、実際に組換え蛋白質として生産した蛋白質の実験的な解析から得られた酵素活性や機能は異なっていることがある。このような遺伝子も実際の機能や酵素活性が明らかとなっていないという意味では、一種の「機能未知遺伝子」の状態だと考えられる。これら同一性から機能が推定されている遺伝子・蛋白質であっても、地道な実験的機能解明を行うことは重要な課題だと考えられる。特に超好熱アーキア由来の遺伝子・蛋白質の場合、必須の課題だと考えられる。

そこで、超好熱アーキア *S. tokodaii*, *Pyrococcus horikoshii* 等が有している遺伝子がコードしている蛋白質を材料として、その機能・酵素活性を明らかにする取り組み「同一性から機能が推定されている超好熱アーキアの蛋白質・酵素の機能解明」を第1研究課題として設定した。その中では、当グループでの *S. tokodaii* 由来糖-1-リン酸



**Fig. 1 Outline of the predicted metabolic pathway of phosphoglucosamine and phosphogalactosamine in *Sulfolobus tokodaii*.** PMI, PMM/PGM and RmlA to D indicate respectively phosphomannose isomerase, phosphomannomutase/phosphoglucomutase and enzymes catalyzing each step of the TDP-rhamnose biosynthetic pathway.

ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の実験的解析から推定された UDP-*N*-アセチルグルコサミン生合成経路の中の初発 (Fig. 1 中の (I)) と 2 番目の酵素 (Fig. 1 中の (II)) についてゲノム情報から見出されてきた候補遺伝子を対象とした。各遺伝子情報を元に当該蛋白質・酵素を大腸菌内で生産し、この組換え蛋白質を用いて詳細な機能・酵素活性の解析に取り組んだ。

さらに、超好熱アーキア *P. horikoshii* には、生育している自然環境中の温度・浸透圧等の急激な変化に対応する為に生体内でフルクトース-6-リン酸から 5 段階の反応によって生合成されるマンノシルグリセレートという化合物が知られている。この生合成経路の内、最後の 2 種類の反応を触媒する酵素については、既にポルトガルのグループから実験的解析結果が報告されている (Empadinhas *et al.*, 2001)。また、2 番目の反応を触媒するマンノースに結合したリン酸基の位置を変換するムターゼ酵素についても既に我々のグループが実験的解析結果を報告している (Akutsu *et al.*, 2005)。そこで、この生合成代謝経路の最初の反応であるフルクトース-6-リン酸をマンノース-6-リン酸へと変換する反応及び 3 番目の反応であるマンノースと GTP から GDP-マンノースを合成する反応の両方の反応を触媒すると推定された蛋白質についても組換え蛋白質を用いて実際の機能・酵素活性の解析に取り組んだ。

## 2) 活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析

すでに機能が明らかな蛋白質・遺伝子と配列上の相同

性が見いだされてこない、いわゆる機能未知蛋白質・酵素について、特定の機能未知蛋白質・酵素を選択してその蛋白質の機能に辿り着くのは想像以上に困難だと思われる。大腸菌や枯草菌では、機能が相同性の比較からは推定出来ない未知遺伝子を含む全ての遺伝子について、各遺伝子を個々に破壊した遺伝子破壊株コレクションの作製が、すでにゲノム解析初期の頃に取り組まれた (Baba & Mori, 2008; Baba *et al.*, 2008; Ogasawara, 2000)。しかしながら機能未知遺伝子を個々に破壊していくと、細胞の生存に必要な遺伝子の場合には破壊することで致死となることから破壊株は作製することができない。また破壊株の多くでは、表現型に顕著な違いは見出されてこなかった。残念ながら、網羅的な遺伝子破壊を行っても機能未知遺伝子の機能の解明に結びついた例はそう多くないのが現状である。その他に転写産物である mRNA の発現及び発現量を解析するトランスクリプトーム解析やマイクロアレーを用いた mRNA 発現量の解析、全ての代謝物の動態を解析するメタボロームといわれる解析もゲノムの塩基配列が決定された微生物では取り組まれてきた (Iwanaga *et al.*, 2014)。それらの大掛かりな解析に取り組んでも、機能未知蛋白質・酵素・遺伝子の機能にたどり着くのは容易なことではないと感じられる。

当寄付講座の対象とした極限環境微生物、特に超好熱アーキアは、真正細菌である大腸菌・枯草菌に比してそのゲノムサイズが小さく、ゲノムにコードされている遺伝子重複が少なく欠損変異体で類縁遺伝子による表現型相補がおこり難いというメリットがあると思われる。しかし、遺伝子破壊株の作製が可能な超好熱アーキアは

*Thermococcus kodakarensis* のみで (Sato *et al.*, 2005), 他の超好熱アーキアでは遺伝子破壊・遺伝子導入とも非常に難しいのが現状である。異なる条件下での培養で発現量が変動する遺伝子群を明らかにすることで機能未知遺伝子の機能に迫れるのではないかと考えがある。そこで当寄付講座でも、含有する糖の種類 (グルコース, ラムノース等) を変えた培地中での培養から得た全 RNA を用いたマイクロアレー解析に取り組んだ。この解析の結果、発現が変動する遺伝子を見出すことは出来たが、同一の発現変動を示す遺伝子群が全て機能未知遺伝子であったり、非常に多数の遺伝子が同一の発現変動を示すことから、このマイクロアレー解析の結果からだけでは、機能未知遺伝子の機能に辿り着くことは非常に困難であることが明らかになった。

次に、再度ゲノム情報とゲノム情報から構築されている代謝経路の情報を比較したところ、代謝上必要だと思われる遺伝子・酵素がゲノム情報中には見出されていない場合があると思われた。例えば、元々超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報中には相同性の解析結果からフルクトースをリン酸化する機能を有するフルクトキナーゼの存在が推定されていた。しかしながら、本遺伝子産物を大腸菌内で生産した組換え蛋白質からは、予測されたフルクトキナーゼ活性は検出されず、2-ケト-3-デオキシグルコネートキナーゼ活性が実験的に確認された (Ohshima *et al.*, 2007)。この実験結果とゲノム情報を総合すると、本超好熱アーキアにはフルクトキナーゼが存在しないことになる。本超好熱アーキア *S. tokodaii* は、本来グルコースを分解してエネルギーを獲得する際にグルコースをリン酸化しない特殊な代謝経路を用いていることが知られている (Kim & Lee, 2005)。また、ゲノム情報中にはグルコキナーゼ遺伝子は相同性からは見出されてこなかった。しかし、活性から精製に取り組むと実は機能未知遺伝子がコードする蛋白質がグルコキナーゼの活性を有することがすでに報告されている (Nishimasu *et al.*, 2006)。同様に、ゲノム情報では見出されてこないが、代謝上重要な酵素活性を指標に精製・遺伝子同定を行うことで、機能未知蛋白質・酵素・遺伝子にたどり着けるのではないかと考え、第2の研究課題として「活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析」を設定した。ここでは、Fig. 1 に示すフルクトキナーゼ(a)及びホスホグルコサミンとホスホガラクトサミンを変換するエピメラゼ(b)を主なターゲットに選択した。

### 3) 極限環境微生物遺伝子資源の応用

前述の1), 2)で示す研究課題を実際に遂行することで、既知の酵素では明らかになっていなかった基質特異性が

見出されたり、全く新規の酵素活性の存在が確認されることが示された。これらは、ゲノム情報からだけでは得ることが出来ない貴重な超好熱アーキア由来の遺伝子資源である。超好熱アーキア由来の蛋白質・酵素は、高温等に対して高い安定性を示すことから、酵素学や基礎科学的な興味に加え、物質生産等の応用での利用にも注目されている。超好熱アーキア由来酵素では、 $K_m$  値がバクテリア由来の酵素のものとは比べると小さい場合がある。これは反応に用いられる基質は非常に薄い濃度のもので利用できることを示し、超好熱アーキア由来酵素での利点である。しかしながら、一方の  $k_{cat}$  値についても、バクテリア由来の酵素のものとは比較するとこちらも小さい場合がある (Zhang *et al.*, 2007)。このことは、反応の進行はバクテリア由来の酵素を用いた場合よりも非常に遅いということを示している。超好熱アーキア由来の酵素の有する最大の利点である耐熱性・高い安定性を維持したまま反応効率を上げることが出来れば、応用面で非常に有利になると考えられる。また、超好熱アーキア由来蛋白質は大腸菌を宿主とした発現系を用いても比較的容易に発現が成功する場合が多い。しかしさらに効率的な発現系が存在するとさらに応用面でも有利となることが推測される。そこで、これら応用を目指した酵素活性の向上、生産性向上を目指した発現系の構築を課題とした「極限環境微生物遺伝子資源の応用」を第3の研究課題として設定した。ここでは、Fig. 1 に示した糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有する糖-1-リン酸とヌクレオシド-3-リン酸とを結合する反応 (一重枠で囲った反応) において、その触媒能の改善に取り組んだ。さらに同一蛋白質が有するリン酸化アミノ糖アセチル基転移酵素活性 (Fig. 1 の二重枠で囲った反応) についても、その触媒能の改善に取り組んだ。

## 第2章 研究成果の概要

### 1) 相同性から機能が推定されている超好熱アーキアの蛋白質・酵素の機能解明

これまでの解析から、超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報から見出された糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の実験的解析から、本蛋白質はグルコース-1-リン酸と TTP を、さらに *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸並びに *N*-アセチルガラクトサミン-1-リン酸と UTP を結合させ、各々 TDP-グルコース、UDP-*N*-アセチルグルコサミン、UDP-*N*-アセチルガラクトサミンを生成する反応を触媒出来ることが示されてきた (Zhang *et al.*, 2010)。さらに、本糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移

酵素は、グルコサミン-1-リン酸のみならずガラクトサミン-1-リン酸にもアセチル CoA のアセチル基を転移させ、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸、*N*-アセチルガラクトサミン-1-リン酸を生成する活性を有していることが実験的解析から明らかとなった。このことは、バクテリアが有するフルクトース-6-リン酸から UDP-*N*-アセチルグルコサミンを生成する生合成経路と同様の生合成経路が超好熱アーキア *S. tokodaii* 中に存在していることを示唆している。

そこで、既にバクテリアで良く解析されている本 UDP-*N*-アセチルグルコサミン生合成経路中の反応を触媒することが推定された蛋白質を最初の実験的解析ターゲットに選定した。バクテリアでの本生合成経路の初発反応は、グルタミンを供与体としてフルクトース-6-リン酸にアミノ基を転移させてグルコサミン-6-リン酸を生成する反応で、グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素が触媒することが知られている (Fig. 1 の (I) の反応)。二番目の反応は、上記グルコサミン-6-リン酸のリン酸の位置を 6 位から 1 位に変換する反応で、リン酸化糖ムターゼにより触媒されることが知られている (Fig. 1 の (II) の反応)。これら二つの反応を触媒する酵素・蛋白質について、超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報を検索したところ、最初のグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素については、相同性から 1 個の遺伝子が候補として見出されてきた。一方、グルコサミンに結合しているリン酸基の位置を変換するムターゼに関連する蛋白質としては、ホスホマンノムターゼ・ホスホグルコムターゼがゲノム情報中から見出されてきた。これら二つの見出されてきた候補蛋白質に関して、これらの蛋白質をコードする遺伝子を発現ベクターに導入し、大腸菌を用いて組換え蛋白質として生産させた。

まず、グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素候補蛋白質は、容易に大腸菌内で可溶性・耐熱性蛋白質として生産された。そこで、酵素活性の測定を、反応により生成するグルタミン酸を検出して行った。しかし、全く検出されなかった。そこで再度、N 末端配列を検討したところ、元々のメチオニンの 3 残基 C 末端側にバリンをコードする GTG コドンが見出されてきた。この GTG は微生物遺伝子では、スタートコドンとして利用される場合がある。そこで、3 残基・9 塩基分 C 末端側の GTG をスタートコドンである ATG に置き換えた 3 残基短い蛋白質を大腸菌で生産させたところ、この短い蛋白質も大腸菌の中で耐熱性・可溶性の蛋白質として生産された。さらに、この短いフォームの蛋白質では、3 残基長いフォームと異なり、反応進行に伴うグルタミン酸の生成が検出されたことから、本ショートフォームの蛋白質は予想された酵素活性を有しているこ

とが確認された。

二番目の反応を触媒すると推定されたリン酸化糖ムターゼについても大腸菌内で容易に耐熱性・可溶性の蛋白質として発現させることが出来た。推定されたマンノース及びグルコースに結合しているリン酸基の位置を変換する活性を有することが確認された。次に、推定されたグルコサミン-6-リン酸とグルコサミン-1-リン酸間のリン酸基転移活性についてカップリング系を用いて検出を試みた。グルコサミン-6-リン酸を基質とし本候補蛋白質とアセチル CoA、UTP、糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素をカップリングさせて反応させると、グルコサミン-1-リン酸がムターゼ活性によって生成された時だけ UDP-*N*-アセチルグルコサミンが検出される。反応の進行に伴って予想された UDP-*N*-アセチルグルコサミン分子が検出されたことから、本候補蛋白質は相同性から推定されていたホスホマンノムターゼ・ホスホグルコムターゼ活性の他にホスホグルコサミンムターゼ活性も有していることが示された。これまでに、幾つかのアーキアからリン酸化糖ムターゼが見いだされている。*T. kodakarensis* から見出されたリン酸化糖ムターゼは、リン酸化グルコース・リン酸化マンノースを基質とすることができるが、リン酸化グルコサミンを基質とすることが出来ない (Rashid *et al.*, 2004)。*P. horikoshii* から見出されたリン酸化ムターゼでは、リン酸化グルコース・リン酸化マンノースを基質とすることが報告されている (Akutsu *et al.*, 2005)。*S. tokodaii* と同じ属である *Sulfolobus solfataricus* から見出されたリン酸化糖ムターゼは、リン酸化グルコース・リン酸化マンノースを基質とするが、リン酸化グルコサミン・リン酸化アセチルグルコサミンを基質として用いることはできない (Ray *et al.*, 2005)。*Methanococcus marisplacidis* から見出されたリン酸化糖ムターゼは、リン酸化グルコース・リン酸化グルコサミンを基質として用いることが報告されている (Namboori & Graham, 2008) が、リン酸化マンノースを基質として用いることは報告されていない。これらのアーキアには複数のリン酸化糖ムターゼ候補遺伝子がゲノム情報中から相同性により見出されてくることから、それらには機能的役割分担があることも考えられる。これらの報告を見ても、*S. tokodaii* から見出された本酵素の解析結果は、3 種類のリン酸化糖ムターゼ活性を有するという非常に希少な酵素が超好熱アーキア *S. tokodaii* 中に存在することを示している。さらに、以上の実験的な確認から本超好熱アーキア中にはフルクトース-6-リン酸から UDP-*N*-アセチルグルコサミンを合成するバクテリア型代謝経路が確かに存在することが確認された。

一方、超好熱アーキアの *Pyrococcus* 属には、同じフ

ルクトース-6-リン酸を出発材料とするマンノシルグリセレート生合成経路の存在が知られている (Empadinhas *et al.*, 2001). そこで超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* のゲノム情報から、最初の反応と3番目の反応を担うバイファンクショナルな酵素の存在が推定された。大腸菌の中で生産された耐熱性・可溶性蛋白質を用いた解析から、本候補蛋白質は予想通りのホスホマンノースイソメラーゼ活性を有していることが確認された。さらに3番目の反応である GDP-マンノース生成活性についても、生成物の HPLC による分析から確認された。さらに興味深いことに、本蛋白質はマンノース-1-リン酸を糖基質とした場合、全ての NTP 並びにデオキシ GTP (dGTP) も基質として利用できることが示された。さらにグルコース-1-リン酸およびグルコサミン-1-リン酸も GTP または dGTP と結合させる反応を触媒出来ることが明らかとなった。これら3種類の糖-1-リン酸基質を利用でき、多種類のヌクレオシド-3-リン酸基質を利用できる酵素・蛋白質で、ホスホマンノースイソメラーゼ活性も有しているバイファンクショナルな酵素・蛋白質はこれまでに見出されていない。

以上、本研究課題において取り組んだ解析結果から、各遺伝子の配列比較からは推定出来なかった多様な活性や特徴を見出すことができた。このことは、たとえゲノム塩基配列・ゲノム情報が明らかになったとしても、それは単なるスタートであり、実際の実験的な機能・活性・特徴の解明への取り組みが重要だということを示している。

## 2) 活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析

前述の様に、糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の実験的解析から本アーキア *S. tokodaii* には、バクテリア型 UDP-N-アセチルグルコサミン生合成経路と同様の UDP-N-アセチルガラクトサミン生合成経路の存在が推定された。本糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素は Fig. 1 に示すように、その最後の2段階の反応を触媒することが出来ると考えられる。しかし、UDP-N-アセチルグルコサミンの生合成経路と同様の独立した代謝経路が存在するとすれば、初発物質であるフルクトース-6-リン酸に対応するリン酸化糖が存在することとなる。しかし、このリン酸化糖は、フルクトースの様な一般的な糖ではなく希少な糖になってしまう。そこで、UDP-N-アセチルグルコサミン生合成経路の中間産物であるリン酸化グルコサミンがリン酸化ガラクトサミンに変換する可能性があるのではないかと推定した。可能性がある「グルコサミン-6-リン酸」及び「グルコサミン-1-リン酸」に、超好熱アーキア *S. tokodaii* の無細胞抽出液を反応させて

未知生成物の合成を確認した。その結果、グルコサミン-6-リン酸を反応系に加えた場合のみ、非常に微量なガラクトサミン-6-リン酸の存在が確認された。無細胞抽出液に見いだされたリン酸化アミノ糖エピメラーゼ活性を指標にして、本活性を有する蛋白質を精製することが出来た。その N 末端のアミノ酸配列から特定された遺伝子情報から、発現プラスミドを構築し発現させた耐熱性・可溶性蛋白質から、本リン酸化アミノ糖エピメラーゼ活性が検出できたことから、本活性を有する蛋白質の本体を確認することが出来た。これまで、どの生物からもグルコサミン-6-リン酸とガラクトサミン-6-リン酸を変換するエピメラーゼ活性は検出されていないことから、本超好熱アーキア *S. tokodaii* から全く新規な酵素を見出すことが出来た。

次に、超好熱アーキア *S. tokodaii* 中の幾つかの糖や糖ヌクレオチド生合成経路に必要なフルクトース-6-リン酸をフルクトースから生成するフルクトキナーゼは、相同性の解析結果から本超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報中に見出されていた。しかし、その遺伝子産物からはフルクトキナーゼ活性は検出されず、実は 2-ケト-3-デオキシグルコネートキナーゼ活性であることが明らかとなった (Ohshima *et al.*, 2007)。このことはゲノム情報中にはフルクトキナーゼが存在しないことを示す。そこで、本アーキアの無細胞抽出液の中にフルクトキナーゼ活性が存在するか確認した。その結果、こちら弱ながらもリン酸化されたフルクトースが検出されてきた。そこで、本活性を指標にして無細胞抽出液中から、数蛋白質が含まれる画分にまで精製を行うことが出来た。各蛋白質の N 末端アミノ酸配列の解読を行ったので、順次組換え蛋白質として生産して、どの蛋白質が本フルクトキナーゼの本体か確認を行う予定である。

生物が有する遺伝子の本体である DNA は、様々な要因でダメージを受ける。例えば、化学物質・紫外線・放射線等によって DNA には損傷が入る。その損傷を除去して修復する為に、EndonucleaseV というものが知られている。しかし、超好熱アーキア *Pyrococcus furiosus* の無細胞抽出液と損傷モデル DNA を反応させると、この EndonucleaseV が切断する位置と異なる位置での切断が確認された。そこで、この切断活性を精製し N 末端のアミノ酸配列を決定して遺伝子を同定したところ、元々の相同性による機能推定では機能未知遺伝子であった。この新規 DNA 損傷修復に機能するであろう Endonuclease 活性は九州大学での成果ということで EndonucleaseQ と名付けられた。また、この蛋白質の配列の比較から細胞増殖時に起こる DNA 複製で重要な機能を有する PCNA との相互作用機能を有すると想定される領域が同定された。そこで、大腸菌の中で生産した組換え蛋白質を用い

て本 EndnucleaseQ と PCNA が相互作用するか確認したところ、PCNA 存在下で本 EndonucleaseQ の損傷 DNA 切断活性が促進されることが示された。本アーキア細胞中では両蛋白質は相互作用して、DNA 損傷の際の修復を効率的に進めていることが推測される。

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は、RNA と蛋白質の複合体で、主な機能は遺伝子から転写された tRNA 分子の 5' 末端に存在するリーダー配列を除去するために切断することである。この RNase P は、真正細菌・真核生物にも存在し、同様の tRNA 転写産物のリーダー領域の除去を行う。しかし、真正細菌・真核生物では tRNA 以外にも多様な RNA 分子の切断に関与していることが知られている。しかし、アーキアの RNase P が tRNA リーダー領域切断以外のどの様な機能を有しているかは明らかになっていない。そこで、アーキアにおける本 RNase P の新たな基質の探索を目指した。本 RNase P が基質とする RNA を探索する為に、この RNase P の機能を低下させた変異株を作成した。野生型との比較から変異株において量が増加する RNA が新たな RNase P の基質だと考えられる。そこで、生育速度が 25% 減少した RNase P 変異株と野生株から RNA を抽出し、その存在比の異なる分子を次世代シーケンサーによる塩基配列解読で検索した。その結果、12 の遺伝子の RNA 量が変異株で 2 倍以上に増加していることが明らかとなった。さらに興味あることに、その内 10 の遺伝子は 3 つの遺伝子クラスターとして存在することが明らかとなった。現在、RNase P がこれらクラスターの RNA を切断するという直接的証拠は得られていないが、さらに詳細な解析で、RNase P のターゲットとなる分子の解明に取り組みたい。

### 3) 極限環境微生物遺伝子資源の応用

これまでの解析の中で、新規な機能や特徴を有する遺伝子・蛋白質・酵素が見出されてきている。これらは、基礎科学的・酵素学的・蛋白質科学的な興味ある材料である。一方、新規反応を触媒する酵素・蛋白質は、これまで生物学的生産が困難であった物質の生産という応用の可能性が考えられる。しかし、超好熱アーキア由来の酵素活性の中には Km 値・*kcat* 値どちらもバクテリア由来類縁酵素のものと比較して小さい場合がある。*kcat* 値が小さいということは、反応の進行速度が遅いということで、応用面を考慮すると反応速度が速いほうが適している。そこで、耐熱性に優れた酵素・蛋白質の有している触媒能の改善に取り組んだ。

当研究室では、糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素について 5 個の変異体で活性が 1.3~1.5 倍上昇することを確認してきた(Zhang *et al.*, 2007)。しかし、この上昇した活性でもバクテリア・大腸

菌の類縁酵素活性と比してまだまだ低いものであった。

そこで、5 種類の変異を複数組み合わせることで、さらなる活性の上昇の可能性を検討した。残念ながら全ての複合変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素では、野生型の 10% 程度以下の活性が検出されたのみであった。このことは、二つ以上の変異を同時に一つの糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素に導入すると、活性の極端な低下をもたらすことを示した。

次に、単一変異の際に最も活性が上昇した 97 番目の Tyr を、他の全てのアミノ酸に置換した変異体の作成を試みた。その結果、6 種類の変異体では UDP-*N*-アセチルグルコサミンおよび UDP-グルコース両方の合成活性の上昇が確認された。この中でも Y97N では野生型活性と比して約 4.5 倍の活性を示した。また 8 種類の変異体蛋白質では、UDP-*N*-アセチルグルコサミン合成活性のみが促進されていた。

これらの活性が促進された変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の中で特徴的な Y97N, Y97M および Y97V について、その見かけの Km, *kcat* 値を解析した結果、活性の上昇には *kcat* 値の上昇が関与していることが示された。今回の変異体についての解析結果から、本糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有する糖ヌクレオチド合成活性については、一つのアミノ酸残基に変異を導入することで、大きく促進できることが示された。

また、同じ糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の C 末端側にコードされているアミノ糖-1-リン酸アセチル基転移活性の促進についても検討を行った。C 末端のアミノ酸残基を数アミノ酸欠失させることで、大きくグルコサミン-1-リン酸アセチル基転移活性が上昇することが確認された。見かけの Km, *kcat* 値の解析を行った結果、これらの変異体でも大きく上昇していたのは、*kcat* 値であった。

ホスホマンノースイソメラーゼとマンノース-1-リン酸と GTP を結合させる活性の二つを有する超好熱アーキア *P. horikoshii* が有するバイファンクショナル酵素 PH0925 蛋白質についても、C 末端側のアミノ酸残基を 100 残基程度欠失させることで、野生型蛋白質の活性の 3.5 倍高いマンノース-1-リン酸と GTP を結合させる活性を示すことが明らかとなった。

以上の様に超好熱アーキア由来酵素では、活性中心への変異の導入、或いは適度な長さの欠失の導入により、活性を大きく上昇させることが可能だということが示された。

近年、環境から回収された DNA を鋳型に用いて、未知・新規 DNA ポリメラーゼの断片を得ることが出来た。

この断片を Taq DNA ポリメラーゼの相当する領域と交換した変異体を作製して、それらの変異体蛋白質の有している活性を解析した結果、プライマー伸長活性および DNA 結合活性が野生型の Taq DNA ポリメラーゼよりも促進されているものが見出されてきた。これらの二つの活性が促進されている変異体のアミノ酸配列と野生型 Taq DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列とを比較すると 9 アミノ酸の挿入が検出された。そこで、本 9 アミノ酸の領域を野生型 Taq DNA ポリメラーゼに挿入してその影響を解析した。その結果、本断片の挿入により、PCR 産物の約 3 倍の増加、DNA 結合能の向上が観察された。このことは、本 9 アミノ酸長の領域が Taq DNA ポリメラーゼの機能を促進する能力を有していることを示している。今後、類似の機能を有するアミノ酸断片がさらに得られるか、さらに強力に DNA ポリメラーゼの活性を促進する断片が存在するかについても研究を進めていきたい。

以上、超好熱アーキア由来の酵素やその他の酵素についてそれらの応用に近づける為に各酵素・蛋白質の機能・活性を促進することが可能なこと、さらには実際の活性の促進例を示した。しかし、これら酵素・蛋白質の応用について考えると、酵素・蛋白質自身の活性の促進は重要な取り組みであるが、一方でそれらの蛋白質の効率的な生産も重要な課題である。そこで、好熱性のバクテリアを用いた発現系の確立に取り組んだ。宿主候補に選択したのは *Geobacillus kaustophilus* HTA426 株で、生育温度が 60℃ と高温なため、超好熱アーキア由来耐熱性蛋白質の生産に適していると推定された。効率的なプロモーターを有し、生産された蛋白質の精製を容易にするために His タグを有する形で蛋白質が生産されるベクターを構築した。幾つかの、由来の種が異なる遺伝子について本発現系を用いた効率的生産に成功した。さらに、効率的に発現された蛋白質は機能を表す形で生産されていた。

以上、超好熱アーキア由来の耐熱性を有する蛋白質・酵素の活性の促進法の確立、実際の活性の促進を行った。さらに効率的発現系としてバクテリアを用いた系を構築することが出来、今後の応用で有用だと思われる。

### 第 3 章 終わりに

本寄付講座には「極限環境微生物ゲノム情報中の未知遺伝子の機能解明とその利用」という課題が与えられていた。では、ゲノム情報中に存在する機能未知遺伝子にはどのような遺伝子が含まれるのか、それらにはどのような違いがあるのかということがまず課題として浮かび上がってきた。本来持っている機能を、現在のゲノム情報

解析技術では完全に推定・確定出来ないものが機能未知遺伝子ではないかと考えた。特に超好熱アーキア由来の酵素・蛋白質では、これまでも相同性から推定されていた機能が実際の組換え蛋白質からは検出されず、異なった機能・活性が検出されるという例が数多く見出されてきている。さらに推定されていた活性は有しているが、基質特異性がバクテリア由来の酵素・蛋白質と異なり多様な基質を代謝することが出来るという性質も数多く見出されてきている。この特徴自体、酵素学や基礎科学的な観点から興味を引くものであるが、当寄付講座の課題との関連で考えると、超好熱アーキア由来酵素・蛋白質についてゲノム情報からアノテートされた活性・機能は、たとえ既知の蛋白質・酵素との相同性が見いだされていたとしてもそれは単なる推定であって、その推定された機能・活性は確定されたものではない、という見方が必要だと思われる。このことは、たとえ相同性から機能・活性が推定されていたとしても、実験的な解析が行われるまでは機能・活性は確定出来ない、つまり機能未知な蛋白質・酵素・遺伝子だと考えざるを得ないことを示している。その点で、今回の取り組みで対象にした「相同性から機能が推定されていた蛋白質・酵素・遺伝子」については、相同性の情報からは予測出来ない基質を代謝出来る活性を有する等の特徴が見出されてきたことや N 末端のアミノ酸によって完全に活性が抑制されるという点など、相同性の解析だけでは見出すことが不可能な性質を明らかにすることが出来、非常に重要な意味のあるものであったと考えられる。一方で、現在ゲノム配列は 15 年前と比較にならない位に高速に安価に決定することが可能になってきている。その得られたゲノム情報については、単なる材料の一部が提供されただけと言う様な観点で利用し、実際の実験的な解析を重視することが必要なのではないかとと思われる。

また、対象をうまく選択することで活性や機能を指標にしたアプローチから元々機能未知であった蛋白質・酵素・遺伝子の機能を解明することが可能だという例を示すことが出来たことは大きな成果だと考える。とかくゲノム情報が存在する中で伝統的な生化学的手法でのアプローチは、全く泥臭く効率的でないような印象をもたれる可能性もある。しかしながら、網羅的な手法によって機能未知蛋白質・酵素・遺伝子の機能を解明することは現在の技術ではまだまだ不可能なことから、コツコツとした生化学的アプローチが一番早くて確実な方法ではないかと思われる。それでも、どの活性を対象に選ぶのかは非常に重要な要素だと思われるので、その際にはゲノム情報や代謝経路の情報、その他利用できるのであれば、転写量の変化の情報、生体内での分子の変化の情報（メタボローム）、遺伝子の位置関係の情報など、手に入れ

られる情報は以前に比べて格段に多いので、それらをうまく利用することで、効率的な探索が可能になるのではないかと考える。

## 謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄付金による援助のもと行われたもので、ここに感謝の意を表したい。また、本研究への九州大学大学院農学研究院大島敏久教授のご支援とご協力に感謝の意を表したい。さらに本研究は、協力講座（微生物遺伝子資源学分野、生物化学分野、蛋白質科学分野）の皆様、当寄付講座に在籍したポスドク・技術補佐員等の職員並びに教官の皆さん、当分野で実質的な研究を行った大学院生・学部生の皆様のご協力の元で成し遂げられたもので、ここに感謝の意を表したい。

## 文 献

- Akutsu, J., Zhang, Z., Tsujimura, M., Sasaki, M., Yohda, M. & Kawarabayasi, Y. 2005. Characterization of a thermostable enzyme with phosphomannomutase/phosphoglucomutase activities from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J. Biochem.* **138**: 159–166.
- Baba, T. & Mori, H. 2008. The construction of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection in *Escherichia coli* K-12. *Methods Mol. Biol.* **416**: 171–181.
- Baba, T., Huan, H.C., Datsenko, K., Wanner, B.L. & Mori, H. 2008. The applications of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection of *Escherichia coli* K-12. *Methods Mol. Biol.* **416**: 183–194.
- Empadinhas, N., Marugg, J., Borges, N., Santos, H. & da Costa, M.S. 2001. Pathway for the synthesis of mannosylglycerate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. Biochemical and genetic characterization of key enzymes. *J. Biol. Chem.* **276**: 43580–43588.
- Iwanaga, N., Ide, K., Nagashima, T., Tomita, T., Agari, Y., Shinkai, A., Kuramitsu, S., Okada-Hatakeyama, M., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2014. Genome-wide comprehensive analysis of transcriptional regulation by ArgR in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*. **18**: 995–1008.
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. & Kikuchi, H. 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* **5**: 55–76.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Kubota, K., Nakamura, Y., Nomura, N., Sako, Y. & Kikuchi, H. 1999. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **6**: 83–101.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T. & Kikuchi H. 2001. Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* **8**: 123–140.
- Kim, S. & Lee, S.B. 2005. Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem. J.* **387**: 271–280.
- Namboori, S.C. & Graham, D.E. 2008. Acetamido sugar biosynthesis in the Euryarchaea. *J. Bacteriol.* **190**: 2987–2996.
- Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. 2006. Identification and characterization of an ATP-dependent hexokinase with broad substrate specificity from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *J. Bacteriol.* **188**: 2014–2019.
- Ogasawara, N. 2000. Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.* **151**: 129–134.
- Ohshima, T., Kawakami, R., Kanai, Y., Goda, S. & Sakuraba, H. 2007. Gene expression and characterization of 2-keto-3-deoxygluconate kinase, a key enzyme in the modified Entner-Doudoroff pathway of the aerobic and acidophilic hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*. *Protein Expr. Purif.* **54**: 73–78.
- Rashid, N., Kanai, T., Atomi, H. & Imanaka, T. 2004. Among multiple phosphomannomutase gene orthologues, only one gene encodes a protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities in *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **186**: 6070–6076.
- Ray, W.K., Keith, S.M., DeSantis, A.M., Hunt, J.P., Larson, T.J., Helm, R.F. & Kennelly, P.J. 2005. A phosphohexomutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is covalently modified by phosphorylation on serine. *J. Bacteriol.* **187**: 4270–4275.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. & Imanaka, T. 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3889–3899.
- Sakuraba, H., Yoshioka, I., Koga, S., Takahashi, M., Kitahama, Y., Satomura, T., Kawakami, R. & Ohshima, T. 2002. ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **277**: 12495–12498.
- Zhang, Z., Tsujimura, M., Akutsu, J., Sasaki, M., Tajima, H. & Kawarabayasi, Y. 2005. Identification of an extremely thermostable enzyme with dual sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from an acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Biol. Chem.* **280**: 9698–9705.
- Zhang, Z., Akutsu, J., Tsujimura, M. & Kawarabayasi, Y. 2007. Increasing in archaeal GlcNAc-1-P uridylyltransferase activity by targeted mutagenesis while retaining its extreme thermostability. *J. Biochem.* **141**: 553–562.
- Zhang, Z., Akutsu, J. & Kawarabayasi, Y. 2010. Identification of novel acetyltransferase activity on the thermostable protein ST0452 from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Bacteriol.* **192**: 3287–3293.



# 相同性から機能が推定されている超好熱アーキアの 蛋白質・酵素の機能解明

河原林 裕

九州大学大学院農学研究院極限環境微生物ゲノム機能開発学

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

## Functional analyses of the proteins or enzymes whose function was predicted from similarity analyses

Yutaka Kawarabayasi

Laboratory of Functional Genomics of Extremophiles, Graduate School of Agriculture, Kyushu University  
Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

The functions or activities of genes assigned in the genomic data have been usually determined from results of sequence similarity analyses. However, during progress of experimental analysis of genes predicted within the genomic data, it was found that in some case actual function or activity was different from those predicted by sequence similarity. To elucidate the actual activity, function or feature of three gene products predicted as sugar metabolic enzymes, these genes were expressed in *Escherichia coli* and the purified recombinant proteins were used for experimentally functional analysis. It was found that full size of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase did not exhibit the predicted activity, but its truncated form of three amino acid residues from N-terminus exhibited the expected activity. Detailed analyses indicated that this activity did not catalyze reverse direction of the reaction and was not subject to feedback regulation by the downstream products. The sole candidate protein for phospho-sugar mutase detected within the *Sulfolobus tokodaii* genomic data exhibited phospho-glucosamine mutase activity as well as phosphomannomutase and phosphoglucomutase activities. This is the first identification of thermostable protein with multiple phospho-sugar mutase activities. Both phosphomannose isomerase and mannose-1-phosphate guanylyltransferase activities of the bifunctional enzyme predicted within the mannoglycerate biosynthetic pathway in *P. horikoshii* were experimentally confirmed. Also glucose-1-phosphate guanylyltransferase and glucosamine-1-phosphate guanylyltransferase activities were detected on this protein as well as mannose-1-phosphate guanylyltransferase activity. These observations indicated that the experimental analyses were very important for recognition of the actual activity of the gene products predicted from the genomic data, even their functions or activities were predicted by sequence similarity analyses.

Key words: glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase, phosphoglucomutase, phosphomannose isomerase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase, thermostable protein, thermophilic archaea

## 諸 言

ゲノム情報中に見いだされる遺伝子の生化学的機能が相同性の比較から推定されていても、実際の実験的な解析で確認される機能・活性については、相同性で推定されていた機能と異なる機能である場合、異なる基質を用

いた反応を触媒する場合、これまでに知られているものとは異なった物質を反応に用いる場合などが、特に超好熱アーキアの蛋白質・酵素で数多く見出されてきている。

例えば、超好熱アーキアから単離されたホスホフルクトキナーゼやヘキソキナーゼでは、バクテリアに存在する類縁酵素がATPを用いるのと異なり、ADPをリン酸供与体として用いることが、組換え蛋白質の実験的解析から明らかにされてきた (Sakuraba *et al.*, 2002)。また、我々のグループが過去に報告した超好熱アーキア *S. tokodaii* 由来の糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ

E-mail: kawarabayasi.yutaka@nifty.com

共同研究者：大島敏久，森田理日斗，岩本真梨子，林 知宏  
(九州大学大学院農学研究院)

糖-1-リン酸アセチル基転移酵素は、データベースとの相同性解析の結果では、グルコース-1-リン酸と TTP を結合する活性を有することが推定されていた。しかし、実際に大腸菌内で発現させた組換え蛋白質についての実験的解析から *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性も有していることが明らかとなった (Zhang *et al.*, 2005)。

これらの例が示すように、過去に機能が解明された蛋白質・酵素やそれをコードする遺伝子との相同性が存在して機能や酵素活性が推定されていたとしても、実際に組換え蛋白質として生産した蛋白質の実験的解析から得られた酵素活性や機能が異なることが数多く見出されている。この様なゲノム情報中の遺伝子・遺伝子産物も実際の機能や酵素活性が明らかとなっていないという意味では、一種の「機能未知遺伝子」の状態だと考えられる。これら相同性から機能が推定されている遺伝子・蛋白質であっても、地道な実験的機能解明を行うことは重要な課題だと考えられる。特に超好熱アーキア由来の遺伝子・蛋白質の場合、必須の課題だと考える。

そこで、本報告では、相同性の比較から機能が推定されていた糖代謝関連蛋白質・酵素であるグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素、リン酸化糖ムターゼ酵素、リン酸化マンノースイソメラーゼ/マンノース-1-リン酸グアニル酸結合酵素についての解析結果を示す。

## 実験方法

### 材料

遺伝子源の微生物として超好熱アーキア *S. tokodaii* JCM 10545 (Suzuki *et al.*, 2002) を用いた。ゲノム DNA は、既に報告されている方法 (Yamagishi & Oshima, 1990) により調製した。組換え蛋白質の発現のため大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS 株 及び BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株を用いた。

### 発現ベクターの構築

各候補遺伝子の N 末端および C 末端領域の配列からプライマーを設計し、5' 末端に相当するプライマーには開始コドンのとなりに Nde I 部位を、3' 末端に相当するプライマーにはグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素では EcoR I 部位を、リン酸化糖ムターゼ酵素では Xho I 部位を、リン酸化マンノースイソメラーゼ/マンノース-1-リン酸グアニル酸結合酵素では BamH I 部位を付加する形のプライマーを設計した。各遺伝子に適したプライマーセットで PCR 増幅させた各遺伝子領域断片をおのおの Nde I および C 末端側の各制限酵素

(EcoR I, Xho I, BamH I) で切断し、同じ制限酵素で切断された pET21a, pET28a および pET28a ベクターにおのおの挿入した。塩基配列解読により最終的な確認を行い、各発現ベクターとした。

### 組換え蛋白質の生産

塩基配列を確認されたグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素発現ベクターは大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS 株に、その他の蛋白質の発現ベクターは BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株に形質転換することで、組換え蛋白質として目的の遺伝子産物を生産させた。グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素発現ベクターを形質転換した大腸菌はアンピシリンを加えた液体 LB 培地中で、他の蛋白質用の発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL は、カナマイシンとクロラムフェニコールを含む LB 培地中で 37℃ で培養し、波長 600 nm での吸光度が 0.6–0.8 になるまで生育させ、そこに終濃度 23.8 μg/mL になるように IPTG を加え、さらに 37℃ で 6 時間培養を継続して、蛋白質発現の誘導を行った。培養終了後各菌体を 10,000 × g, 15 分間の遠心分離で集菌し、洗浄後、菌体の 4 倍量の緩衝液に懸濁後超音波処理により菌体を破碎した。破碎液を 15,000 × g, 15 分間遠心分離し、上清を 80℃ 10 分間の加熱処理を行った。再度 15,000 × g, 15 分間遠心分離した。

His タグを有する蛋白質については、その後 Ni キレートカラムを用いた精製を行った。

His タグを有しないグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素蛋白質については、硫酸アンモニウム沈殿、疎水性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製を行った。

蛋白質濃度は、BCA 蛋白質アッセイキットを用いて測定した。精製度については、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。

### 酵素活性の測定

グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素については、50 mM HEPES buffer (pH 7.5), 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0.5 mM フルクトース-6-リン酸, 0.5 mM L-グルタミンを含む反応液 100 μL をあらかじめ 80℃ で 5 分間保温したのち、6.6 ng の精製酵素を加えさらに 80℃ で反応を継続した。生成されたグルタミン酸は、蛍光誘導化し、ODS カラム (AccQ-Tag Ultra 2.1 × 100 mm Column) を装着した UPLC を用いて分離し、励起波長 350 nm, 測定波長 450 nm で測定し定量した。

リン酸化糖ムターゼ酵素活性については、各反応によって測定方法が異なる (Akutsu *et al.*, 2005)。ホスホ

グルコムターゼの場合、50mM MOPS buffer (pH 7.6), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10 μM グルコース-1,6-二リン酸, 1mM NADP<sup>+</sup>, 1 U *Geobacillus stearothermophilus* 由来グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 2 μg の精製酵素を含む反応液 2mL をあらかじめカップリング酵素である *G. stearothermophilus* 由来グルコース-6-リン酸脱水素酵素の至適反応温度である 65℃ で3分間保温した後、グルコース-1-リン酸を最終濃度 0.4mM になるように加えて反応をスタートさせ、さらに 65℃ で10分間反応を進行させた。この時、反応が進行すると生成されるグルコース-6-リン酸がカップリング酵素である NADP 依存性のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の働きにより酸化され、その結果生成される NADPH の量により測定するというものである。波長 340 nm の吸光度の変化によって NADPH の生成速度を測定した。ホスホマンノムターゼの場合、カップリング酵素としてグルコース-6-リン酸脱水素酵素の他にホスホグルコースイソメラーゼ (fructose-6-P ⇌ glucose-6-P) およびホスホマンノースイソメラーゼ (mannose-6-P ⇌ fructose-6-P) を反応系に加えることで、基質であるマンノース-1-リン酸から生成されたマンノース-6-リン酸を最終的にグルコース-6-リン酸に変換して検出するものである。50mM MOPS buffer (pH 7.6), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 10 μM グルコース-1,6-二リン酸, 1mM NADP<sup>+</sup>, 1 U *G. stearothermophilus* 由来グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 1 U 酵母由来ホスホグルコースイソメラーゼ, 1 U 大腸菌由来ホスホマンノースイソメラーゼ, 20 μg の精製酵素を含む反応液 2mL をあらかじめ酵母および大腸菌由来カップリング酵素の至適反応温度である 37℃ で3分間保温した後、マンノース-1-リン酸を最終濃度 0.4mM になるように加えることで反応をスタートさせた。上記と同様に生成される NADPH について、波長 340 nm の吸光度の変化によって NADPH の生成速度を測定した。ホスホグルコサミンムターゼ活性については、以下の方法で検出した。グルコサミン-1-リン酸は糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素をカップリング酵素として、アセチル CoA, UTP と共に反応系に加えると UDP-*N*-アセチルグルコサミンを生成する。しかし、グルコサミン-6-リン酸が存在しても UDP-*N*-アセチルグルコサミンは生成しない。そこで、グルコサミン-6-リン酸を基質として用いた反応系では、もしムターゼ反応が進行した時のみ UDP-*N*-アセチルグルコサミンのピークが HPLC で検出されることになる。このピークの検出がホスホグルコサミンムターゼ活性存在の証拠となる。50mM MOPS buffer (pH 7.6), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 20 μM グルコース-1,6-二リン酸, 2mM アセチル CoA, 0.5mM UTP, 1 μg 精製糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素蛋白

質, 2 μg 精製酵素を含む反応液 2mL をあらかじめカップリング酵素も含め至適反応温度である 80℃ で1分間保温後、グルコサミン-6-リン酸を加えることで反応を進行させた。生成された UDP-*N*-アセチルグルコサミンは HPLC によって分離し 257 nm の吸光度により検出・定量した。

*Pyrococcus horikoshii* 由来バイファンクショナル酵素のホスホマンノースイソメラーゼ活性は、50mM MOPS buffer (pH 7.6), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM NADP<sup>+</sup>, 1 U *G. stearothermophilus* 由来グルコース-6-リン酸脱水素酵素, 1 U *G. stearothermophilus* 由来ホスホグルコースイソメラーゼ (fructose-6-P ⇌ glucose-6-P), 2.0 μg の精製酵素を含む反応液 2mL をあらかじめカップリング酵素の至適反応温度である 65℃ で3分間保温した後、最終濃度 0.4mM になるようにマンノース-6-リン酸を加えることで反応をスタートさせた。フルクトース-6-リン酸を生成する反応の進行は、340 nm の吸光度の上昇により NADPH の生成速度を測定した。本蛋白質のもう一つの反応、糖-1-リン酸と NTP を結合する活性については、50mM MOPS buffer (pH 7.6), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05mM NTP, 1.0mM 糖-1-リン酸を含む反応液 10 μL をあらかじめ 85℃ で1分間保温した後、1ng の精製蛋白質を加えることで反応をスタートさせた。反応を 85℃ で進行させ、生成物を Wakosil 5C18-200 カラムを装着した HPLC で分析・定量を行った (Akutsu *et al.*, 2015)。

#### 詳細な性質およびキネティクスの解析

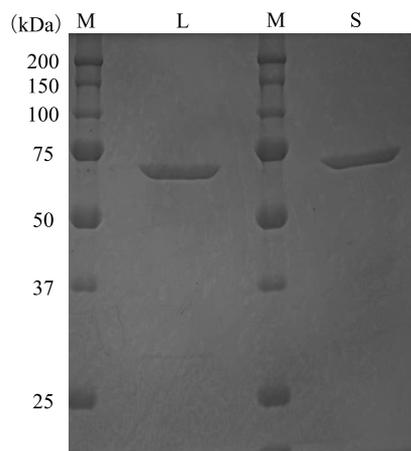
上記の反応を、異なる pH, 異なる温度で行い、至適条件等を決定した。

また、各酵素活性のキネティクスを求めるために、逆数プロットによる見かけの *K<sub>m</sub>* および *k<sub>cat</sub>* 値を求めた。

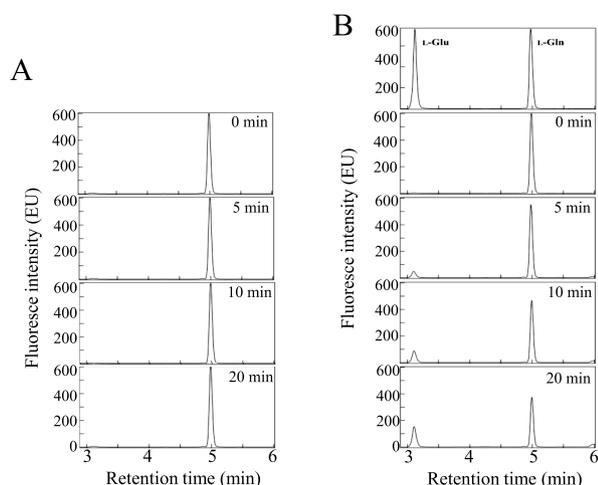
#### 結果および考察

##### グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素

超好熱アーキアのゲノム情報中から相同性によって見出されたグルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素と推定された蛋白質は、大腸菌の中で耐熱性可溶性蛋白質として生産された (Fig. 1L)。しかし、この蛋白質を用いた反応からは、Fig. 2A に示す様にこの反応系中に存在するグルタミンを用いた反応が進んだ場合現れるグルタミン酸が全く検出されなかった。このことは、本蛋白質は、相同性から予測されていた活性が全くないことを示している。そこで、本蛋白質の N 末端の配列を再度検討したところ、スタートコドンとして用いていた Met をコードする ATG の3 残基 C 末端側に微生物の場合マイナースタートとして用いられる Val をコードす



**Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified predicted glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase protein.** The recombinant protein was expressed in *E. coli*. Lane M, L and S indicate molecular markers, long form of the recombinant protein and short form of the recombinant protein, respectively.



**Fig. 2 HPLC elution profile of glutamine and glutamate in the reaction performed by long form (A) and short form (B) of the recombinant protein.** The top panel of the B indicates the elution profile of the standard molecule of glutamine and glutamate.

**Table 1** Relative activity under presence of each downstream product

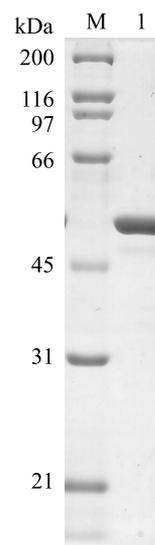
Added chemicals (0.05 mM)	Relative Activity
None	100
GlcN-6-P	83.1
GlcN-1-P	96.9
GlcNAc-1-P	92.7
UDP-GlcNAc	99.2

る GTG が存在していた。この GTG を ATG に置換した形で 3 残基分 N 末端のアミノ酸を欠いた形の蛋白質を大腸菌で生産させてみた。こちらの短いフォームの蛋白質も、大腸菌の中で、耐熱性・可溶性蛋白質として、発現させることが出来た (Fig. 1S)。この短いフォームの蛋白質で反応を行って見たところ、Fig. 2B に示す様に反応時間によってグルタミン酸の生産が確認された。このことは、N 末端が 3 残基短い蛋白質には、想定していた活性が存在するというを示している。この結果は、相同性の解析からは予想出来ないもので、実験的な解析を行うことで初めて得られるものである。

さらなる詳細な解析から、本酵素は正方向の反応しか触媒せず、逆反応を触媒しないこと、本 UDP-N-アセチルグルコサミン生合成経路のグルコサミン-6-リン酸以外の下流の産物を反応系に加えても本酵素活性は阻害されない (Table 1) ことから、グルコサミン-6-リン酸以外の産物によるフィードバック制御を受けていないことが明らかとなった。今後は、本蛋白質がどのような形で本超好熱アーキア *S. tokodaii* 中に存在するのか確認と検証を進めていきたい。

#### リン酸化糖ムターゼ

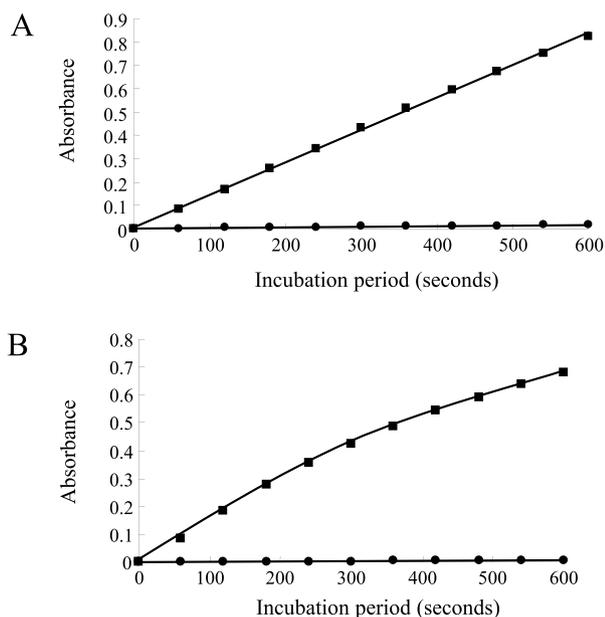
本超好熱アーキア *S. tokodaii* ゲノム情報中に唯一見出された、糖に結合するリン酸基の位置を変換するムターゼ活性を有すると推定された蛋白質の大腸菌での発現を試みた。本蛋白質も容易に大腸菌の中で、耐熱性・可溶性蛋白質として生産されることが判った (Fig. 3)。そこ



**Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified predicted mutase protein.** The recombinant mutase protein expressed in *E. coli*. Lanes M and 1 respectively indicate molecular markers and purified mutase protein.

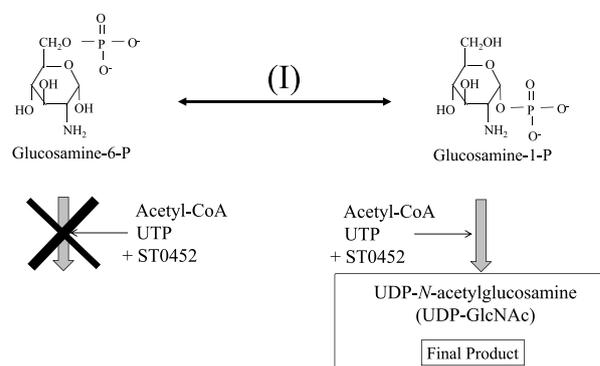
で、本蛋白質を用いて有している活性の検出を試みた。まず、ホスホグルコムターゼ活性の検出を試みた。Fig. 4A に示すように、反応時間が経過するのに従って、吸光度の上昇がみられることから、本蛋白質は、確かにホスホグルコムターゼ活性を有していることが判る。また、ホスホマンノムターゼ活性についても、Fig. 4B に示すように、反応時間が経過するのに従って、吸光度の上昇が確認された。以上の結果から、本蛋白質は、相同性から推定された二つの活性を有することが確かに実験的に確認された。

超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報中には、この蛋白質が糖に結合しているリン酸の位置を変換するムターゼ活性を有する唯一の蛋白質として同定されている。そこで、本蛋白質が、相同性からは推定されないが、実際にはホスホグルコサミンムターゼ活性を有しているのではないかと推定された。そこで、この活性の検出を試みた。グルコースやマンノースの場合と異なり、ホスホグルコサミンムターゼ活性は簡便なカップリング反応での検出は出来なかった。そこで、まず検出系の構築に取り組んだ。ホスホグルコサミンムターゼ反応は、Fig. 5 に (I) で示すグルコサミン-6-リン酸とグルコサミン-1-リ



**Fig. 4 Increase of absorbance at 340 nm during phosphoglucomutase (A) and phosphomannomutase (B) reactions.** Absorbance at 340 nm was measured after incubation periods indicated. The closed squares (■) and closed circles (●) respectively indicate absorbance for the reaction in the presence (0.03 U of the recombinant protein for PGM, 0.1 U for PMM) or absence of the predicted mutase protein.

ン酸を変換する反応である。そこで、グルコサミン-1-リン酸がグルコサミン-6-リン酸から生成された時にだけ、生成されたグルコサミン-1-リン酸を検出する系を構築した。同じ超好熱アーキア *S. tokodaii* が有する糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素は、グルコサミン-1-リン酸に対してアセチル CoA からアセチル基を転移させて *N*-アセチルグルコサミンに変換する活性を有している。しかし、グルコサミン-6-リン酸はこの蛋白質が触媒するアセチル基転移反応の基質になることは出来ないことが知られている (Zhang *et al.*, 2010)。しかし、単体の糖の変化を見出す為には特殊な装置が必要とされる。だが、この糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素は、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合して UDP-*N*-アセチルグルコサミンを生成することが出来る (Zhang *et al.*, 2005)。この分子は HPLC において紫外線での吸収で検出することが出来る。そこで、反応系での基質としてはグルコサミン-6-リン酸を加え、カップリング酵素として同じ超好熱アーキア *S. tokodaii* 由来の糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素、必要な化合物としてアセチル CoA および UTP を反応系に加えて、本ムターゼ候補蛋白質を反応させた。反応前は UTP のピークしか見出されないが、反応後のサンプルからは、UDP-*N*-アセチルグルコサミンのピークが検出された (Fig. 6)。このことは、本蛋白質がグルコース・マンノースの他にグルコサミンに結合しているリン酸基の位置を分子内で変換する活性を有していることを示している。この活性は、これまでにアー

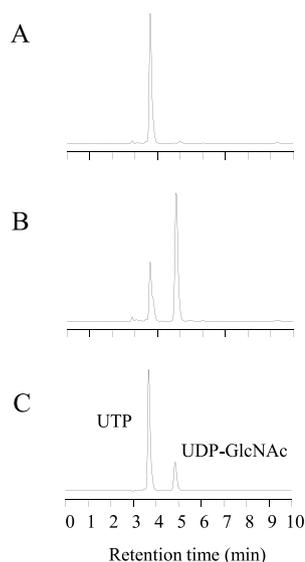


**Fig. 5 The reaction catalyzed by phosphoglucosaminmutase and scheme of detection of glucosamine-1-phosphate.** Glucosamine-6-phosphate is not catalyzed by the ST0452 protein, but glucosamine-1-phosphate is changed to UDP-*N*-acetylglucosamine by coupling reaction of the ST0452 protein under presence of Acetyl-CoA and UTP. (I) indicates the reaction catalyzed by mutase activity.

キアから見出されたリン酸化糖ムターゼで確認されていた活性 (Akutsu *et al.*, 2005; Namboori & Graham, 2008; Ray *et al.*, 2005; Rashid *et al.*, 2004) と異なり, さらに相同性から想定されたものではなく, 実際の実験的解析によって始めて明らかとなったものである。

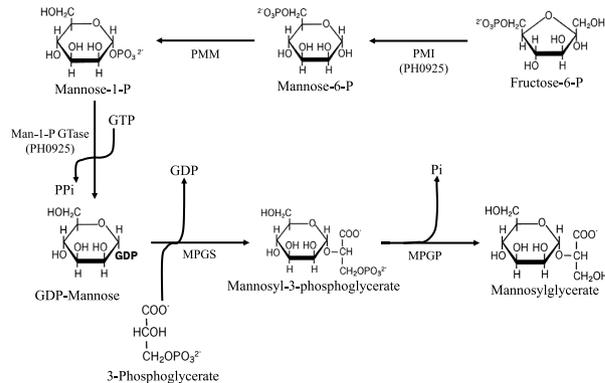
#### リン酸化マンノースイソメラーゼ/マンノース-1-リン酸グアニル酸結合酵素

超好熱アーキア *Pyrococcus* 属には, 生育環境中の温度や浸透圧の急激な変化に対応するためにマンノシルグリセレートという化合物を合成することが知られている

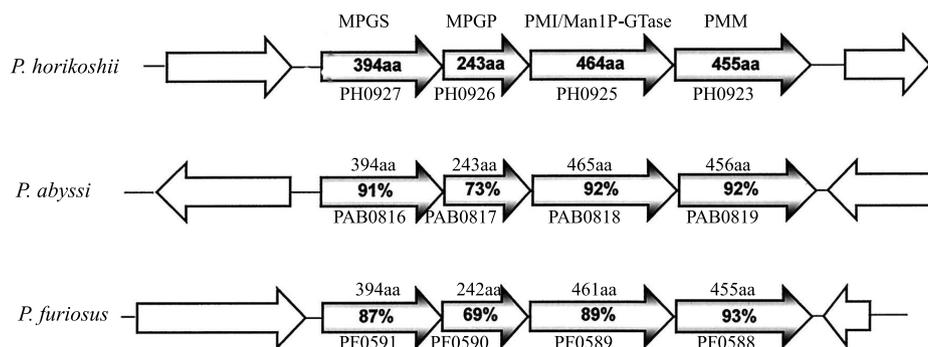


**Fig. 6** HPLC elution profile of product by coupling reaction with the ST0452 protein. Elution profiles for products before incubation (A) and after incubation (B) of the reaction mixture with the ST0452 protein. Elution profile of UTP and UDP-GlcNAc standard molecules (C).

(Empadinhas *et al.*, 2001). このマンノシルグリセレート生合成経路は, Fig. 7 に示すような 5 段階の反応であることが知られている。さらに, これらの反応を触媒する 4 種の酵素は, *Pyrococcus* 属アーキアのゲノム中で一つのクラスターを構成していることが判っている (Fig. 8)。また, このクラスター内の各遺伝子の並び順は保存されており, 個々の遺伝子産物の配列の一致度は 70–90% と高い値を示す。この生合成経路の内, *Pyrococcus* 属アーキア特有の反応は最後の二つの反応で, *P. horikoshii* 由来のこれら二つの酵素については, da Costa らのグループによって実験的な解析が行われ, すでに報告されている (Empadinhas *et al.*, 2001)。また, この生合成経路の 2 番目の反応を司る酵素であるホスホマンノムターゼ蛋白質については, 当研究グループによって *P. horikoshii*

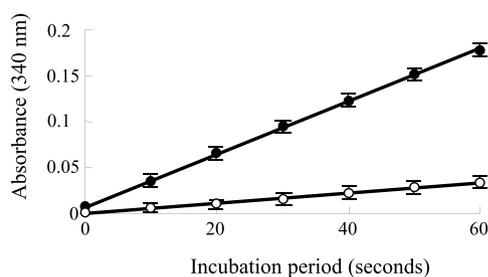


**Fig. 7** Predicted biosynthetic pathway of mannosylglycerate in genus *Pyrococcus*. PMI, PMM, Man-1-P GTase, MPGS and MPGP indicate phosphomannose isomerase, phosphomannomutase, mannose-1-phosphate guanylyltransferase, mannosyl-3-phosphoglycerate phosphatase and mannosyl-3-phosphoglycerate synthase, respectively.



**Fig. 8** Gene cluster for mannosylglycerate biosynthetic pathway predicted in genus *Pyrococcus*. In this figure gene clusters from three *Pyrococcus* species are shown. Within the arrows in top line, sizes of gene products are indicated. Within the arrows in the second and third lines identity of each similar gene in *P. horikoshii* is shown. Under each arrow gene ID is shown.

由来のものについて実験的解析に取り組み、すでに報告を行ってきた (Akutsu *et al.*, 2005). 以上のゲノム情報の実験的解析から, *P. horikoshii* で本生成経路が機能していることは十分予想されるが, 最後に残った最初と三番目の反応を触媒するバイファンクショナルな蛋白質・酵素として, 相同性の比較から一つの候補蛋白質 PH0925 蛋白質が見いだされてきた. この PH0925 蛋白質が有している酵素活性の一つ, ホスホマンノースイソメラーゼ活性についての実験的解析結果を示す. Fig. 9 に示す様に, 本 PH0925 蛋白質を反応液に加えた場合のみ, 反応時間によって吸光度の上昇がみられることから, 本 PH0925 蛋白質は, 確かにホスホマンノースイソメラーゼ活性を有していることが示された (Akutsu *et al.*, 2015). その比活性は  $28.8 \pm 1.8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$  であった.



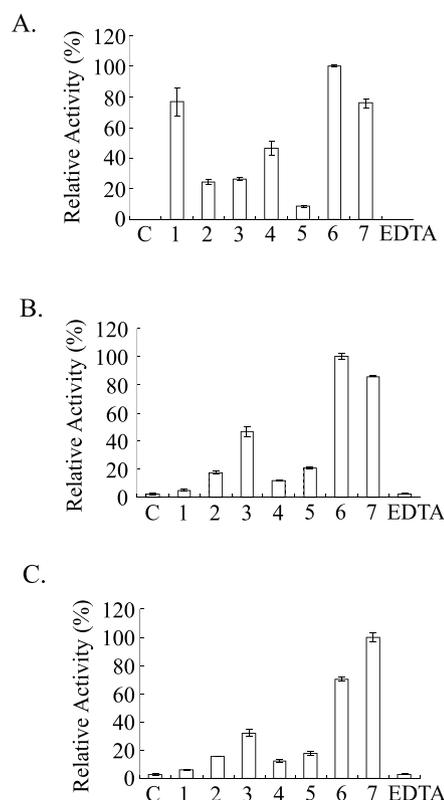
**Fig. 9 Absorbance at 340 nm during PMI reaction.** Absorbance at 340 nm was measured after incubation periods indicated. The closed (●) and open circles (○) respectively indicate absorbance for the reaction in the presence or absence of the PH0925 protein (2  $\mu\text{g}$ , 0.058 U). All experiments were repeated three times.

**Table 2** Substrate specificity of the forward reaction of the Sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activity of the PH0925 protein

Nucleotide substrate	Sugar-1-phosphate substrate	Specific activity $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$
GTP	$\alpha$ -D-Mannose-1-phosphate	$10.2 \pm 0.4$
ATP		$0.8 \pm 0.0$
CTP		$0.8 \pm 0.0$
UTP		$0.8 \pm 0.0$
dGTP		$8.2 \pm 0.5$
dATP/dCTP/dTTP		ND
GTP	$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphate	$5.2 \pm 0.4$
dGTP		$0.2 \pm 0.1$
ATP/CTP/UTP/dATP/dCTP/dTTP		ND
GTP	$\alpha$ -D-Glucosamine-1-phosphate	$7.3 \pm 0.7$
dGTP		$0.5 \pm 0.1$
ATP/CTP/UTP/dATP/dCTP/dTTP		ND
GTP/dGTP	Fructose-1-phosphate	ND
	$\alpha$ -D-Galactose-1-phosphate	ND
	N-Acetyl-D-glucosamine-1-phosphate	ND

ND indicates non-detectable.

一方, マンノース-1-リン酸と GTP を結合する活性についても, 生成物である GDP-マンノースが検出されたことから, 本 PH0925 蛋白質がこの活性を有していることが確認された. さらに興味あることに, Table 2 に示すように, この PH0925 蛋白質は, マンノース-1-リン酸を糖-1-リン酸基質とした場合, 全ての NTP およびデオキシ GTP (dGTP) も基質として利用できることが明らかとなった. さらに本 PH0925 蛋白質は, 糖-1-リン酸基質としてグルコース-1-リン酸およびグルコサミン-1-リン酸を GTP および dGTP と結合させることが出来ることも明らかになった. グルコサミン-1-リン酸と GTP を結合する酵素活性およびグルコース-1-リン酸と GTP を結合する活性は, 本来予測されたマンノース-1-リン酸と GTP を結合する活性の約 70%, 50% 程度の活性として



**Fig. 10 Sugar-1-P nucleotidyltransferase activity of the recombinant PH0925 protein in the presence of different metal ions.** The Sugar-1-P nucleotidyltransferase activity for three substrates, Man-1-P (A), Glc-1-P (B) and GlcN-1-P (C), were measured. Relative activity is shown as a percentage of the maximum activity obtained for each substrate. C, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and EDTA indicate addition of no metal ions, addition of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and EDTA, respectively. All experiments were repeated three times.

見出されてきた。これら多様な基質を代謝できる性質を有することは、配列の相同性からだけでは見出すことが出来ない特徴である (Akutsu *et al.*, 2015)。

さらに、この糖-1-リン酸と GTP とを結合する活性には 2 価の金属イオンの存在が必須であるが、 $\text{Cu}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  という金属イオンによって活性が大きく促進されるという特徴を有する。この特徴はバクテリア由来の類縁酵素が有する性質と大きく異なるものである。また、基質の種類によって金属イオンによる影響の違いが見られる。Fig. 10 に示すように、例えばマンノース-1-リン酸を基質にする場合には、 $\text{Mg}^{2+}$  の添加で大きな活性の促進が見られるが、他の二つの基質では  $\text{Mg}^{2+}$  はほとんど有効に機能しない。一方、グルコース-1-リン酸と GTP を結合する活性の促進に最も有効に働くのは、 $\text{Cu}^{2+}$  だが、グルコサミン-1-リン酸と GTP を結合する活性の場合には、 $\text{Zn}^{2+}$  が最も活性を促進する。これらの特徴も配列の相同性からは推定出来ない特徴であり、実験的な解析・活性の確認を行って初めて明らかになったことである。

これら 3 つの蛋白質の例で示された様に塩基配列が決定されて、その中に見出された遺伝子の機能を推定するために、配列をデータベースと比較することは重要な取組の一つであるが、実際にその遺伝子産物を生産・精製して実際の機能を実験的に解明することは容易にゲノム情報が決定出来る現在でも非常に重要なものと言える。今回の解析から、たとえ相同性の比較から機能が推定されていたとしても、それは機能未知遺伝子だと言えるのではないかと考える。

## 要 約

ゲノム情報中に見出される遺伝子の機能は既存のデータとの配列比較で、似た配列が存在すると機能も似ていると推定している。しかし、この相同性解析で推定されている機能・酵素活性と実際に実験的に解析された機能・酵素活性が異なる例が数多く見出されてきている。そこで、超好熱アーキアが有する糖代謝関連酵素の内で相同性によって機能が推定されているものについて、実験的な解析を行い本来の機能・酵素活性・特徴を明らかにした。グルタミン：フルクトース-6-リン酸アミノ基転移酵素については、遺伝子上の開始コドンの 3 残基分 C 末端側に存在する GTG コドンから生産した組換え蛋白質からのみ活性が見いだされた。また、超好熱アーキア *S. tokodaii* に見いだされた唯一のリン酸化糖ムターゼ蛋白質には、ホスホグルコ・ホスホマンノムターゼの他にホスホグルコサミンムターゼ活性も存在することが確認された。また、超好熱アーキア *P. horikoshii* 由来のホスホマンノースイソメラーゼとマンノース-1-リン酸と

GTP を結合する活性を有すると推定された PH0925 蛋白質からはホスホマンノースイソメラーゼ活性と共に、マンノース-1-リン酸・グルコース-1-リン酸・グルコサミン-1-リン酸という複数の基質を GTP 或いは dGTP と結合する活性が見いだされた。これらの実験的解析で得られた機能や酵素活性に関するデータから、たとえ相同性からその機能が推定されていても実験的解析が重要だということが示された。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Kawarabayasi, Y. The thermostable and multi-functional enzymes catalyzing sugar molecules identified from thermophilic Archaea, International Conference on Microorganisms in Environmental Management and Biotechnology, July 2011. Bhopal, India
- 2) Kawarabayasi, Y. Characterization of the thermostable enzymes contributing to the sugar-nucleotide molecule production from acidothermophilic Archaeon, *Sulfolobus tokodaii*, and its application, Thermophiles 2013, September 2013. Regensburg, Germany
- 3) Kawarabayasi, Y. Characterization of Archaeal enzymes with thermostability for enzymatic production of nucleotide-sugar molecules, Enzyme Engineering XXII, September 2013. Toyama, Japan
- 4) 河原林 裕. アーキアゲノム情報に基づく糖代謝経路の解明, 第14回極限環境生物学会, 2013年10月, 川崎
- 5) Kawarabayasi, Y. Genome based analyses of the sugar metabolism in thermophilic Archaea, 54th Annual Conference of Association of Microbiologists of India (AMI), November 2013. Rohtak, India
- 6) 河原林 裕. 極限環境微生物ゲノム情報に隠れている様々な情報の探索・発掘, 第5回寄付分野「微生物新機能開発学研究室」講演会, 2014年2月, 札幌
- 7) 河原林 裕. 極限環境微生物ゲノム情報を用いた新規糖代謝関連酵素の開発, 未来創生微生物学寄附講座シンポジウム, 2014年4月, 福岡
- 8) Kawarabayasi, Y. Confirmation of the UDP-GlcNAc biosynthesis pathway in Archaea by experimental analyses of enzymatic activities, Molecular Biology of Archaea 4, May 2014. Paris, France
- 9) 河原林 裕. ゲノム情報中には見出されない代謝系の実験的同定, UDP-GlcNAc 生合成系を例に, 第27回日本 Archaea 研究会講演会, 2014年7月, 草津, 滋賀
- 10) Kawarabayasi, Y. Experimental confirmation of the archaeal UDP-GlcNAc biosynthetic pathway unpredicted from the genomic data, 7th International Congress on Biocatalysis Biocat2014, September 2014. Hamburg, Germany
- 11) Kawarabayasi, Y. Experimental confirmation of the UDP-GlcNAc biosynthetic pathway, which was not predicted from the genomic data of thermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology, November 2014. New Delhi, India

- 12) Kawarabayasi, Y. Characterization of the UDP-GlcNAc biosynthetic pathway in Archaea by experimental confirmation of each enzymatic activity, 2014 SFG & JSCR Joint Meeting, November 2014. Hawaii, USA
- 13) Kawarabayasi, Y. Experimental discovery of the UDP-GlcNAc biosynthetic pathway unpredicted from the genomic data of a Crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii*, Active Enzyme Molecule 2014, December 2014. Toyama, Japan
- 14) Kawarabayasi, Y. Confirmation of the sugar metabolic pathway by functional analysis of the estimated enzymes within the genomic information of the thermophilic archaea, Thermophiles 2015, September 2015. Santiago, Chili
- 15) Kawarabayasi, Y. Importance of the functional analyses on enzymatic activities and metabolic pathways for utilization of the thermophilic archaeal genomic data, Molecular Biology Society of Japan, December 2015. Kobe, Japan
- 16) 河原林 裕. 超好熱アーキア由来糖代謝関連酵素のユニークな特徴, 微生物学の新たな発展, ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム, 2015年12月, 宮崎

#### 原著論文

- 1) Akutsu, J., Zhang, Z., Morita, R., & Kawarabayasi, Y. 2015. Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles* **19**: 1077–1085.

#### 総説

- 1) Yoshimune, K., and Kawarabayasi, Y. 2013. Sugar Metabolic Enzymes In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, ed. Satyanarayana, T., Littlechild, J. & Kawarabayasi, Y., Springer, pp. 589–610.
- 2) 河原林 裕. 2012. 耐熱性糖代謝酵素の解析と応用, 極限環境生物の産業展開 第5章第6節, 今中忠行監修, シーエムシー出版, pp.160–176.
- 3) Kawarabayasi, Y. 2012. The Thermostable and Multi-functional Enzymes Catalyzing Carbohydrate Molecules Identified from Thermophilic Archaea In “Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology” ed. Satyanarayana, T., Johri B. N., & A. Prakash, A. Springer, pp. 469–485.

#### 謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄付金による援助のもと行われたもので、ここに感謝の意を表したい。また、本研究への九州大学大学院農学研究院大島敏久教授のご支援とご協力に感謝の意を表したい。さらに本研究は、協力講座（微生物遺伝子資源学分野、生物化学分野、蛋白質科学分野）の皆様、当寄付講座に在籍したポスドク・技術補佐員等の職員並びに教官の皆さん、当分野で実質的な研究を行った大学院生・学部生の皆さんの

ご協力の元で成し遂げられたもので、ここに感謝の意を表したい。

#### 文 献

- Akutsu, J., Zhang, Z., Tsujimura, M., Sasaki, M., Yohda, M. & Kawarabayasi, Y. 2005. Characterization of a thermostable enzyme with phosphomannomutase/phosphoglucomutase activities from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J. Biochem.* **138**: 159–166.
- Akutsu, J., Zhang, Z., Morita, R. & Kawarabayasi, Y. 2015. Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles* **19**: 1077–1085.
- Empadinhas, N., Marugg, J., Borges, N., Santos, H. & da Costa, MS. 2001. Pathway for the synthesis of mannosylglycerate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. Biochemical and genetic characterization of key enzymes. *J. Biol. Chem.* **276**: 43580–43588.
- Namboori, S.C. & Graham, D.E. 2008. Acetamido sugar biosynthesis in the Euryarchaea. *J. Bacteriol.* **190**: 2987–2996.
- Rashid, N., Kanai, T., Atomi, H. & Imanaka, T. 2004. Among multiple phosphomannomutase gene orthologues, only one gene encodes a protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities in *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **186**: 6070–6076.
- Ray, W.K., Keith, S.M., DeSantis, A.M., Hunt, J.P., Larson, T.J., Helm, R.F. & Kennelly, P.J. 2005. A phosphohexomutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is covalently modified by phosphorylation on serine. *J. Bacteriol.* **187**: 4270–4275.
- Sakuraba, H., Yoshioka, I., Koga, S., Takahashi, M., Kitahama, Y., Satomura, T., Kawakami, R. & Ohshima, T. 2002. ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **277**: 12495–12498.
- Suzuki, T., Iwasaki, T., Uzawa, T., Hara, K., Nemoto, N., Kon, T., Ueki, T., Yamagishi, A. & Oshima, T. 2002. *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles* **6**: 39–44.
- Yamagishi, A. & Oshima, T. 1990. Circular chromosomal DNA in the sulfur-dependent archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1133–1136.
- Zhang, Z., Tsujimura, M., Akutsu, J., Sasaki, M., Tajima, H. & Kawarabayasi, Y. 2005. Identification of an extremely thermostable enzyme with dual sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from an acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Biol. Chem.* **280**: 9698–9705.
- Zhang, Z., Akutsu, J. & Kawarabayasi, Y. 2010. Identification of novel acetyltransferase activity on the thermostable protein ST0452 from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Bacteriol.* **192**: 3287–3293.



## 活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析

石野 園子, モハマド ダダシプール, 河原林 裕

九州大学大学院農学研究院極限環境微生物ゲノム機能開発学

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

### Identification of novel proteins or enzymes by using necessary or detected activity or functions

Sonoko Ishino, Mohammad Dadashipour, Yutaka Kawarabayasi

Laboratory of Functional Genomics of Extremophiles, Graduate School of Agriculture, Kyushu University  
Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

In the genomic data of thermophilic archaea, some necessary genes are missing when compare to the metabolic pathway. As the missing genes fructokinase and epimerase linked between phosphoglucosamine pathway and phosphogalactosamine pathway were detected in the cell-free extract of *Sulfolobus tokodaii*. Thus purification of these proteins was attempted. Phospho amino-sugar epimerase was successfully purified and the encoding gene was identified from N-terminus sequence. As this activity has not been detected from any organisms so far, this is the first isolation of this novel activity. This result indicates that biochemical approach is important and powerful for recognition on the genomic data.

To maintain genome stability, all living organisms have DNA repair systems. We discovered a novel endonuclease, which cleaves the 5' side of deoxyinosine (dI), from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. The novel endonuclease, designated as Endonuclease Q (EndoQ), recognizes uracil, abasic site and xanthine, as well as hypoxanthine, and cuts the phosphodiester bond at their 5' sides. To understand the functional process involving EndoQ, we searched for interacting partners of EndoQ and identified Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). The EndoQ activity was clearly enhanced by addition of PCNA *in vitro*. The physical interaction between the two proteins through a PIP-motif of EndoQ is important. These findings provide us a clue to elucidate a unique DNA repair system in Archaea.

Ribonuclease P (RNase P) is a ribonucleoprotein that catalyzes the processing of 5' leader sequences from tRNA precursors (pre-tRNAs) in all living cells. Recent studies have revealed that eukaryotic RNase Ps are involved in processing of small and long non-coding RNAs (ncRNAs), and also act as a transcription factor of RNA polymerases I and III. To gain insight into biological functions of archaeal RNase Ps, we prepared archaeal mutants KUW $\Delta$ P3, KUW $\Delta$ P8, and KUW $\Delta$ P16, in which the gene segments encoding stem-loops containing helices P3, P8 and P16 in RNase P RNA (TkopRNA) of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KUW1 were deleted, respectively. Phenotypic analysis showed that KUW $\Delta$ P3 and KUW $\Delta$ P16 grew slowly as compared to the wild-type strain KUW1, while KUW $\Delta$ P8 had no difference from the wild-type KUW1. Moreover, quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and Northern blots analysis of KUW $\Delta$ P3 showed that the accumulation of unprocessed transcripts for pre-tRNAs to a larger extent than that of the wild-type KUW1. Whole-transcriptome analysis of KUW $\Delta$ P3 identified three gene clusters whose transcripts accumulated to larger amount in KUW $\Delta$ P3 than wild-type. A further study on the three gene clusters will allow us to establish the functions of archaeal RNase Ps.

Key words: hyperthermophilic archaea, genome information, purification, DNA repair, Ribonuclease P

---

E-mail: sonoko@agr.kyushu-u.ac.jp, dadashi\_2000@yahoo.com,  
kawarabayasi.yutaka@nifty.com

共同研究者：石野良純, 山上 健, 上田俊史, 末松光太郎,  
中島 崇, 木村 誠  
(九州大学大学院農学研究院)

本報告には、3つの項目が含まれるので、それぞれについて諸言・実験方法・結果および考察を記す。

## [I] 超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* からの糖代謝関連酵素の単離

### 諸 言

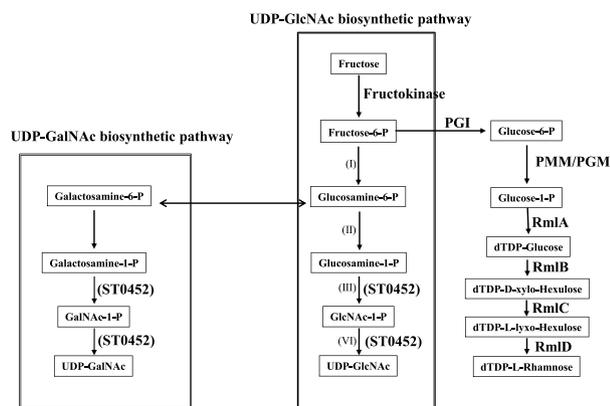
すでに機能が明らかとなっている蛋白質・遺伝子と配列上の相同性が見いだされてこない、いわゆる機能未知蛋白質・酵素について、ある一つの機能未知蛋白質・酵素を選択してその蛋白質の機能に辿り着くのは想像以上に困難だと思われる。大腸菌や枯草菌では、相同性の比較からは機能が推定出来ない未知遺伝子を含む全ての遺伝子について、各遺伝子を個々に破壊した遺伝子破壊株コレクションの作製がすでにゲノム解析初期に取り組まれた (Baba & Mori, 2008; Baba *et al.*, 2008; Ogasawara, 2000)。しかしながら機能未知遺伝子を個々に破壊しても、細胞の生存に必要な遺伝子の場合には破壊することで致死となることから破壊株は作製することができない。また破壊株の多くでは、表現型に顕著な違いは見出されてこなかった。残念ながら、網羅的な遺伝子破壊を行っても機能未知遺伝子の機能の解明に結びついた例は多くないのが現状である。その他に転写産物である mRNA の発現及び発現量をマイクロアレーを用いて解析するトランスクリプトーム解析 (Iwanaga *et al.*, 2014) や、全ての代謝物の動態を解析するメタボローム解析もゲノムの全塩基配列が決定された微生物では取り組まれてきた。それらの大掛かりな解析に取り組んでも、機能未知蛋白質・酵素・遺伝子の機能にたどり着くのは容易なことではないと感ぜられる。

当寄付講座が研究対象とした極限環境微生物、特に超好熱アーキアは、大腸菌・枯草菌等の真正細菌に比してそのゲノムサイズが小さくゲノムにコードされている遺伝子重複が少なく欠損変異体で類縁遺伝子による表現型相補がおこり難いというメリットがあると思われる。しかし、遺伝子破壊株の作製が可能な超好熱アーキアは *Thermococcus kodakarensis* のみ (Sato *et al.*, 2003) で、他の超好熱アーキアでは遺伝子破壊・遺伝子導入とも非常に難しく、ほぼ不可能である。また、条件の異なる培養下で発現量が変動する遺伝子群を明らかにすることで機能未知遺伝子の機能に迫れるのではないかという考えから、含有する糖の種類 (グルコース、ラムノース等) を変えた培地中での培養から得た全 RNA を用いたマイクロアレー解析に取り組んだ。しかしこの解析からは、発現が変動する遺伝子を見出すことは出来たが、同じ発現変動を示す遺伝子群が全て機能未知遺伝子であったり、

非常に多数の遺伝子が同じ発現変動パターンを示すことから、このマイクロアレー解析の結果からだけでは、機能未知遺伝子の機能に辿り着くことは出来なかった。

そこで、再度ゲノム情報とゲノム情報から構築されている代謝経路の情報を比較したところ、代謝上必要だと思われる遺伝子・酵素がゲノム情報中には見出されていない場合があった。例えば、元々超好熱アーキア *S. tokodaii* のゲノム情報中には相同性の比較からフルクトースをリン酸化する機能を有するであろうフルクトキナーゼの存在が推定されていた。しかしながら、本遺伝子産物を大腸菌内で生産した組換え蛋白質からは、予測されたフルクトキナーゼ活性は検出されず、2-ケト-3-デオキシグルコネートキナーゼ活性が実験的に確認された (Ohshima *et al.*, 2007)。この実験結果とゲノム情報を総合すると、本超好熱アーキアにはフルクトキナーゼが存在しないことになる。一方、本超好熱アーキア *S. tokodaii* は、本来グルコースを分解してエネルギーを獲得する際にグルコースをリン酸化しない特殊な代謝経路を用いていることが知られていた (Kim & Lee, 2005)。また、ゲノム情報中にはグルコキナーゼ遺伝子は相同性からは見出されてこなかった。しかし、活性から精製に取り組んだところ、実は機能未知遺伝子がコードする蛋白質がグルコキナーゼの活性を有することがすでに報告されている (Nishimasu *et al.*, 2006)。

一方、糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の実験的解析から本アーキア *S. tokodaii* には UDP-*N*-アセチルガラクトサミンを生合成する代謝経路が、一般的なバクテリアに存在する UDP-*N*-アセチルグルコサミン生合成経路と同様に存在することが推定された (Zhang *et al.*, 2010)。本糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素はその最後の2段階の反応、ガラクトサミン-1-リン酸にアセチル CoA のアセチル基を転移させて *N*-アセチルガラクトサミン-1-リン酸を生成する反応、およびその *N*-アセチルガラクトサミン-1-リン酸と UTP とを結合させて UDP-*N*-アセチルガラクトサミンを合成する反応を触媒することが出来る。Fig. 1 の二重線内に示す代謝経路が糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の実験的機能解析の結果、超好熱アーキア *S. tokodaii* 内に存在することが示唆されている。UDP-*N*-アセチルガラクトサミン生合成代謝経路である。UDP-*N*-アセチルグルコサミンの生合成経路と同様の反応が、ガラクトサミン-1-リン酸代謝経路についても存在するとすれば、現在までに実験的に確認されているガラクトサミン-1-リン酸の上流にガラクトサミン-6-リン酸、さらにその上流に UDP-*N*-アセチルグルコサミン生合成経路でのフルクトース-6-リン酸に対応するリン酸化糖が



**Fig. 1 Predicted metabolic pathway of glucosamine and galactosamine derivatives in *Sulfolobus tokodaii*.** The pathways shown within the single and double box respectively indicate UDP-*N*-acetylglucosamine and UDP-*N*-acetylgalactosamine biosynthetic pathways.

存在することとなる。しかし、このリン酸化糖は、フルクトースの様な一般的な糖ではなく希少な糖となる。そこで、可能性としてUDP-*N*-アセチルグルコサミン生合成経路の中間産物がUDP-*N*-アセチルガラクトサミン生合成経路で利用される可能性があるのではないかと推定した。

以上、超好熱アーキア *S. tokodaii* には、必要だと推定される酵素・蛋白質の中で糖代謝に関連するものとして、フルクトキナーゼおよびリン酸化グルコサミンとリン酸化ガラクトサミンを変換するエピメラーゼ酵素の存在が推定された。そこで、これらの酵素・蛋白質が実際に *S. tokodaii* の菌体中に存在するか？存在するのなら精製することで、これまで機能未知であった遺伝子・蛋白質の機能を解明できると期待されたので、これらの精製に取り組んだ。

## 実験方法

### 材料

精製元のアーキアとして超好熱アーキア *S. tokodaii* JCM 10545 (Suzuki *et al.*, 2002) を用いた。ゲノム DNA は、既に報告されている方法 (Yamagishi & Oshima, 1990) により調製した。組換え蛋白質の発現のため大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株を用いた。

### 活性の検出方法

フルクトキナーゼ活性については、100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 5 mM フルクトー

スを含む溶液 135  $\mu$ l を 80  $^{\circ}$ C で 3 分保温後、無細胞抽出液またはクロマト分画液 15  $\mu$ l を加えて反応を開始した。この反応液を 80  $^{\circ}$ C で 15 分保温後、水冷により反応を停止させた。この反応液から蛋白成分を除くために、ミリポア (Amicon Ultra-0.5 centrifugal Filter) で限外濾過後の透過サンプルをイオンクロマトグラフィーでの分析に供した。

リン酸化アミノ糖エピメラーゼ活性については、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM リン酸化アミノ糖を含む溶液 135  $\mu$ l を 80  $^{\circ}$ C で 3 分保温後、無細胞抽出液またはクロマト分画液 15  $\mu$ l を加えて反応を開始した。この反応液を 80  $^{\circ}$ C で 15 分保温後、水冷により反応を停止させた。この反応液から蛋白成分を除くために、ミリポア (Amicon Ultra-0.5 centrifugal Filter) で限外濾過後の透過サンプルをイオンクロマトグラフィーでの分析に供した。

サーモフィッシャー社製、電気化学検出器を装着したイオンクロマトグラフィー装置に CarboPac PA10 カラムを装着して、メーカー推奨の方法で分析を行った。

### 精製手法

フルクトキナーゼについては、硫安沈殿、Toyopearl-DEAE カラム、HiTrap Q カラム、HiTrap-Phenyl カラム、Toyopearl-Butyl カラム、Mono Q カラムを用いて精製を進めた。

リン酸化アミノ糖エピメラーゼについては、硫安沈殿、Toyopearl-DEAE カラム、HiTrap Q カラム、HiTrap-Phenyl カラムを用いて精製を行った。これらのカラムについては、メーカーの推奨の条件で使用した。

### 蛋白質の N 末端アミノ酸配列の決定

SDS-PAGE 法で分離した蛋白質を PVDF 膜に転写し、その膜を用いて島津の自動アミノ酸シーケンサーで分析を行った。反応・分析条件はメーカー推奨の条件で行った。

### 組換え体蛋白質の生産

自動シーケンサーを用いて得られた N 末端のアミノ酸配列から推定された遺伝子の塩基配列を元に、遺伝子領域 PCR 増幅用プライマーを設計した。5' 末端に相当するプライマーには開始コドンのとなりに Nco I 部位を、3' 末端に相当するプライマーには制限酵素 Xho I 部位を付加する形のプライマーを設計した。PCR 増幅させた遺伝子領域断片を制限酵素 Nco I および Xho I で切断し、同じ制限酵素で切断された pET23d ベクターに挿入した。塩基配列解読により最終的な確認を行い、各発現ベクターとした。

塩基配列を確認された本エピメラーゼをコードする遺伝子を持つ発現ベクターを大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株に形質転換することで、組換え蛋白質として目的の遺伝子産物を生産させた。アンピシリンを加えた液体 LB 培地中で、形質転換した大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL を 37℃ で培養し、波長 600 nm での吸光度が 0.6–0.8 になるまで生育させ、そこに終濃度 23.8 μg/mL になるように IPTG を加え、さらに 37℃ で 6 時間培養を継続して、蛋白質発現の誘導を行った。10,000×g、15 分の遠心分離で菌体を集菌し、洗浄後、菌体の 4 倍量の緩衝液に懸濁した後、この菌体懸濁液を超音波処理により破碎した。破碎液を 15,000×g、15 分間遠心分離し、上清に対し 80℃ 10 分間の加熱処理を行った。再度 15,000×g、15 分間遠心分離した。His タグを有する蛋白質なので、その後 Ni キレートカラムを用いた精製を行った。

## 結果および考察

### フルクトキナーゼ

本アーキアの無細胞抽出液の中にフルクトキナーゼ活性が存在するか確認したところ、リン酸化フルクトースをわずかながらも検出したので、精製に取り組んだ。DEAE カラムでは 12–17 番目のフラクションに、次の HiTrap Q カラムでは、24–31 番目のフラクションに、その後 HiTrap-Phenyl カラム、HiTrap-Butyl カラム、Mono Q カラムによる精製を行ったが、この段階で、活性のある画分に含まれる蛋白質の種類は余り減らなかった。各蛋白質を PVDF 膜にプロットして切り出し、別々のサンプルとして、自動アミノ酸シーケンサーで各蛋白質の N 末端のアミノ酸配列を決定した。その結果、すでにヘキソキナーゼとして報告されている蛋白質はこの画分には含まれていないことが判った。このことは、本フルクトキナーゼは、これまでに知られていない全くの新規遺伝子だと推測される。今後、N 末端の配列から推定される遺伝子を組換え蛋白質として生産させ、どの遺伝子が実際にフルクトキナーゼ活性を有しているかの確認を行っていく予定である。

### リン酸化アミノ糖エピメラーゼ

最初に無細胞抽出液中にリン酸化アミノ糖の糖部分を変換するエピメラーゼ活性があるか確認を行った。その際には、グルコサミン-6-リン酸とグルコサミン-1-リン酸という二つの候補が考えられた。そこで、グルコサミン-1-リン酸または、グルコサミン-6-リン酸を反応系に加えた場合の反応を進行させ、活性の確認を行った結果、グルコサミン-1-リン酸を基質として加えた場合には、分析

の際の溶出パターンに全く変化がなかった。しかし、グルコサミン-6-リン酸を基質として加えた反応系では、未知のピークが検出された。

現在、ガラクトサミン-6-リン酸は市販されていない。そこで、市販の標品を標準物質として利用し、溶出パターンの同一性から本反応の生成物を同定する手法を用いることが出来なかった。そこで、本超好熱アーキアが有するリン酸化糖ムターゼが様々な基質のリン酸基の位置を変換できることから、Fig. 2(2) に示す反応を進行させることが可能ではないかと期待した。グルコサミン-6-リン酸を基質とした場合に期待されている反応は Fig. 2 に (1) で示す反応である。市販されているガラクトサミン-1-リン酸とムターゼ酵素を反応させた際の生成物とグルコサミン-6-リン酸に超好熱アーキア *S. tokodaii* の無細胞抽出液を反応させた際の生成物の溶出位置を比較した。同一の位置に溶出された場合には、無細胞抽出液中に確かに Fig. 2 の (1) の反応を司る酵素が存在することを示すことが出来る。そこで、ガラクトサミン-1-リン酸にムターゼを反応させた生成物の分析を行った。結果を Fig. 3 に示すが、(1) および (2) はおのおの、未反応のガラクトサミン-1-リン酸、グルコサミン-6-リン酸を分析したものである。(3) にガラクトサミン-1-リン酸にムターゼ酵素を反応させた場合の生成物の分析結果を示したが矢印の位置に新たにピークが表れていることが判る。(4) に、グルコサミン-6-リン酸に無細胞抽出液を反応させた場合の生成物の分析結果を示したが基質であるグルコサミン-6-リン酸のピークの右に新たなピークが確

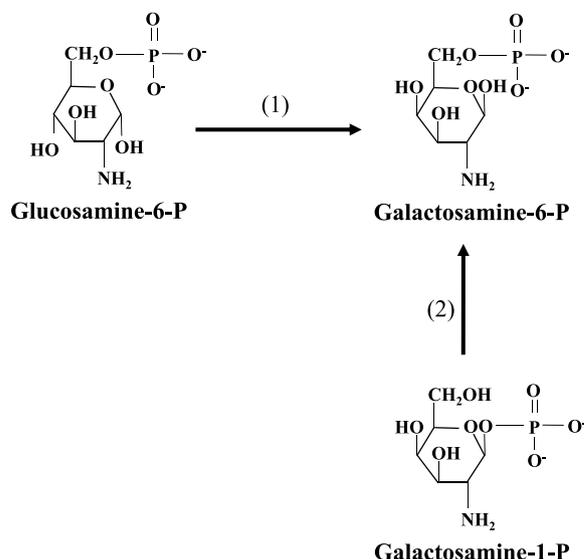
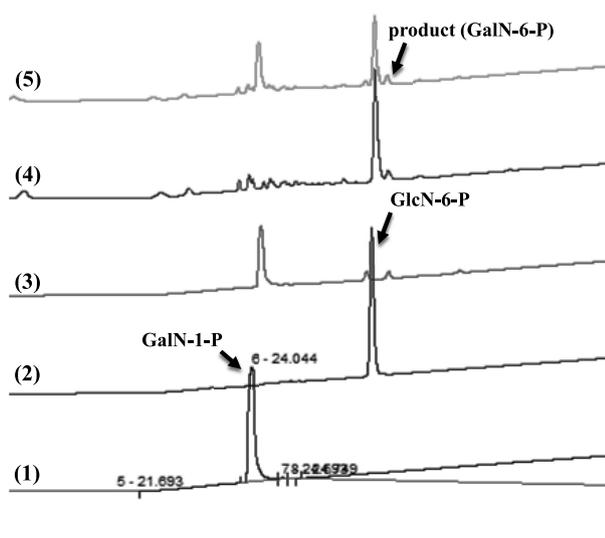
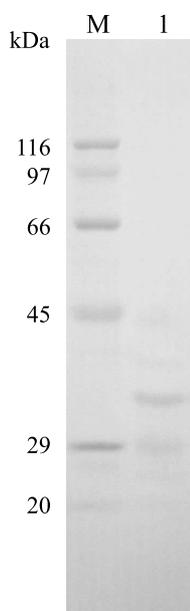


Fig. 2 The expected metabolic pathway used for HPLC analyses.



**Fig. 3 HPLC elution profile of products with two different proteins.** Standard galactosamine-1-phosphate is shown in (1), standard glucosamine-6-phosphate is shown in (2), products from galactosamine-1-phosphate by mutase is shown in (3), products from glucosamine-6-phosphate by extract is shown in (4), and mixed product of (3) and (4) is shown in (5).

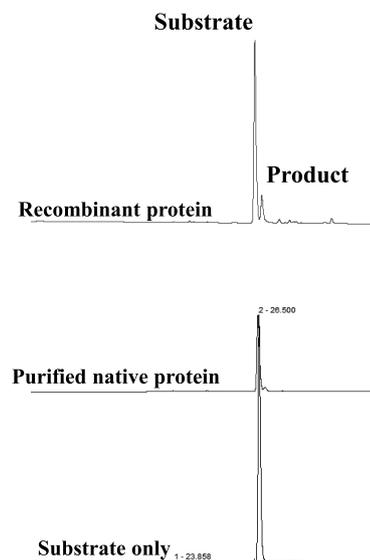


**Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the protein containing in the fraction purified as phosphorylated amino-sugar epimerase activity.** Lane M and 1 indicate molecular markers and the proteins in the fraction purified as phosphorylated amino-sugar epimerase activity, respectively.

認された。(3)と(4)の反応で生成された生成物が同一のものか確認するために、別々に反応させた(3)と(4)の反応液を混合して分析した。その結果を(5)に示すが、想定したピークは全く同じ位置に重なったことから、同一の生成物が二つの異なる反応で生成していることが示された。つまり、想定通り Fig. 2 に示す(1)の反応を触媒する酵素が無細胞抽出液中に存在することが確認された。そこで、本活性を指標に無細胞抽出液から本活性を有する蛋白質の精製を試みた。

本活性は DEAE カラムの洗浄画分に、次の HiTrap Q カラムでは 14-20 画分に、次の Hitrap-Phenyl カラムでも洗浄画分に回収された。しかし、この画分には主に 2 種類の蛋白質が含まれているだけだった (Fig. 4) ので、両方の蛋白質の N 末端のアミノ酸配列を解読した。得られたアミノ酸配列から同定された遺伝子の発現ベクターを構築したところ、耐熱性・可溶性の組換え蛋白質が容易に得られた。本組換え蛋白質に予想通りの活性があるか確認したところ、Fig. 5 に示す様に組換え蛋白質を用いて反応を進めた場合には、明らかに顕著なピークが確認できたことから、超好熱アーキア *S. tokodaii* 中には全く新規なグルコサミン-6-リン酸とガラクトサミン-6-リン酸を変換することが出来るエピメラーゼ活性を有する蛋白質の存在が確認された。

今回確認された新規リン酸化アミノ糖エピメラーゼ蛋白質をコードする遺伝子は、当初のゲノム情報公開時には機能未知遺伝子とされていたものであった。この、代



**Fig. 5 HPLC elution profiles of products with native and recombinant proteins.**

謝経路情報とゲノム情報を組み合わせて候補を選択して菌体無細胞抽出液から活性で精製するという古典的な生化学の手法が、現在の様なゲノム情報が多数存在する時代であっても有効なことが示された。本活性はこれまで市販されていなかったガラクトサミン-6-リン酸を生産するという応用的な面での開発にも期待が持たれる。

## [II] 新規 DNA 修復関連ヌクレアーゼ (EndoQ) の単離 諸 言

高温環境下においては、DNA の損傷が起きやすい。特に塩基の脱アミノ化によりシトシンがウラシルに、アデニンがヒポキサンチンに、グアニンがキサンチンになると複製時に変異導入の原因となる (Lindahl, 1993)。しかし超好熱菌は常温生物と同じように突然変異率を低く抑え太古の昔から現在まで自らの種を保存してきている。そのためには超好熱菌細胞の中で特殊な DNA 修復機構が働いているのではないかと想像される。我々はこれまで他の生物では知られていなかった新規のヌクレアーゼを発見した。 *Pyrococcus furiosus* の無細胞抽出液中にヒポキサンチンの 5' 側の DNA 鎖を切断する活性を発見しその活性を示す蛋白質を同定した。この酵素はヒポキサンチンだけでなく、他の脱アミノ化塩基であるウラシルやキサンチンについても同様に認識することがわかり *Thermococcales* の細胞の中で脱アミノ化塩基の修復を担う酵素群の一つであると予想される。これまでに知られている酵素とは相同性がなく新規の酵素として Endonuclease Q (EndoQ) と名付けた。 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は DNA 鎖上をスライドしながら表面に DNA に作用する蛋白質を結合してそれらが DNA に作用する際の足場を提供すると考えられている (Warbrick, 2000)。 *Pyrococcus abyssi* では EndoQ ホモログが PCNA と相互作用する可能性が示唆されている (Pluchon *et al.*, 2013)。そこで *P. furiosus* の EndoQ を用いて PCNA との相互作用を詳細に調べた。

## 実験方法

### 遺伝子クローニングおよび組換え蛋白質の調製

*P. furiosus* 由来 EndoQ (PfuEndoQ) をコードする遺伝子を挿入したプラスミド pET-PF1551 (Shiraishi *et al.*, 2015) を用いて site-directed mutagenesis kit (Agilent 社, 東京) により C 末端 (411-424) 欠失変異体 (PfuEndoQ ΔPIP) をコードする遺伝子を作製した。 PfuEndoQ WT, PfuEndoQ ΔPIP および *P. furiosus* 由来 PCNA (PfuPCNA) の組換え蛋白質の産生には大腸菌 BL21 (DE3) Codon-

Plus-RIL 株 (Agilent 社, 東京) を用いて、既報 (Cann *et al.*, 1999; Shiraishi *et al.*, 2015) の通りに複数のカラムクロマトグラフィーを経て高純度標品を得た。組換え蛋白質の濃度は 280 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数より算出した。計算に用いたモル吸光係数は PfuEndoQ WT, PfuEndoQ ΔPIP, および PfuPCNA がそれぞれ 47120, 45630, および 7450 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> である。

### 表面プラズモン分析 (SPR)

相互作用を解析するために Biacore J システム (GEヘルスケア) を用いて、精製した PfuPCNA 組換え蛋白質を CM5-チップに固定した。溶液 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 0.005 % Tween20 を用いて PfuEndoQ WT および PfuEndoQ ΔPIP を様々な濃度で添加した。

### DNA 基質および切断反応

デオキシイノシンを含むオリゴヌクレオチドの 5' 末端に Cy5 を付加した 45-I25 (5'-dCGAACTGCCTGGAA TCCTGACGACITGTAGCGAACGATCACCTCA) および相補鎖 45R (5'-dTGAGGTGATCGTTTCGCTACATGTCGT CAGGATTCC AGGCAGTTCG) をシグマジェネシスに合成依頼した。基質となる二本鎖 DNA は 45-I25 と 45R を 0.5 mM 酢酸マグネシウムを含む 40 mM Tris-acetate (pH 7.8) 溶液中でアニールして用いた。切断反応は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % Tween20, 0.4 M NaCl を含む 20 μL の反応溶液に、10 nM 基質 DNA と 2 nM PfuEndoQ WT または 2 nM PfuEndoQ ΔPIP を加えておこなった。 PfuPCNA を用いる場合は三量体として 0, 5, 10, 25, 50, 100 nM を添加した。 75 °C で 5 分間反応させた後、40 μL のホルムアミドを加えて TBE (89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA) 溶液中で 8 M 尿素を含む 12 % アクリルアミドゲル電気泳動に供して分離し Typhoon image analyzer (GEヘルスケア) で可視化した。

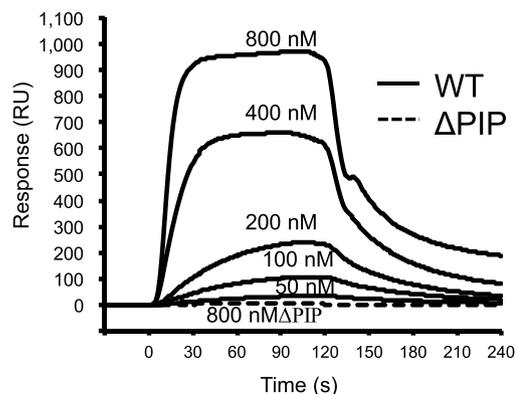
## 結果および考察

### EndoQ ホモログに見出される PIP-box モチーフ

アーキア由来 EndoQ ホモログのアミノ酸配列のアライメントを作成して調べたところ *Methanomicrobiales* を除く種の C 末端領域には PIP-box 様の配列が見つかった (Fig. 6)。 EndoQ はこのモチーフを介して PCNA と相互作用することが推定されたので、相互作用の様式およびそれが機能にどのように関与しているかについて調べるため PfuEndoQ の C 末端 (411-424) を欠失させた変異体を作製し PfuEndoQ ΔPIP とした。

PIP-box		consensus sequence		Q x x h x x A A	
Tko	EndoQ	409	Q	R S I T E F L	416
Ton	EndoQ	412	Q	T S L M K F L	419
Pfu	EndoQ	411	Q	R T L L Q Y I	418
Pab	EndoQ	409	Q	L N L M E F L	416
Mac	EndoQ	461	Q	K S L F D F -	467
Mma	EndoQ	461	Q	K S L F D F -	467
Mba	EndoQ	451	Q	S S L F D F -	457
Mja	EndoQ	776	E	V T L D R W L	783
Mig	EndoQ	383	Q	N T L D A W L	390
Mae	EndoQ	415	K	T T L D K W I	422
Mmari	EndoQ	385	K	L T L D S W V	392
Mvo	EndoQ	385	K	T T L E N W M	392
Mth	EndoQ	378	A	E T L D A Y F	385
Msm	EndoQ	389	L	T T L D N F -	395
Mka	EndoQ	407	Q	R T L D E L I	414
Nar	EndoQ	395	Q	K K L G E F -	401
Aar	EndoQ	409	Q	K N L F D Y K	416
Pfu	PolB	763	Q	V G L T S W L	770
Pfu	PolD2	1253	V	I S L D D F F	1260

**Fig. 6 Putative PIP-boxes in EndoQ homologs in Archaea.** PIP-box consensus sequence is shown on the top of the panel: Q, a glutamine residue (black background); x, any amino acid; h, hydrophobic residues (L, I or M; gray background); A, aromatic residues (F, Y or W; gray background). The residues consistent with the PIP-box consensus sequence were indicated by the same color. Tko, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 (BAD85076); Ton, *Thermococcus onnurineus* NA1 (ACJ15906); Pfu, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 (AAL81675); Pab, *Pyrococcus abyssi* GE5 (CAB49547); Mac, *Methanosarcina acetivorans* C2A (AAM04083); Mma, *Methanosarcina mazei* Go1 (AAM31501); Mba, *Methanosarcina barkeri* str. Fusaro (AAZ70511); Mja, *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (AAB98023); Mig, *Methanoterris igneus* Kol 5 (AEF96206); Mae, *Methanococcus aeolicus* Nankai-3 (ABR56895); Mmari, *Methanococcus maripaludis* C5 (ABO35878); Mvo, *Methanococcus voltae* A3 (ADI37103); Mth, *Methanothermobacter thermautotrophicus* str. Delta H (AAB85783); Msm, *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061 (ABQ87334); Mka, *Methanopyrus kandleri* AV19 (AAM01639); Nar, *Nanoarchaeota* archaeon SCGC AAA011-K22 (WP\_039268096); Aar, *Aenigmarchaeota* archaeon JGI 0000106-F11 (WP\_042665925). The sequences were aligned by ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Amino acid residue numbers of starting and end of PIP-boxes are indicated on the right and left of the sequences, respectively.



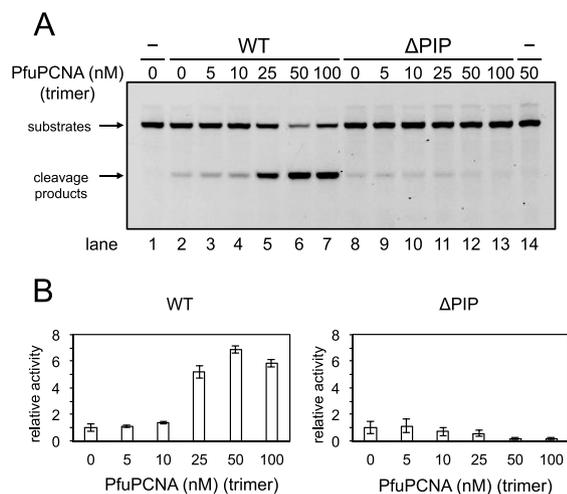
**Fig. 7 Physical interaction between PfuEndoQ proteins and PfuPCNA.** SPR analysis were conducted using a BiacoreJ system. PfuEndoQ WT at various concentrations (0, 50, 100, 200, 400 and 800 nM; solid lines) and ΔPIP (800 nM, a dotted line) were injected on the chip immobilized with PfuPCNA WT for 120 s in 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.005% Tween20 and 0.2 M NaCl.

#### PfuEndoQ と PfuPCNA 間の物理的相互作用

表面プラズモン分析において PfuPCNA を固定したチップを用いて PfuEndoQ WT および PfuEndoQ ΔPIP を添加して相互作用を解析した。Fig. 7 に示す通り、PfuEndoQ WT は明らかな陽性の応答を示し、濃度依存的にセンサーグラムの強度が増大した。一方 PfuEndoQ ΔPIP は 800 nM の高濃度で添加してもまったく応答を示さなかった。これらの結果より PfuEndoQ の C 末端に存在する PIP-box 様配列が、PfuEndoQ との相互作用に重要であることがわかった。

#### PfuPCNA による PfuEndoQ の切断活性の促進

EndoQ と PCNA の相互作用が細胞内のゲノム安定性維持にどのように働くのかを知るために PfuPCNA 存在下での PfuEndoQ WT および PfuEndoQ ΔPIP のデオキシノシンを含む二本鎖 DNA 基質に対する切断反応を調べた。PfuEndoQ WT が基質 DNA の 11% を切断する条件に対して PfuPCNA を添加していくと、濃度依存的に約 7 倍まで促進が見られた。一方 PfuEndoQ ΔPIP による基質 DNA の切断は PfuEndoQ WT と同等の 10% であるが、PfuPCNA による促進はまったく見られず、むしろ阻害に働いた (Fig. 8)。これらの結果は、PfuPCNA が PIP-box 様配列を介して PfuEndoQ の機能を促進することを示しており、細胞内においても両者は共に働くことが示唆される。EndoQ が関与する DNA 修復には PCNA が関わり効率的な修復に寄与していると予想される。



**Fig. 8 Cleavage activity of PfuEndoQ WT and  $\Delta$ PIP in the presence and absence of PfuPCNA.** 5'-Cy5-labeled 49-125 dsDNA substrates (10 nM) were incubated at 75 °C for 5 min. -, no enzyme (lane 1 and 14); WT, 2 nM PfuEndoQ WT (lane 2-7);  $\Delta$ PIP, 2 nM PfuEndoQ  $\Delta$ PIP (lane 8-13); the concentration of PfuPCNA was varied as indicated. Cleavage products were separated by 8 M urea-12% PAGE and visualized by an image analyzer, Typhoon Trio+ (GE Healthcare) and cleavage efficiencies were quantified by the software, ImageQuant TL (GE Healthcare).

### [Ⅲ] 超好熱アーキアからの新規 RNase P 基質の探索

#### 諸 言

Ribonuclease P (RNase P) は真正細菌, アーキア, そして真核生物にいたる 3つの進化系統ドメインに存在し, 前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5' 末端のプロセシング反応を触媒している (Walker & Engelke, 2006; Torres-Larios *et al.*, 2006). RNase P は, 触媒中心を担う一分子の機能性 RNA (pRNA) と触媒活性を補助する蛋白質サブユニットから構成されるリボ核蛋白質複合体である (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). 近年の研究結果から真正細菌や真核生物において RNase P は pre-tRNA のプロセシングを触媒するだけでなく, その他の機能を持つことが報告されている. 例えば, 真正細菌の RNase P では, ヒスチジンの生合成やラクトースの分解に関与するオペロンの mRNA や, 前駆体 4.5S RNA, リボスイッチなどの non-coding RNA (ncRNA) を基質として切断することが報告されている (Esakova & Krasilnikov, 2010). また, 真核生物では, 5S rRNA and 7SL RNA などの ncRNA の他に, lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) や

multiple endocrine neoplasia b (MEN-b) などの tRNA 様な構造を持つ RNA を基質とすることや (Wilusz *et al.*, 2008; Sunwoo *et al.*, 2009), RNA Polymelase I および III の転写制御因子として機能することが報告されている (Reiner *et al.*, 2006; Ishiguro *et al.*, 2002). 真正細菌および真核生物の RNase P については機能的な報告が多数なされているが, 本研究対象であるアーキア RNase P についてはそのような報告がまだない.

本研究では, アーキア RNase P の機能解明のために, 遺伝子操作系が確立されている超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (Tko) を実験対象とし (Morikawa *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 2003; Takemasa *et al.*, 2011), 遺伝子操作により生体内に存在する RNase P の活性を低下させた変異株の作製を試みた.

我々は *T. kodakarensis* と同じテルモコッカス属で遺伝学的に非常に近縁である超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Pho) 由来 RNase P を研究対象にし, そのサブユニットの構造と機能に関する研究を進めてきた. これまでの実験結果から, *P. horikoshii* 由来 RNase P の触媒中心を担う PhopRNA のステムループ構造の欠損が試験管内の再構築系において pre-tRNA 切断活性に寄与することを見出した (Ueda *et al.*, 2014). さらに, 末松らは, *T. kodakarensis* RNase P (TkoRNase P) の構成蛋白質が *P. horikoshii* RNase P (PhoRNase P) の相同蛋白質と切断活性において交換可能であることや, 結晶構造解析から相同蛋白質間で高い構造相関を持つことを見出した (Suematsu *et al.*, 2015). 以上のことから, *P. horikoshii* で蓄積してきた生化学的情報を *T. kodakarensis* に反映し, 遺伝子操作実験を行うことが可能であると考えた. すなわち, 変異株の作製に際し以前の生化学的な実験結果を *T. kodakarensis* 生体内の TkopRNA に適用することにした.

#### 実験方法

##### 野生株および変異株の培養条件

*T. kodakarensis* KOD1 株およびその変異株は, 85 °C の嫌気性条件下において培養した. 培地には ASW-YT 培地 (0.8×人工海水, 酵母エキス 5.0 g/L, トリプトン 5.0 g/L) を用い, 実験条件に応じて硫酸粉末 S<sup>0</sup> あるいはピルビン酸 5.0 g/L を添加した. また, 培地を嫌気条件に保つために Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 試薬を終濃度 0.05% になるように加え, 嫌気条件の確認にはレザズリン試薬を用いた. プレート操作には, ゲルライト 10 g/L (和光純薬, 大阪) を用いた. 培養液の濁度測定には, UV spectrometer mini photo 518R (タイテック, 越谷) を使用し, OD 660 nm を測定することで細胞増殖を評価した.

### 相同組替え用のプラスミドの構築

マーカー遺伝子である PyrF 遺伝子と TrpE 遺伝子を遺伝子工学的な手法により欠損した *T. kodakarensis* KUW1 株から、相同組替え法により TkopRNA 遺伝子の各ステムループを欠損させるためにプラスミド pUD $\Delta$ P3, pUD $\Delta$ P8, そして pUD $\Delta$ P16 を構築した。目的遺伝子である TkopRNA 遺伝子 (326 bp) の 5' 側の相同領域 (TK1793, 930 bp) と TkopRNA 遺伝子とそのプロモーター領域 (150 bp) を含んだ 3' 側の相同領域 (TK1791 と TK1792, 930 bp) を、Table 1 に示したプライマーセット (5FLG-F/5FLG-R と 3FLG-F/3FLG-R) を用いて PCR により増幅した。増幅したフラグメントを Hind III/Pst I と BamH I/EcoR I で制限酵素処理した後、pU-Ryo ベクターにクローニングし pUDRPR プラスミドを作製した。pUDRPR プラスミド上から TkopRNA 遺伝子の各ステムループを欠損するためにプライマーセット (RPR $\Delta$ P3-F/RPR $\Delta$ P3-R, RPR $\Delta$ P8-F/RPR $\Delta$ P8-R, そして RPR $\Delta$ P16-F/RPR $\Delta$ P16-R) を用いて PCR を行い、相同組替え用のプラスミド pUD $\Delta$ P3, pUD $\Delta$ P8, そして pUD $\Delta$ P16 を構築した。TkopRNA 遺伝子上の欠損領域は、それぞれ  $\Delta$ P3 は 24–34,  $\Delta$ P8 は 68–79, そして  $\Delta$ P16 は 240–261 である。また、マーカー遺伝子である PyrF 遺伝子を目的遺伝子である TkopRNA 遺伝子上流に来るように設計した。

RPR $\Delta$ P16-R) を用いて PCR を行い、相同組替え用のプラスミド pUD $\Delta$ P3, pUD $\Delta$ P8, そして pUD $\Delta$ P16 を構築した。TkopRNA 遺伝子上の欠損領域は、それぞれ  $\Delta$ P3 は 24–34,  $\Delta$ P8 は 68–79, そして  $\Delta$ P16 は 240–261 である。また、マーカー遺伝子である PyrF 遺伝子を目的遺伝子である TkopRNA 遺伝子上流に来るように設計した。

### TkopRNA 遺伝子の変異株の作製

KUW1 株に対して上記で作成したプラスミド pUD $\Delta$ P3, pUD $\Delta$ P8, および pUD $\Delta$ P16 を Sato らの論文を参考にして形質転換した (Sato *et al.*, 2003)。相同組替えが行われたかの確認には、PyrF 遺伝子の導入の有無と TkopRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (PFL-F/PFL-R と RPR-F/RPR-R) を用いて PCR を行うことでそれぞれ確認した。次に、各ステムループが欠損された菌体から、PyrF 遺伝子を除去するためにプラスミド pUDPyrF $\Delta$ P3, pUDPyrF $\Delta$ P8, および pUDPyrF $\Delta$ P16 を形質転換した。相同組替え株の選択には、形質転換した菌株を 0.75% 5-フルオロオロチン酸と 60 mM NaOH を含んだ ASW-YT 固形培地で生育させた後コロニー PCR を行うことで確認した。

**Table 1** Primer sets in this experiment

Primer	Sequence 5' to 3'
<b>Construction of Plasmid</b>	
5FLG-F	TGCAAGCTTACTTCAGICTCACGGCTAAGG
5FLG-R	AGGTGCAGTACACCTTTTCTTCGGAAGC
3FLG-F	AGGGATCCGAGCAAAAAGGAAAAGAGACC
3FLG-R	AGAATTCGACCCCTTTAAGGATGCAGTGC
RPR $\Delta$ P3-F	GGCTCTCGAGGAAGTCCGCCAC
RPR $\Delta$ P3-R	ACTTCCCTCGAGAGCCCCCGACCC
RPR $\Delta$ P8-F	CCGGCCGAGAGCCGGGCAACGG
RPR $\Delta$ P8-R	CCGGCCGCCCGGTGCGGTGGGC
RPR $\Delta$ P16-F	GGAGGGCCCGTGGTAGGCCGCTCAGTCG
RPR $\Delta$ P16-R	TACCACGGGCCCTCCCTCGGCCTTGACCC
<b>PCR analysis</b>	
PFL-F	TCGTGTGGCAACGGGAGTTCAGCTCG
PFL-R	GCTTTGGATGCTCTGAGAAGATGAGGGC
RPR-F	ACCTTTTAAACGTTCTTCAGGCGAG
RPR-R	CCGTAGCCCGCTTCTGTATCA
TEL-F	AAGCCCGTTGACCCCTTTGAAGCTCTACAGC
TEL-R	GATATGACCTCCGAACCGCGTCTTCAAGC
P29T-F	CGTCAGAAGGACTCAAACGCTCG
P29T-R	GCTCGAGTGCAGCCGCTCAGTGATG
<b>qRT-PCR</b>	
preGlu-F	CCCTCTGCTCTAATCTCGGACG
preGlu-R	GATTTGAACCCGGGTCCGGC
preVal-F	CGGTCCACCATCCTTGGGTTG
preVal-R	AACCCGGGACCTCCACCTTGT
preTyr-F	ATGGAACGGGTGCCCCAGTAGG
preTyr-R	AACCGGGACCTGCGGATCTAC
16Sr-F	TAGTCTGGCTGTAAAGGATGCG
16Sr-R	CTTAACGGCTTCCCTCCGGC
<b>Northern Blot analysis</b>	
Biotin-Tyr	GACCTGCGGATCTACAGTCCGCCCACTC

### KUW1 野生株および変異株からのトータル RNA の抽出

各菌株を ASW-YT+S<sup>o</sup> 培地に植菌し 85 °C で一晩前培養した。再度、培養液を ASW-YT+ピルビン酸培地に植菌し、目的の生育期まで 85 °C で静置培養した後に、4 °C で 5,000 rpm, 20 min 遠心し集菌した。集菌した菌体を TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, USA) に溶菌し -80 °C で保存した。トータル RNA の抽出は、TRIzol 試薬に溶菌したサンプルをキット推奨の手順に従い抽出した。

### 定量 RT-PCR 法による解析

抽出したトータル RNA に対して、Table 1 に示した目的遺伝子に特異的なプライマーを用いて、Prime Script<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase kit (タカラバイオ, 草津) で逆転写を行った後、LightCycler Nano System (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) を用いて SYBR Green I 法により検出した。また、解析にはサイクル比較法 ( $\Delta\Delta$ Ct 法) を採用し、遺伝子間の発現量の比較には相対定量法を導入した。その際、コントロール遺伝子として 16S rRNA を用いた。

### ノーザンブロット法による解析

抽出したトータル RNA から、より短い RNA フラグメントを分取するために NucleoSpin<sup>®</sup> miRNA (Macherey-

Nagel, Germany) を用いた。抽出したサンプルを 8M 尿素を含んだ 15% アクリルアミド変性ゲルに展開し, Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA) を用いて Hybond-N+ positively charged nylon membranes (GE healthcare, USA) に転写した。また検出には, tRNA<sup>Tyr</sup> のアンチコドンループに特異的なビオチン化されたプローブでハイブリダイゼーションを行った後, Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (Thermo Scientific, USA) をキット推奨の手順に従い検出した。

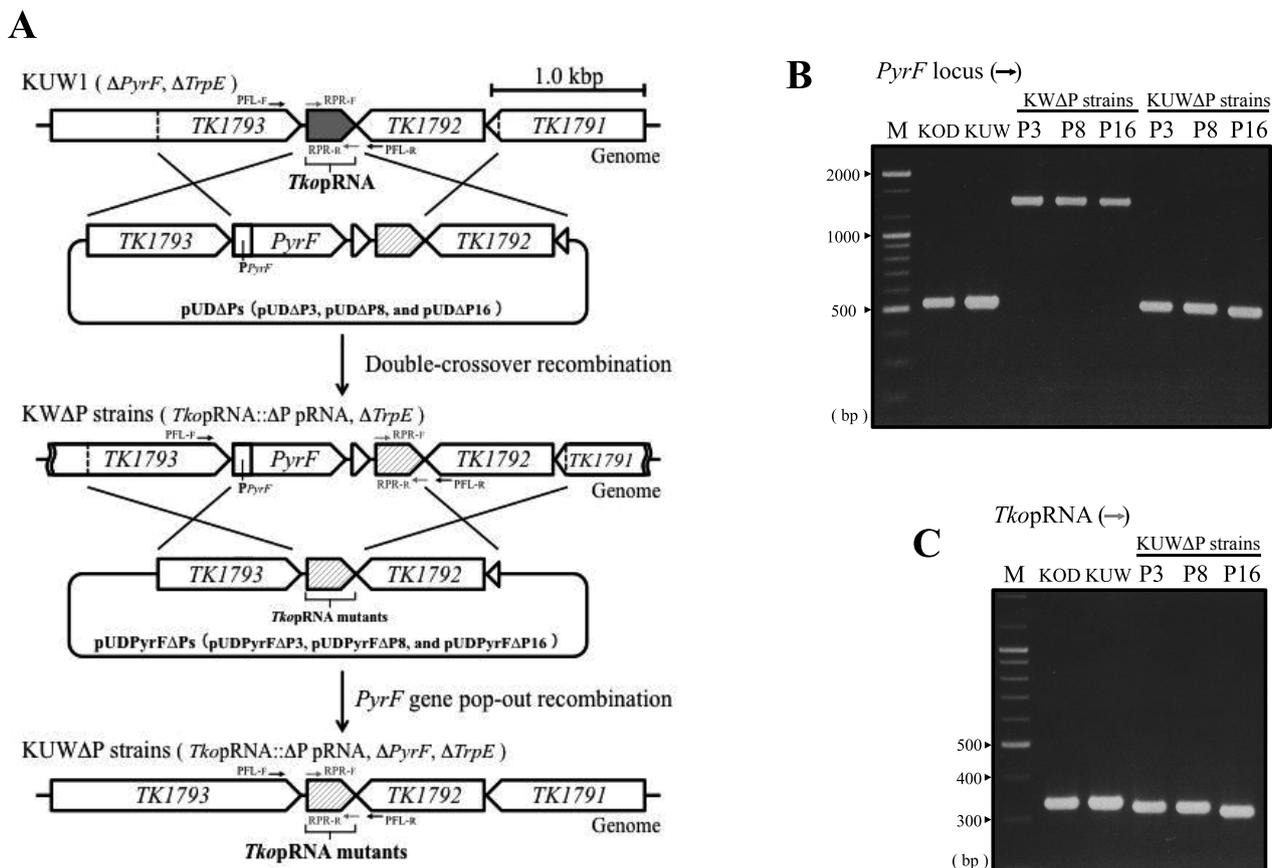
次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析  
 KUW1 野生株と KUWΔP3 株の対数増殖期 (7.5 hrs)

からトータル RNA を抽出し, Macrogen 社に次世代シーケンサーによる網羅的塩基配列を委託した。

### 結果および考察

RNase P の活性を低下させた変異株の作製

*P. horikoshii* 由来 RNase P の再構成実験の結果から, TkopRNA 上の P3, P8, そして P16 ステムループ構造の欠損が生体内の切断活性を僅かに低下するのに適していると考え, 相同組替え用のプラスミド (pUDΔP3, pUDΔP8, そして pUDΔP16) を作製し KUW1 株に対して形質転換を行った (Fig. 9A)。プラスミド上にはマーカー遺伝子を導入しており, その有無で形質転換および

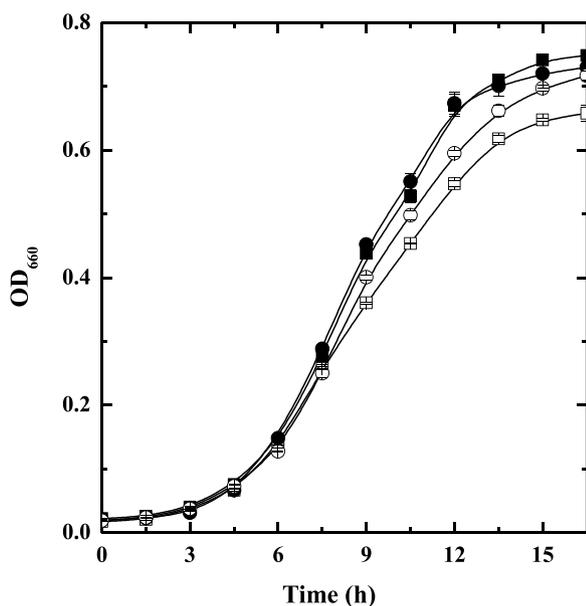


**Fig. 9 Preparation of *T. kodakarensis* mutants with TkopRNA deleted stem-loop.** A, Design of the plasmid for deletions of the TkopRNA gene by double-crossover recombination and *PyrF* gene Pop-out recombination. In the construct, the gene segment encoding TkopRNA was placed downstream of the *pyrF* gene. The genes encoding TkopRNA and its deletion mutants are shown in dark grey and light grey boxes, respectively, and other flanking genes including *PyrF* are in white boxes. PFL and RPR primer sets indicated by black and grey arrows were designed in the 5' and 3' flanking regions of *PyrF* and TkopRNA genes, respectively (Table 1). B and C, PCR analysis of *PyrF* locus (B) and the gene encoding TkopRNA (C) confirming deletion of the gene segments in KWΔP and KUWΔP strains. DNA size markers were run in lane M, and their sizes (bp) are indicated to the left of the gels. The results of PCR with *T. kodakarensis* KOD1 and KUW1 are indicated in lanes KOD and KUW, respectively. The results of PCR with KUWΔP3, KUWΔP8, and KUWΔP16 are indicated in lanes P3, P8, and P16, respectively.

相同組替えが行われたかの確認を行った。得られた KW $\Delta$ P 変異株 (KW $\Delta$ P3, KW $\Delta$ P8, KW $\Delta$ P16) に対してプライマーセット (PFL-F/PFL-R) を用いて PCR を行った結果、野生株よりも PCR 断片が長いことから目的の位置に PyrF 遺伝子が導入されていることが確認できた (Fig. 9B)。次に、得られた KW $\Delta$ P 変異株から PyrF 遺伝子を除去するためにプラスミド (pUDPyrF $\Delta$ P3, pUDPyrF $\Delta$ P8, そして pUDPyrF $\Delta$ P16) を形質転換した (Fig. 10A)。得られた KUW $\Delta$ P 変異株 (KUW $\Delta$ P3, KUW $\Delta$ P8, KUW $\Delta$ P16) に対して同様のプライマーセットを用いて PCR を行った結果、PCR 断片が短くなっていることから PyrF 遺伝子が除去されたことが確認できた (Fig. 10B)。また、ステムループ構造が欠損されているかの確認を行うために TkopRNA に特異的なプライマーセット (RPR-F/RPR-R) を用いて PCR を行った結果、野生株よりも僅かに短い PCR 断片が確認できた (Fig. 9C)。そこで、得られた変異株 KUW $\Delta$ P3, KUW $\Delta$ P8, そして KUW $\Delta$ P16 に対して、DNA シークエンシングにより TkopRNA の配列を確認したところそれぞれ目的のステムループ領域のみが欠損されていた。

#### 生育速度の比較

野生株および得られた変異株の生育速度を比較した結果、KUW $\Delta$ P8 については KUW1 野生株と比較して有意な違いが見られなかった (Fig. 10)。しかし、KUW $\Delta$ P3



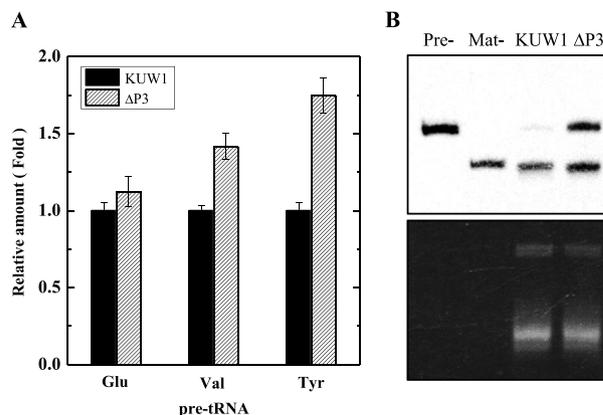
**Fig. 10** Growth profiles of wild-type KUW1 and its mutants. ■, Wild-type KUW1; □, KUW $\Delta$ P3; ●, KUW $\Delta$ P8; ○, KUW $\Delta$ P16.

と KUW $\Delta$ P16 では、相対的な生育速度がそれぞれ 76% と 92% まで減少していた。以下の実験では、生育速度に有意な差の見られた KUW $\Delta$ P3 を対象とし実験を進めていくこととした。

#### Pre-tRNA の蓄積量の検討

生体内における RNase P の切断活性が低下しているかの確認には、KUW1 野生株および KUW $\Delta$ P3 からトータル RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法およびノーザンブロット法により評価を行った。ターゲットとなる pre-tRNA の選定には、codon usage data base (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) を参考にそのコドンの使用頻度から選定した。

対数増殖期 (7.5 hrs) まで培養した菌体からトータル RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により pre-tRNA<sup>Glu</sup> (GAG), pre-tRNA<sup>Val</sup> (GUC), そして pre-tRNA<sup>Tyr</sup> (UAG) を対象に蓄積量を比較した。その結果、KUW $\Delta$ P3 において pre-tRNA<sup>Val</sup> と pre-tRNA<sup>Tyr</sup> が約 1.3~1.8 倍蓄積していることが確認できた (Fig. 11A)。また、pre-tRNA<sup>Glu</sup>



**Fig. 11** qRT-PCR and Northern blots analyses of pre-tRNA transcripts in wild-type KUW1 and KUW $\Delta$ P3. A, qRT-PCR analysis of pre-tRNA transcripts, pre-tRNA<sup>Glu</sup>, pre-tRNA<sup>Val</sup>, and pre-tRNA<sup>Tyr</sup>. Wild-type KUW1 and KUW $\Delta$ P3 is shown black and grey bar, respectively. B, Northern blots of transcripts using a specific primer (Biotin-Tyr) complementary to the anticodon stem-loop sequence of tRNA<sup>Tyr</sup> (Table 1). Approximately, 200 ng of the small RNA fractions/lane was separated on 10% denatured polyacrylamide gels containing 8 M urea, stained with ethidium bromide as shown in the lower panel, and transferred onto Hybond-N+ positively charged nylon membranes, as described in "Materials and Methods". Pre-tRNA<sup>Tyr</sup> (0.2 ng) or tRNA<sup>Tyr</sup> (0.2 ng) prepared by *in vitro* transcription were used as standards and are indicated by Pre- and Mat-, respectively.

については KUW1 野生株および KUW $\Delta$ P3 間で有意な差は見られなかった。

更なる検証を行うために tRNATyr のアンチコドンループに特異的なプローブを用いてノーザンブロット法により評価を行った。KUW $\Delta$ P3 では前駆体である pre-tRNATyr のバンドと成熟型である tRNATyr のバンドを検出することができた。一方で、野生株では前駆体である pre-tRNATyr が僅かに検出された (Fig. 11B)。以上のことから、KUW $\Delta$ P3 株内において RNase P の切断活性が低下していることを確認することができた。

#### 次世代シーケンサーによる新規基質の探索

KUW1 野生株と KUW $\Delta$ P3 株の対数増殖期 (7.5 hrs) からトータル RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより塩基配列を網羅的に解析した。現在までに、3 種の遺伝子クラスター (TK0179-TK0180-TK0181, TK1103-TK1104-TK1105-TK1106, TK2018-TK2019-TK2020) から転写された RNA が、KUW $\Delta$ P3 において野生株 KUW1 より多く蓄積していることが示された。今後は、これらの遺伝子クラスター転写産物の RNase P による切断活性の有無と、その他の転写産物の変化について解析を進めていく。

## 要 約

代謝経路とゲノム情報の比較解析から、細胞中で必要な反応だと思われる反応を触媒する酵素が見出されていない場合、活性を指標に無細胞抽出液から精製を行うことは新規活性を有する蛋白質の探索に有効なことが示された。今回、超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* の無細胞抽出液からフルクトキナーゼはほぼ精製まで、リン酸化アミノ糖エピメラーゼ蛋白質については遺伝子の同定まで行うことが出来た。

DNA 塩基の脱アミノ化は生体内で効率良く修復されなければならない。我々は超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* から発見した Endonuclease Q (EndoQ) は DNA 中のヒポキサンチン、ウラシルおよびキサンチンの 5' 側のリン酸ジエステル結合を特異的に切断するので脱アミノ化 DNA の効率的な修復に貢献していると予想している。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は DNA 鎖上をスライドしながら表面に DNA に作用する蛋白質を結合してそれらが DNA に作用する際の足場を提供すると考えられている。EndoQ は配列内に PCNA と相互作用するための配列モチーフ (PIP box) 候補を有しており *P. furiosus* の EndoQ を用いてそれぞれの PCNA との相互作用を詳細に調べた。その結果 EndoQ-PCNA 特異的結合が観察され PCNA の存在下で EndoQ のヒポキサ

ンチン特異的エンドスクレアーゼ活性が促進された。この特異的相互作用は PIP box 様配列を欠失した変異体では観察されなくなった。EndoQ が関与する DNA 修復には PCNA が関わり効率的な修復に寄与していると予想される。

アーキア RNase P の機能解明を目的として、*P. horikoshii* と遺伝学的に近縁種であり遺伝子組換え系が確立されている *T. kodakarensis* KUW1 株を用い、RNase P の切断活性を減少させた変異株を作製した。変異株の作製には PhopRNA 変異体に関する研究結果に基づき、TkopRNA 遺伝子の各ステムループ構造を欠損した変異株を調製した。種々の相同組替え用プラスミドを形質転換することで、それぞれ各ステムループ構造 P3, P8, そして P16 を欠損した変異株 KUW $\Delta$ P3, KUW $\Delta$ P8, KUW $\Delta$ P16 が作製されていることを確認した。得られた変異株と KUW1 野生株の生育曲線を比較した結果、KUW $\Delta$ P8 は野生株と同様に生育したが、KUW $\Delta$ P3 と KUW $\Delta$ P16 においては生育速度がわずかに減少していた (76%~92%)。さらに、*T. kodakarensis* KOD1 株のコードン頻度を考慮して比較的使用頻度の高いコドンに対するアンチコドンを持つ tRNAGlu, tRNAVal, tRNATyr を対象として、KUW $\Delta$ P3 における pre-tRNA の蓄積量を qRT-PCR により検討した。その結果、最も使用頻度の高い tRNAGlu では顕著な差は見られなかったものの、tRNAVal と tRNATyr については野生株と比較して KUW $\Delta$ P3 においてその蓄積量が約 1.3~1.8 倍に増加していた。最後に、KUW $\Delta$ P3 と KUW1 野生株の RNA 塩基配列決定によるトランスクリプトーム解析の結果、KUW $\Delta$ P3 において優位に蓄積されている 12 種の遺伝子が検出され、それらのうち 10 種の遺伝子が 3 つのオペロンを形成していることを見出した。今後、これらのオペロンに対する RNase P の解析が期待される。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Ueda, T., Ishino, S., Sumatsu, K., Nakashima, T., Kakuta, Y., Ishino, Y., Kimura, M. & Kawarabayasi, Y. 2015. Characterization of the *in vivo* function of the RNase P with domain-truncating RNase P RNA genes in the hyperthermophilic archaeon *T. kodakarensis* KOD1, *Thermophiles* 2015, September, 2015. Santiago, Chile
- 2) 上田敏史, 石野園子, 中島 崇, 角田佳充, 石野良純, 木村 誠, 河原林 裕, 変異体を用いたアーキア RNase P の *in vivo* 機能の解析, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月, 神戸ポートアイランド, 神戸
- 3) Ishino, S., Miyazono, K., Yamagami, T., Hamasuna, T., Shirai, T., Tomita, H., Kanai, T., Atomi, H., Tanokura, M., &

Ishino, Y. Structure and functions of the *Thermococcal*-specific exonuclease. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. December, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

- 4) Ishino, S., Ogino, H., Nagata, M., Kobayashi, K., Oyama, O., Yamagami, T., Simmons, J.R., Kanai, T., Atomi, H., Kawarabayasi, Y. & Ishino, Y. Structure and functions of the replicative helicase complex in Archaea. Workshop "Molecular dynamics of higher-order complexes for initiation of DNA replication: diversity and universality" 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月, 神戸ポートアイランド神戸

#### 原著論文

- 1) Ishino, S., Nishi, Y., Oda, S., Uemori, T., Sagara, T., Takatsu, N., Yamagami, T., Shirai, T. & Ishino, Y. 2016. Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. *Nucleic Acids Res.* **44**: 2977–2986.
- 2) Shiraiishi, M., Ishino, S., Yoshida, K., Yamagami, T., Cann, I. & Ishino, Y. 2016. PCNA is involved in the EndoQ-mediated DNA repair process in *Thermococcales*. *Sci. Rep.* **6**: 25532.
- 3) Ueda, T., Ishino, S., Suematsu, K., Nakashima, T., Kakuta, Y., Kawarabayasi, Y., Ishino, Y. & Kimura, M. 2015. Mutation of the gene encoding the ribonuclease P RNA in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* causes decreased growth rate and impaired processing of tRNA precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**: 660–665.
- 4) Ishino, S., Makita, N., Shiraiishi, M., Yamagami, T. & Ishino, Y. 2015. EndoQ and EndoV work individually for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus*. *Biochimie* **118**: 264–269.

#### 謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄付金による援助のもと行われたもので、ここに感謝の意を表したい。本研究への九州大学大学院農学研究院大島敏久教授のご支援とご協力に感謝の意を表したい。さらに本研究は、協力講座（微生物遺伝子資源学分野、生物化学分野、蛋白質科学分野）の皆様、当寄付講座に在籍したポスト・技術補佐員等の職員並びに教官の皆さん、当分野で実質的な研究を行った大学院生・学部生の皆様のご協力の元で成し遂げられたもので、ここに感謝の意を表したい。また、EndoQ解析の機能解析実験をおこなっていただいた九州大学生物資源環境科学府の白石都氏と吉田光太郎氏に感謝の意を表したい。

#### 文 献

Baba, T. & Mori, H. 2008. The construction of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection in *Escherichia*

*coli* K-12. *Methods Mol. Biol.* **416**: 171–181.

- Baba, T., Huan, H.C., Datsenko, K., Wanner, B.L. & Mori, H. 2008. The applications of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection of *Escherichia coli* K-12. *Methods Mol. Biol.* **416**: 183–194
- Cann, I.K.O., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K. & Ishino, Y. 1999. Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**: 6591–6599.
- Esakova, O. & Krasilnikov, A.S. 2010. Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA* **16**: 1725–1747.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N.R. & Altman, S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849–857.
- Ishiguro, A., Kassavets, G.A. & Geiduschek, E.P. 2002. Essential roles of Bdp 1, a subunit of RNA polymerase III initiation factor TFIIIB, in transcription and tRNA processing. *Mol. Cell Biol.* **22**: 3264–3275.
- Iwanaga, N., Ide, K., Nagashima, T., Tomita, T., Agari, Y., Shinkai, A., Kuramitsu, S., Okada-Hatakeyama, M., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2014. Genome-wide comprehensive analysis of transcriptional regulation by ArgR in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*. **18**: 995–1008.
- Kim, S. & Lee, S.B. 2005. Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem. J.* **387**: 271–280.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T. & Imanaka, T. 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4559–4566.
- Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. 2006. Identification and characterization of an ATP-dependent hexokinase with broad substrate specificity from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *J. Bacteriol.* **188**: 2014–2019.
- Ogasawara, N. 2000. Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res. Microbiol.* **151**: 129–134.
- Ohshima, T., Kawakami, R., Kanai, Y., Goda, S. & Sakuraba, H. 2007. Gene expression and characterization of 2-keto-3-deoxygluconate kinase, a key enzyme in the modified Entner-Doudoroff pathway of the aerobic and acidophilic hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*. *Protein Expr. Purif.* **54**: 73–78.
- Pluchon, P.F., Fouqueau, T., Creze, C., Laurent, S., Briffotiaux, J., Hogrel, G., Palud, A., Henneke, G., Godfroy, A., Hausner, W., Thomm, M., Nicolas, J. & Flament, D. 2013. An extended network of genomic maintenance in the archaeon *Pyrococcus abyssi* highlights unexpected associations between eucaryotic homologs. *PLoS ONE* **8**: e79707.
- Reiner, R., Ben-Asouli, Y., Krilovetzky, I. & Jarrous, N. 2006. A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Gene Dev.* **20**: 1621–1635.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. & Imanaka, T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *J. Bacteriol.* **185**: 210–220.

- Shiraishi, M., Ishino, S., Yamagami, T., Egashira, Y., Kiyonari, S. & Ishino, Y. 2015. A novel endonuclease that may be responsible for damaged DNA base repair in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* **43**: 2853–2863.
- Suematsu, K., Ueda, T., Nakashima, T., Kakuta, Y. & Kimura, M. 2015. On archaeal homologs of the human RNase P proteins Pop5 and Rpp30 in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**: 952–959.
- Sunwoo, H., Dinger, M.E., Wilusz, J.E., Amaral, P.P., Mattick, J.S. & Spector, D.L. 2009. MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* **19**: 347–359.
- Suzuki, T., Iwasaki, T., Uzawa, T., Hara, K., Nemoto, N., Kon, T., Ueki, T., Yamagishi, A. & Oshima T. 2002. *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles* **6**: 39–44.
- Takemasa, R., Yokooji, Y., Yamatsu, A., Atomi, H. & Imanaka, T. 2011. *Thermococcus kodakarensis* as a host for gene expression and protein secretion. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 2392–2398.
- Torres-Larios, A., Swinger, K.K., Pan, T. & Mondragon, A. 2006. Structure of ribonuclease P-a universal ribozyme. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 1–9.
- Ueda, T., Yamaguchi, H., Miyanoshita, M., Nakashima, T., Kakuta, Y. & Kimura, M. 2014. Characterization of the peripheral structures of archaeal RNase P RNA from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J. Biochem.* **155**: 25–33.
- Walker, S.C. & Engelke, D.R. 2006. Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 77–102.
- Warbrick, E. 2000. The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays* **22**: 997–1006.
- Wilusz, J.E., Freier, S.M. & Spector, D.L. 2008. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* **135**: 919–932.
- Yamagishi, A. & Oshima, T. 1990. Circular chromosomal DNA in the sulfur-dependent archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1133–1136.
- Zhang, Z., Akutsu, J. & Kawarabayasi, Y. 2010. Identification of novel acetyltransferase activity on the thermostable protein ST0452 from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Bacteriol.* **192**: 3287–3293.

## 極限環境微生物遺伝子資源の応用

石野 園子, 鈴木 宏和<sup>1)</sup>, 河原林 裕

九州大学大学院農学研究院極限環境微生物ゲノム機能開発学

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

### Application of the gene resources identified within extremophiles

Sonoko Ishino, Hirokazu Suzuki, Yutaka Kawarabayasi

Laboratory of Functional Genomics of Extremophiles, Graduate School of Agriculture, Kyushu University

Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

Some enzymes identified from thermophilic archaea exhibited lower  $K_m$  and  $k_{cat}$  values than those of the bacterial counterpart enzymes. Sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activity of the ST0452 protein was successfully increased by introduction of single substitution into the amino acid residue located at the reaction center. Also introduction of the short deletion at the C-terminus increased the amino-sugar-1-P acetyltransferase activity of the ST0452 protein. Also it was shown that truncation of C-terminus region enhanced the sugar-1-P nucleotidyltransferase activity encoded on the N-terminus of the PH0925 protein. These results indicate the improvability of archaeal thermophilic enzyme, and their usefulness in application.

The DNA polymerase from *Thermus aquaticus* (Taq polymerase) has been used globally for PCR technology. We attempted to develop chimeric or mutant Taq polymerases with improved PCR performance by utilizing information obtained from the metagenomic analysis. Some chimeric and mutant Taq polymerases displayed higher primer-extension rates and higher affinity to the DNA substrate than those of WT Taq polymerase. Based on the properties of these chimeric enzymes and their sequences, the mutant Taq polymerases with superior speed for the primer extension reaction were designed. These mutant Taq polymerases enhanced PCR performance. Genetic tools useful for functional analysis of heterologous thermophile genes in a thermophilic bacterium, *Geobacillus kaustophilus* HTA426, were developed. An upstream region of GK0704 gene of the strain HTA426 (Pkg704) served as a substantial and maltose-inducible promoter in *G. kaustophilus*. Using the promoter, various genes from heterologous thermophiles were successfully expressed, conferring remarkable properties to *G. kaustophilus*, although some of the genes hardly expressed in *Escherichia coli*. This result suggests that the expression system using *G. kaustophilus* is more practical than that using mesophiles for *in vivo* analysis of the thermophile genes. This study also generated new selection markers functional in *G. kaustophilus* (chloramphenicol and thiostrepton resistance genes) and a new strain, *G. kaustophilus* MK244 that accepts DNA from most *E. coli* strains due to the deficiency in DNA restriction-modification systems. The strain MK244 enables to construct large chromosomal libraries of heterologous thermophiles. New selection markers facilitate complex genetic modification, including multiple gene expression, in *G. kaustophilus*. Therefore, these genetic tools, as well as Pkg704, can contribute to *in vivo* analysis of heterologous genes from various thermophiles.

Key words: thermophilic archaea, thermostable enzyme, host-vector system, DNA polymerase, PCR

---

E-mail: sonoko@agr.kyushu-u.ac.jp,  
hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp,  
kawarabayasi.yutaka@nifty.com

<sup>1)</sup>現 鳥取大学大学院工学研究科  
共同研究者: 石野良純, 山上 健, 大島敏久, 土居克実,  
本田裕樹, 臧 茜 (九州大学農学研究院)

本報告には、3つの項目が含まれるので、それぞれについて諸言・実験方法・結果および考察を記す。

## [I] 超好熱アーキア由来糖代謝関連酵素活性の促進

### 諸言

最初の研究課題「相同性から機能が推定されている超好熱アーキアの蛋白質・酵素の機能解明」および二番目の研究課題「活性を指標とした超好熱アーキアの新規蛋白質・酵素の単離とその解析」を実際に遂行することで、これまで既知の酵素では明らかにならなかった酵素活性が見出されたり、全く新規の酵素分子・酵素活性の存在が確認されてきた。これらは、ゲノム情報からだけでは推定することが出来ないもので、実験的解析で初めて得られる貴重な超好熱アーキア由来の遺伝子資源である。超好熱アーキア由来の蛋白質・酵素は、高温等に対して高い安定性を示すことから、酵素学や基礎科学的な興味の外に、物質生産等の応用での利用にも注目されている。超好熱アーキア由来酵素の中には糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素 (Zhang *et al.*, 2007) の様に、 $K_m$  値がバクテリア由来の酵素のものに比べると小さい場合がある。これは反応に用いられる基質は薄い濃度でも利用できることを示し、超好熱アーキア由来酵素での有利な点である。しかしながら、 $k_{cat}$  値についてもバクテリア由来酵素のものとの互いの最適条件下での値を比較した場合、こちらも小さい場合がある (Zhang *et al.*, 2007)。このことは、反応の進行はバクテリア由来の酵素を用いた時よりも遅いということを示している。超好熱アーキア由来酵素の有する最大の利点である耐熱性・高い安定性を維持したまま反応速度を上げることが出来れば、応用面で非常に有利になると考えられる。そこで、個々の蛋白質・酵素の有する活性の促進に取り組んだ。

### 実験方法

#### 材料

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* JCM 10545 (Suzuki *et al.*, 2002) を用いた。ゲノム DNA は、既に報告されている方法 (Yamagishi & Oshima, 1990) により調製した。組換え蛋白質の発現のため大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株を用いた。ダブル変異株作製の際には、以前作製した変異蛋白質をコードしているプラスミド DNA (Zhang *et al.*, 2007) を鋳型として用いた。

#### 変異体作製手法

点変異、欠失変異を導入するために適切なオーバーラップを有するプライマーを設計し、PCRによって変異を導入した。得られたクローンについては、塩基配列を解読することで予定した変異が導入されているか確認を行った。

#### 変異体蛋白質の生産

塩基配列を確認された各変異遺伝子を持つ発現ベクターを大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL 株に形質転換することで、組換え蛋白質として目的の変異遺伝子産物を生産させた。糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素発現ベクターの場合はアンピシリン、PH925 蛋白質発現ベクターの場合はカナマイシンを加えた液体 LB 培地中で、形質転換した大腸菌 BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL を 37 °C で培養し、波長 600 nm での吸光度が 0.6-0.8 になるまで生育させ、そこに終濃度 23.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように IPTG を加え、さらに 37 °C で 6 時間培養を継続して、蛋白質発現の誘導を行った。菌体を 10,000  $\times g$ , 15 分の遠心分離で集菌し、洗浄後、菌体の 4 倍量の緩衝液に懸濁した後、その懸濁液を超音波処理することで菌体を破碎した。破碎液を 15,000  $\times g$ , 15 分間遠心分離し、上清を 80 °C で 10 分間の加熱処理を行った。再度 15,000  $\times g$ , 15 分間遠心分離した。

His タグを有する蛋白質については、その後 Ni キレートカラムを用いた精製を行った。

蛋白質濃度は、BCA 蛋白質アッセイキットを用いて測定した。精製度については、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。

#### 活性の検出方法

糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素、PH925 両蛋白質の有する糖-1-リン酸と NTP を結合する活性については、50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM NTP, 0.1 mM 糖-1-リン酸を含む反応液 30  $\mu\text{L}$  をあらかじめ 80 °C で 2 分間保温した後、50 ng の精製蛋白質を加えることで反応をスタートさせた。反応を 80 °C で進行させ、生成物を Wakosil 5C18-200 カラムを装着した HPLC で分析・定量を行った (Zhang *et al.*, 2005)。

糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有するもう一つの活性である、アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移活性については、アセチル基のドナーであるアセチル CoA から、反応の進行に従って生成される CoA の生成量を用いて測定した。この反応では、50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM アセチル CoA, 2 mM アミノ糖-1-リン酸を含む反応液

10  $\mu$ Lをあらかじめ 80°C で2分間保温した後、50 ng の精製蛋白質を加えることで反応をスタートさせた。反応終了後 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 6.4 M グアニジン塩酸溶液 40  $\mu$ Lを加え、そこに 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.5 mM DTNB 溶液 50  $\mu$ Lを加え、412 nm の吸光度を測定して、反応を定量的に測定した。

キネティクスの解析

各酵素活性のキネティクスを求めるために、逆数プロットによる見かけの  $K_m$  および  $k_{cat}$  値を求めた。

結果および考察

変異による糖代謝関連酵素活性の促進

糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有する *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性については、活性中心のアミノ酸をアラニン等に変換することで野生型蛋白質よりも 1.3–1.5 倍高い活性を示す 5 種類の変異体について既に報告してきた (Zhang *et al.*, 2007)。しかし、この上昇した活性でもバクテリア・大腸菌の類似の酵素活性と比してまだまだ低いものであった。

1 個の変異を導入することで活性を上昇させることができた 5 種類の変異を複数組み合わせることで、さらに活性を上昇させることが出来るのではないかと推測した。そこで、二種類の変異を同一クローンに導入した二重変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素を構築した。その結果、Fig. 1 に

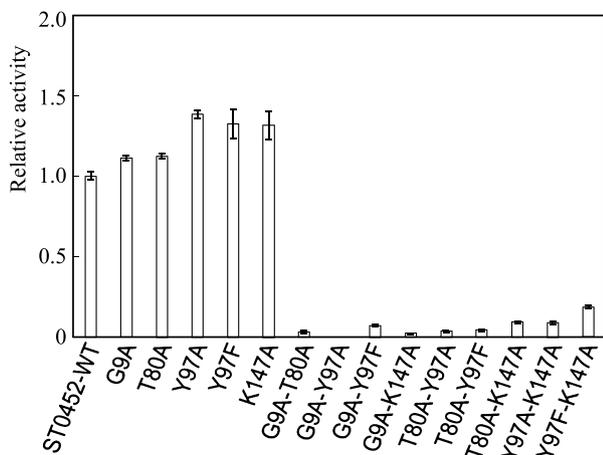


Fig. 1 Relative activity of the wild type, single substitution and double substitution mutant ST0452 proteins. Specific activity of the wild type ST0452 protein is  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .

示すように、単独であれば活性の上昇が確認できる変異でも二重変異体に組み込んだ場合には、残念ながら全ての二重変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素からは野生型の 10% 程度以下の活性しか検出されなかった。この結果は、二つ以上の変異が同時に一つの糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素に導入されると、活性が極端に低下することを示している。

そこで、異なった方法での活性促進の可能性について検討を行った。単一変異の際に最も活性の上昇が高かったのは97番目の Tyr を Ala に変換した変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素であった。この97番目の Tyr を他の全ての種類のアミノ酸に置換した変異体の作製を試みた。大腸菌での発現の結果、全ての変異体が耐熱性・可溶性蛋白質として生産された。そこで、各変異体糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸およびグルコース-1-リン酸と UTP の結合活性について測定を行った。その結果を Fig. 2 に示した。一重枠で囲った6種類の変異体では両方の活性の上昇が確認された。この中で最も活性が促進された Y97N では野生型糖-1-リン酸ヌクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有している活性と比して約4.5倍高い活性を示した。また Y97M 変異体蛋白質では、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性が促進された比率よりも、グルコース-1-リン酸と UTP を結合する活性が促進された比率のほうが大きいという特徴が見いだされた。また、二重枠で囲っ

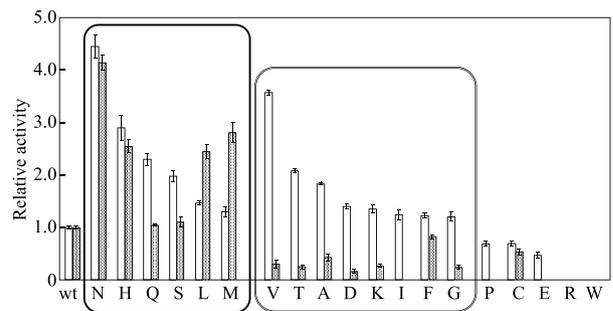


Fig. 2 Two sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities of wild type and mutant ST0452 proteins. Open bars and hatched bars indicate GlcNAc-1-P UTase and Glc-1-P UTase activities. Relative activity is shown as a ratio of each activity detected on the wild type (wt) ST0452 protein.

た8種類の変異体蛋白質では、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP との結合活性のみが促進されていた。

これらの活性の上昇がどの様な要因によって引き起こされているのかを明らかにするために活性が促進された変異体の中の代表的な変異体について、その活性の逆数プロットによる見かけの  $K_m$  および  $k_{cat}$  値の解析に取り組んだ。活性が促進された変異体糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の中で、特徴的な Y97N (両方の活性が最も上昇した変異体)、Y97M (グルコース-1-リン酸と UTP を結合する活性の促進比率の最も高い変異体) および Y97V (*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性のみ上昇した変異体) について、その活性の逆数プロットによる見かけの  $K_m$  および  $k_{cat}$  値を解析した。その結果を Table 1 に示すが、Y97N では両方の活性の、Y97V では *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性のみの  $k_{cat}$  値が上昇していた。一方、Y97M では両方の活性の  $k_{cat}$  値の上昇が確認されたが、グルコース-1-リン酸と UTP を結合する活性では  $K_m$  値の上昇が2倍程度なのに、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合させる活性では、 $K_m$  値が10倍以上大きくなっていった。このことからグルコース-1-リン酸と UTP を結合する活性の方が活性の上昇比率が大きくなって現れたものと思われる。今回の変異体についての解析結果から、本糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が有する糖-1-リン酸と NTP との結合活性については、一つのアミノ酸残基に変異を導入することで、大きく促進できることが示された。

次に、同じ糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の C 末領域にコードされているアミノ糖-1-リン酸アセチル基転移活性についても、促進することが可能か取り組んだ。活性中心への変異の導入でも活性の促進は見られたが、顕著ではなかった。それに比して、C 末端のアミノ酸残基を数残基欠失させることで、大きくグルコサミン-1-リン酸アセチル基転移活性が上昇することが確認された (Table 2 I)。C 末端から5残基欠失させた場合、本活性は4.8倍、11残基欠失させた場合、実に16.8倍上昇した。一方、ガラクトサミン-1-リン酸アセチル基転移活性については、5残基および11残基の欠失によりわずかながら低下がみられた。また N 末領域にコードされている *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸と UTP を結合する活性については、この欠失による影響はほとんど見られなかった。このことは、本糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素の C 末端5-11残基の領域は本糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素が C 末領域にコードしているアセチル基転移活性を抑制

している可能性を示唆している。これらアセチル基転移酵素活性が促進された2つの欠失変異体蛋白質について、活性の逆数プロットによる見かけの  $K_m$  および  $k_{cat}$  値の解析を行った。その結果を Table 2 II に示すが、これらの変異体でも大きく促進されていたのは、 $k_{cat}$  値であった。5残基・11残基欠失させた変異体糖-1-リン酸スクレオチド転移/アミノ糖-1-リン酸アセチル基転移酵素では、グルコサミン-1-リン酸アセチル基転移活性の  $k_{cat}$  値がそれぞれ約4倍・18.8倍上昇していた。

超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* が有する、ホスホマンノースイソメラーゼとマンノース-1-リン酸と GTP を結合させる活性の二つを有するバイファンクショナル酵素 PH0925 蛋白質についても、マンノース-1-リン酸と GTP を結合する活性が促進できるか試みた。その結果を Table 3 に示した。本 PH0925 蛋白質を C 末端から順に欠失させた変異体蛋白質の発現ベクターを構築した。これらの欠失変異体蛋白質も大腸菌内で、耐熱性・可溶性蛋白質として生産が確認された。C 末端側から14アミノ酸残基欠失させると野生型 PH0925 蛋白質が示す活性の約1.2倍の活性が、さらに C 末端から114残基のアミノ酸を欠失させると野生型蛋白質が有する活性の

**Table 1** Kinetic parameters of the typical three mutant ST0452 proteins

Proteins	GlcNAc-1-P UTase			Glc-1-P UTase		
	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
	(mM)	(s <sup>-1</sup> )	(s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )	(mM)	(s <sup>-1</sup> )	(s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
ST0452	0.030±0.014	1.45±0.19	54.9	1.03±0.21	1.24±0.18	1.21
Y97M	0.039±0.012	2.31±0.26	60.4	1.60±0.29	5.71±0.81	3.61
Y97N	0.306±0.181	22.06±7.73	86.9	2.58±0.52	10.30±2.26	3.98
Y97V	0.711±0.089	12.84±0.52	18.4	0.64±0.13	0.22±0.023	0.35

**Table 2** Specific activities ( I ) and kinetic parameters ( II ) of the *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase and amino-sugar-1-phosphate acetyltransferase activities of the wild-type and mutant ST0452 protein

Protein	GlcNAc-1-P UTase	GlcN-1-P acetyltransferase		GalN-1-P acetyltransferase
		(μmol/min/mg protein)	(μmol/min/mg protein)	(μmol/min/mg protein)
ST0452	2.2 ± 0.1	67.4 ± 1.2	47.6 ± 0.7	
DC005	2.0 ± 0.1	323.5 ± 13.2	38.0 ± 1.5	
DC011	2.6 ± 0.1	1130.7 ± 45.6	29.6 ± 0.6	

Protein	Substrates	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
		(mM)	(s <sup>-1</sup> )	(mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
ST0452	Acetyl-CoA	0.63 ± 0.02		
	GlcN-1-P	0.59 ± 0.05	123.2 ± 4.6	211.0 ± 14.1
	GalN-1-P	1.71 ± 0.2	69.7 ± 6.9	40.8 ± 3.7
DC005	Acetyl-CoA	0.52 ± 0.00		
	GlcN-1-P	0.56 ± 0.04	490.6 ± 35.6	869.2 ± 2.1
	GalN-1-P	0.84 ± 0.05	17.9 ± 0.3	21.5 ± 1.0
DC011	Acetyl-CoA	1.69 ± 0.07		
	GlcN-1-P	1.55 ± 0.01	2310.8 ± 12.4	1488.9 ± 13.4
	GalN-1-P	0.66 ± 0.09	12.6 ± 1.3	19.6 ± 0.5

**Table 3** Specific and relative activity of the wild type and truncated form of the PH0925 protein

	Length of truncation from C-terminus (residues)	Specific activity ( $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein)	Relative activity (%)
PH0925	0	0.20 $\pm$ 0.002	100
DN450	14	0.25 $\pm$ 0.02	125
DN350	114	0.71 $\pm$ 0.05	355
DN345	119	0.16 $\pm$ 0.01	80
DN328	136	0.03 $\pm$ 0.0002	1.5
DN321	143	0.002 $\pm$ 0.0003	1
DN310	154	0.002 $\pm$ 0.0001	1
DN271	193	0.0003 $\pm$ 0.0001	0.1

約3.5倍の活性を示すことが明らかとなった。しかし、さらに5残基欠失させると活性は野生型の8割へと減少することから、この5アミノ酸残基の領域に本 PH0925 蛋白質のコードするマンノース-1-リン酸と GTP を結合する活性を制御する機能があると思われる。またこの PH0925 蛋白質の C 末端から100残基の領域は、本 PH0925 蛋白質の N 末端領域に存在するマンノース-1-リン酸と GTP を結合する活性を抑制する機能を持つと推定される。

以上、示した3つの例の様に超好熱アーキア由来酵素では、活性中心への変異の導入あるいは適度な長さの欠失の導入により、元来有している活性を大きく上昇させることが可能だということが示された。今後、超好熱アーキア由来の他の酵素でも同様の手法で活性の上昇が可能か確認をおこなってゆきたい。また、活性を上昇させることが出来た変異蛋白質は、今後の物質生産での応用にも供していきたい。

## [II] 配列の挿入による DNA ポリメラーゼ活性の促進

### 諸 言

耐熱性 DNA ポリメラーゼは遺伝子クローニングや配列解析、PCR 等の遺伝子操作技術に多大な貢献をしてきた (Perler *et al.*, 1996; Terpe, 2013; Ishino & Ishino, 2014)。より有用な PCR 酵素を得るために微生物から新規酵素を探索する試みは長年にわたって続けられているが、培養技術および精製技術の限界があり限られた生物資源しか利用されていない。そこで培養困難な未知の微生物由来の遺伝子資源を利用することで、未同定の遺伝子の一部を既知酵素の遺伝子と融合させて、遺伝子産物の酵素活性を直接分析し、高い酵素活性を発揮する遺伝子の選択をおこなう方法をとった。

## 実験方法

### キメラ Taq ポリメラーゼの産生プラスミド作製

日本各地の温泉土壌より抽出した環境メタゲノム DNA を鋳型に用いて、プライマーセットに、5'-dCGCAG GCTAAGCAGCTCCGAYCCHAACYTSCARAAYATHCC および 5'-dGAGYAAGATCTCRTCTCGTGNACYTG を用いて PCR をおこなった。下線部分は制限酵素 Bsp I および Bgl II の認識配列である。また縮重コドンは、Y が C および T:H が A, C, および T:S が C および G:R が A および G:N が A, G, C, および T を示す。これらのプライマー配列はファミリー A 型 DNA ポリメラーゼに保存されたアミノ酸配列、DPNLQNP および QVHDEIL をコードする遺伝子に相当する。pTV118 プラスミド上の野生型 TaqDNA ポリメラーゼをコードする遺伝子にも同様の部位に Bsp I および Bgl II の認識配列をあらかじめ導入しており、それらを用いて、環境 DNA より増幅された約 600 bp の DNA 断片と組換えて、キメラ遺伝子を作製した。

### 組換え蛋白質の調製

野生型およびキメラ Taq ポリメラーゼの組換え蛋白質の産生には大腸菌 JM109 株にプラスミドを用いて形質転換し、37℃ で培養し OD (600nm) が 0.3 に達したとき、IPTG を終濃度 1mM になるよう添加して、さらに6時間培養して大量産生させた。アミノ酸9残基の挿入変異体を産生するプラスミドは、Agilent 社の site directed mutagenesis kit を用いて pTV118 に挿入された野生型 Taq ポリメラーゼ遺伝子より作製し、野生型 Taq ポリメラーゼと同様の方法で大腸菌を培養して産生させた。大腸菌の粗抽出液を 75℃ で30分間処理し、耐熱画分をポリエチレンイミン処理で除核酸して、硫酸アンモニウムで塩析して蛋白質を回収した。その後 HiTrap Heparin HP カラム (GEヘルスケア) および HiTrap Phenyl HP カラム (GEヘルスケア) を用いたクロマトグラフィーをおこない、高純度標品を得た。

### プライマー伸長反応

鋳型に M13mp18 一本鎖 DNA を用いて、P-32 放射性同位元素でラベルしたプライマーをアニールして 20mM Tris-HCl (pH 8.8), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 14mM 2-メルカプトエタノール, および 0.2mM dNTP を含む反応液中で 0.0025 unit/ $\mu$ l キメラ酵素または 0.08nM 野生型および変異型酵素を用いて 74℃ で反応し、伸長産物を 0.7% アルカリアガロースゲル電気泳動で展開した後、オートラジオグラフィーにより検出した。



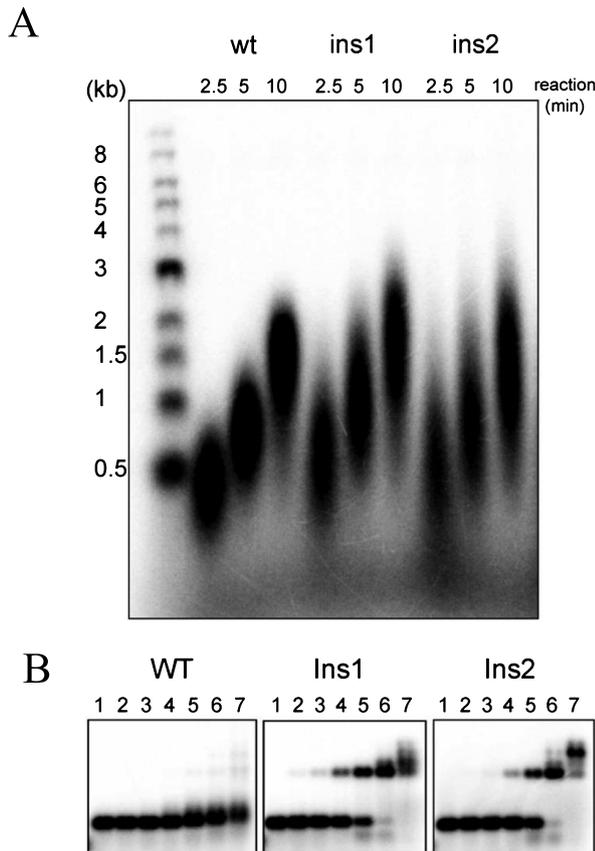
組換え蛋白質のプライマー伸長活性および DNA 結合活性

二つのクローン, KA13-8 および A3-9 から作製したキメラ酵素をさらに PCR に応用することを検討したが, 実用的な熱安定性が認められなかった. そこで 9 アミノ酸残基を野生型 Taq ポリメラーゼの Arg736 と Val737 の間に挿入した変異体を作製した. これを Ins1-Taq とする. さらに DNA に対する結合能を上げるため, 挿入配列の第 3 番目および第 4 番目の Gly-Gln を Arg-Arg に置換した (Ins2-Taq). これら変異型の Taq ポリメラーゼの組換え蛋白質を野生型と同様に調製し, 酵素活性を評価した. プライマー伸長反応の結果, Ins1-Taq および Ins2-Taq の伸長産物の長さは野生型による産物より長かった (Fig. 5). しかし予想に反して Ins1-Taq と Ins2-

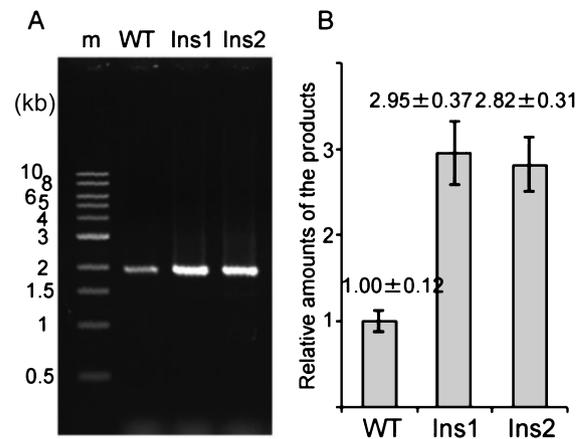
Taq に差は見られなかった. EMSA により DNA 結合活性を調べたところ, Ins1-Taq および Ins2-Taq が野生型に比べてあきらかに高い活性を示した. 環境 DNA 由来の挿入アミノ酸配列に見られる二つの Arg 残基が高い DNA 結合をもたらしていると考えられ, Ins2 でさらに追加した二つの塩基性アミノ酸による効果は見られなかった.

組換え蛋白質を用いた PCR

二種類の 9 アミノ酸配列, GPGQAPRRL (Ins1) GPRRAPRRL (Ins2), を挿入した変異型 Taq ポリメラーゼは, 精製過程での熱処理における挙動からも野生型と同様に耐熱性を保持していることが期待されたので, 様々な長さの増幅産物が得られるようなプライマーセットを用いて PCR を実施した. 代表的な結果として, 2 kbp の目的領域の増幅に対して, 15 秒という短い伸長時間で産物が得られた例を Fig. 6A に示す. 増幅された DNA 量を比較した結果 (Fig. 6B), Ins1-Taq と Ins2-Taq の間に差は見られなかったが, 9 アミノ酸の挿入が Taq ポリメラーゼをより有用な PCR 酵素に改変したと言える. このことは挿入配列中の塩基性アミノ酸が DNA 結合に寄与して, PCR における DNA 合成反応がより速くなるように働いたと考えられる.



**Fig. 5 Activities of the WT and mutant Taq polymerases.** A, Primer extension activities of the recombinant Taq polymerases were analyzed. The names of the Taq polymerases and the reaction time are indicated on the top. The sizes indicated on the left are from 1 kb DNA Ladder (NEB) labeled with P-32 at each 5' end. B, DNA binding abilities of the recombinant Taq polymerases. The names of the Taq polymerases are indicated on the top.



**Fig. 6 PCR performances of WT and mutant Taq polymerases.** A, The amplified products (2 kb) were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The names of the Taq polymerases are indicated on the top. Lane m is a 1 kb DNA Ladder (NEB). B, Quantification of the band intensities was performed by scanning the EtdBr-stained gel, using an image analyzer (LAS-3000 mini; Fuji Film, Tokyo, Japan). The relative amounts of the products were calculated from three independent experiments, and are shown with standard errors.

[Ⅲ] 異種好熱菌遺伝子の細胞内分析に有用な *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の遺伝学的ツールの開発

諸 言

好熱菌は、高温環境を好んで生育する極限環境微生物で、それらが保有する未知遺伝子は、活発な研究対象となっている。未知遺伝子の機能を解析する場合、大きく分けて2種類のアプローチが利用される。1つ目のアプローチでは、対象遺伝子の発現産物（および酵素）を *Escherichia coli*（大腸菌）などで産生し、得られた酵素分子を抽出さらには精製した上で、その機能を試験管内分析する。2つ目のアプローチは細胞内分析で、対象遺伝子を大腸菌などのモデル微生物に導入し、それによって起こる大腸菌の表現型変化を分析することで、その機能を予測する。試験管内分析は、遺伝子機能が予測できる場合に有効で、決定的な機能解明に至ることができる。細胞内分析は、遺伝子機能の大きな分析に有効で、遺伝子機能が全くわからない場合や、対象遺伝子が酵素以外をコードする場合にも広く利用できる。本来、これら2種類のアプローチは表裏一体の関係にあり、微生物学においては両アプローチから遺伝子機能の解明に至るのが通例である。好熱菌の未知遺伝子についても、試験管内分析と細胞内分析の両アプローチから解析されるべきだが、好熱菌の酵素は反応至適温度が高温領域にあるこ

とが多く、大腸菌などの常温菌中では機能しない場合がある。このことから、好熱菌遺伝子の細胞内分析には好熱菌を宿主とすることが望ましいが、好熱菌の遺伝子改変技術は限定的であるため、そのような分析はあまり行われていない。

*G. kaustophilus* HTA426 は、マリアナ海溝の深海底泥から単離された好気性のグラム陽性桿菌で (Takami *et al.*, 1997, 2004a), 中温から高温にかけての広域温度範囲で迅速に増殖できる (生育可能温度, 42–74 °C; 生育至適温度, 60 °C; LB 培地中の倍化時間, 約 20 min)。本菌は、生物学的知見が蓄積された *Bacillus subtilis* (枯草菌) と近縁で、*Geobacillus* 属としては最初に全ゲノム配列が公開された (Takami *et al.*, 2004b)。GC 含量は中庸で、プラスミドによる形質転換も可能である (Suzuki & Yoshida, 2012)。つまり HTA426 株は、遺伝学的に解析しやすい好熱菌の1つであり、異種好熱菌遺伝子を細胞内分析するための汎用的宿主として有用と期待できる。そこで本研究では、*G. kaustophilus* HTA426 の遺伝学的ツールを広く開発し、その有用性について検証した。

実験方法

菌株, 培養条件, およびプラスミド

使用したプラスミドおよび菌株を Table 4 にまとめた。*G. kaustophilus* は、Luria–Bertani (LB) 培地もしくは

Table 4 Plasmids and bacterial strains

Plasmid or strain	Relevant descriptions
Plasmid	
pUB307	Derivative of the conjugation plasmid RP1; <i>Tra+</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>KmR</i> , <i>TetR</i>
pGAM46	<i>E. coli</i> – <i>Geobacillus</i> shuttle plasmid for gene integration into GK0707 locus of <i>G. kaustophilus</i> ; <i>AmpR</i> , TK101, pUC replicon, pBST1 replicon, <i>oriT</i>
pGAM48	Derivative of pGAM46, carrying <i>Pgk704</i>
pSTE33T	<i>E. coli</i> – <i>Geobacillus</i> shuttle plasmid capable of autonomous replication; <i>AmpR</i> , TK101, pUC replicon, pSTK1 replicon, <i>oriT</i>
pUCG18T	<i>E. coli</i> – <i>Geobacillus</i> shuttle plasmid capable of autonomous replication; <i>AmpR</i> , TK101, pUC replicon, pBST1 replicon, <i>oriT</i>
pGKE75	Derivative of pUCG18T, carrying <i>Pgk704</i>
pGKE75- <i>tsr</i>	Derivative of pGKE75, carrying <i>tsr</i> gene under the control of <i>Pgk704</i>
pGKE75- <i>tsr</i> H258Y	Derivative of pGKE75- <i>tsr</i> , carrying the mutant gene <i>tsr</i> H258Y
pGKE75- <i>cat</i>	Derivative of pGKE75, carrying <i>cat</i> gene under the control of <i>Pgk704</i>
pGKE75- <i>cat</i> A138T	Derivative of pGKE75- <i>cat</i> , carrying the mutant gene <i>cat</i> A138T
pGKE75mut- <i>cat</i> A138T	Derivative of pGKE75- <i>cat</i> A138T, carrying two mutations in pUC replicon
<i>E. coli</i> strains	
BR408	An engineered strain for conjugative plasmid transfer to <i>G. kaustophilus</i> ; F <sup>-</sup> , e14 <sup>-</sup> ( <i>mcrA</i> <sup>-</sup> ), D ( <i>mrr</i> – <i>hsdRMS</i> – <i>mcrBC</i> )114::IS10, D <i>dcm</i> :: <i>lacZ</i> , <i>dam</i> <sup>+</sup> , <i>hsdM1S1</i> , <i>hsdM2S2</i> , pUB307
DH5α	A common strain used for DNA manipulation
<i>G. kaustophilus</i> strains	
HTA426	Wild-type strain
MK72	Derivative of the strain HTA426; <i>ΔpyrF</i> , <i>ΔpyrR</i>
MK242	Derivative of the strain MK72; <i>ΔpyrF</i> , <i>ΔpyrR</i> , <i>ΔhsdM1S1R1</i> , <i>Δ(mcrB1-mcrB2-hsdM2S2R2-mrr)</i> , GK0707::P <i>gk704</i> - <i>bgaB</i>
MK244	Derivative of the strain MK72; <i>ΔpyrF</i> , <i>ΔpyrR</i> , <i>ΔhsdM1S1R1</i> , <i>Δ(mcrB1-mcrB2-hsdM2S2R2-mrr)</i>
MK480	Derivative of the strain MK242; <i>ΔpyrF</i> , <i>ΔpyrR</i> , <i>ΔhsdM1S1R1</i> , <i>Δ(mcrB1-mcrB2-hsdM2S2R2-mrr)</i> , GK0707::P <i>gk704</i> - <i>bgaB</i> , <i>Δ(mutS-mutL)</i> , <i>ΔmutY</i> , <i>Δung</i> , <i>Δmf</i>

pUB307 was used as a conjugation helper plasmid. pSTE33T and pUCG18T autonomously replicate in *G. kaustophilus* due to pSTK1 and pBST1 replicons, respectively. pUC replicon is responsible for autonomous replication in *E. coli*. *AmpR*, *KmR*, and *TetR* denote ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance genes for *E. coli*, respectively. *G. kaustophilus* MK242 and MK480 lack genes related to pyrimidine biosynthesis (*pyrF* and *pyrR*) and DNA restriction–modification (*hsdM1S1R1*, *mcrB1*, *mcrB2*, *hsdM2S2R2*, and *mrr*). *G. kaustophilus* MK480 further lacks genes for DNA repair (*mutS*, *mutL*, *mutY*, *ung*, and *mf*). Other abbreviations: *Pgk704*, a promoter functional in *G. kaustophilus*; TK101, kanamycin resistance gene functional in *G. kaustophilus*; *oriT*, conjugative transfer origin; *tsr*, thiostrepton resistance gene; *cat*, chloramphenicol resistance gene.

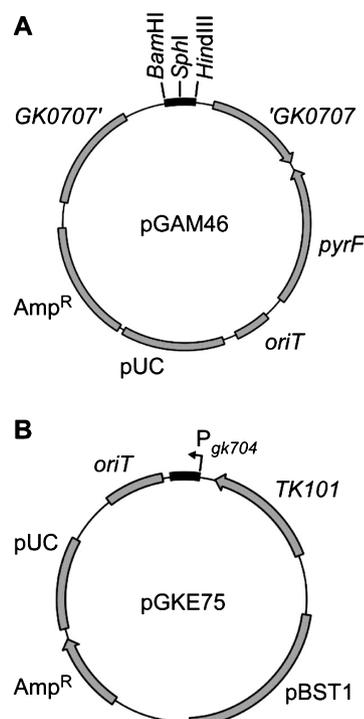
最少培地を用いて培養した。特記のない限り、培養は 60 °C で行った。最少培地は、以下の化合物を含む：硫酸カリウム (終濃度, 0.3 g L<sup>-1</sup>), リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (2.5 g L<sup>-1</sup>), 塩化アンモニウム (1 g L<sup>-1</sup>), 硫酸マグネシウム (0.4 g L<sup>-1</sup>), 塩化マンガン四水和物 (3 mg L<sup>-1</sup>), 塩化カルシウム二水和物 (5 mg L<sup>-1</sup>), 塩化鉄 (III) 六水和物 (7 mg L<sup>-1</sup>), 硫酸亜鉛七水和物 (0.4 g L<sup>-1</sup>), ホウ酸 (10 mg L<sup>-1</sup>), 塩化コバルト (II) (50 mg L<sup>-1</sup>), 硫酸銅 (II) (0.2 g L<sup>-1</sup>), 塩化ニッケル (II) (10 mg L<sup>-1</sup>), エチレンジアミン四酢酸 (0.25 mg L<sup>-1</sup>), およびトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸緩衝液 (10 mM, pH 7.0)。必要に応じて D-グルコース (10 g L<sup>-1</sup>), カザミノ酸 (1 g L<sup>-1</sup>), カナマイシン (5 mg L<sup>-1</sup>), およびウラシル (10 mg L<sup>-1</sup>) を添加した。 *G. kaustophilus* を利用した蛋白質生産には、酵母エキス (10 g L<sup>-1</sup>) を含む最少培地 (MY 培地) を使用した。

#### *G. kaustophilus* へのプラスミド導入

*G. kaustophilus* へのプラスミドの導入には、 *E. coli* からの二者接合伝達 (Suzuki & Yoshida, 2012) もしくは三者接合伝達 (Suzuki *et al.*, 2013) を利用した。二者接合伝達の場合は、核酸供与体に *E. coli* BR408 (Suzuki & Yoshida, 2012) を利用した。核酸供与体 (*E. coli* BR408) と核酸受容体 (*G. kaustophilus*) を菌体濁度 (OD<sub>600</sub>) が 0.3 になるまで培養し、細胞を混合後、遠心分離により細胞を濃縮した。混合細胞は、LB 固形培地上にスポットし、37 °C で 4 時間から一晩培養した後、回収した。回収した菌体は、適切な選択培地に塗布し、60 °C で一晩培養することで形質転換体を得た。三者接合伝達においては、核酸供与体に *E. coli* DH5 $\alpha$ , 接合伝達ヘルパーに *E. coli* DH5 $\alpha$  [pUB307] を利用した (大括弧はプラスミド保有状態を示す)。核酸供与体 (*E. coli* DH5 $\alpha$ ), 核酸受容体 (*G. kaustophilus*), および接合伝達ヘルパー (*E. coli* DH5 $\alpha$  [pUB307]) を菌体濁度が 0.3 になるまで培養し、細胞を混合後、二者接合伝達と同様な工程を経て形質転換体を得た。

#### *G. kaustophilus* で機能するプロモーターの探索

*B. subtilis* に関する知見を利用しながら、HTA426 株ゲノム中の糖質代謝関連遺伝子を予想し、その推定プロモーター領域を PCR で増幅した。得られた増幅断片をプラスミド pGAM46 (Fig. 7A) の *Hind* III-*Sph* I サイト間に挿入し、つづいてプロモーター領域下流の *Sph* I-*Bam* HI サイト間に耐熱性  $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子 (*bgaB*) を挿入した。これにより得られた *bgaB* 発現カセットを、ウラシルおよび 5-フルオロオロチン酸を利用したカウンター選択 (Suzuki *et al.*, 2012) を用いて、



**Fig. 7 Structures of the plasmids pGAM46 (A) and pGKE75 (B).** pGAM46 is a vector for gene integration into GK0707 locus. pGKE75 autonomously replicates in *G. kaustophilus*. Abbreviations: GK0707', GK0707 upstream region; 'GK0707, GK0707 downstream region; Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance gene; pUC, pUC replicon for *E. coli*; pBST1, pBST1 replicon for *G. kaustophilus*; *oriT*, conjugative transfer origin; *pyrF*, *pyrF* selection marker; TK101, kanamycin resistance gene functional in *G. kaustophilus*; P<sub>gk704</sub>, a promoter functional in *G. kaustophilus*.

*G. kaustophilus* 染色体の GK0707 locus に挿入した。得られた変異株を炭素源が異なる様々な最少培地中で培養し、培養菌体から粗酵素抽出液を調製した。粗酵素抽出液中の BgaB 量は、パラニトロフェニルガラクトピラノシド (*p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) を基質とした酵素活性分析により定量した。1 ユニットは、1 分間あたりに 1 nmol のパラニトロフェノール (*p*-nitrophenol) を遊離させる酵素量と定義した。

#### *G. kaustophilus* における異種遺伝子の発現

*G. kaustophilus* の GK0704 遺伝子上流のプロモーター領域 (*P<sub>gk704</sub>*) を PCR で増幅し、pGAM46 の *Hind* III-*Sph* I サイト間に挿入することで、pGAM48 を得た。つづいて pGAM48 の *Sph* I-*Bam* HI サイト間に、様々な異種好熱

菌遺伝子(*bgaB*, *amyE*, *PH0380*, *PH1171*, *PCAL1307*, および *ST0649*; Table 5) を挿入した. 得られたプラスミド中の発現カセットを, ウラシルおよび5-フルオロオロチン酸を利用したカウンター選択 (Suzuki *et al.*, 2012) によって, *G. kaustophilus* MK72 染色体の *GK0707* locus に挿入した. また各発現カセットを高コピーベクター pSTE33T (Suzuki & Yoshida, 2012) にサブクローニングし, *G. kaustophilus* MK72 を形質転換した. 形質転換体は, MY 培地中で菌体濁度が0.5になるまで培養し, つづいて異種遺伝子の発現を誘導するために終濃度1%のマルトースを培地に添加した. さらに20時間培養を続けた後, 培養菌体から粗酵素抽出液を調製した. それに含まれる異種好熱菌遺伝子の発現産物は, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分析した.

#### *G. kaustophilus* の高効率形質転換株の作製

*G. kaustophilus* HTA426 のゲノム中には, 数多くの制限修飾系遺伝子 (*hsdM<sub>1</sub>S<sub>1</sub>R<sub>1</sub>*, *hsdM<sub>2</sub>S<sub>2</sub>R<sub>2</sub>*, *mcrB<sub>1</sub>*, *mcrB<sub>2</sub>*, *mrr*, *GKP08*, および *GKP09*) が見出される. それら遺伝子の上流および下流領域を pGAM46 にクローニングし, 構築したプラスミドとウラシルおよび5-フルオロオロチン酸に基づくカウンター選択 (Suzuki *et al.*, 2012) を用いて, *G. kaustophilus* MK72 の制限修飾系遺伝子 (*hsdM<sub>1</sub>S<sub>1</sub>R<sub>1</sub>*, *hsdM<sub>2</sub>S<sub>2</sub>R<sub>2</sub>*, *mcrB<sub>1</sub>*, *mcrB<sub>2</sub>*, *mrr*) を破壊した. 得られた派生株は MK244 と命名した.

#### *G. kaustophilus* で機能する新たな薬剤選択マーカーの開発

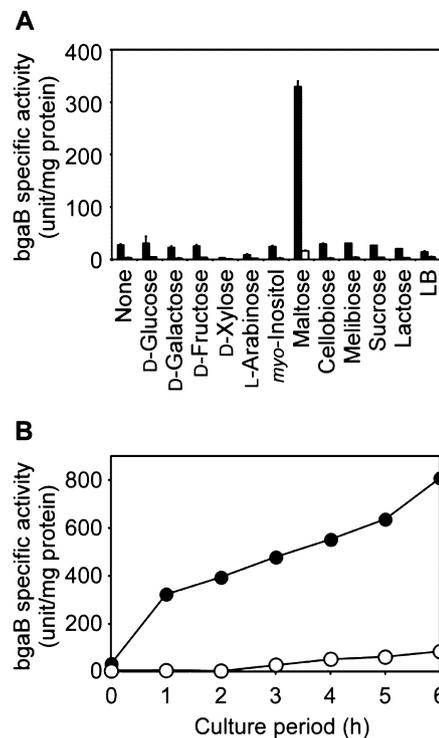
チオストレプトン耐性遺伝子 (*tsr*; Table 5) を, 自律複製型プラスミド pGKE75 (Fig. 7B) の  $P_{gk704}$  下流にクローニングすることで, pGKE75-*tsr* を得た. またクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*; Table 5) を pGKE75 の  $P_{gk704}$  下流にクローニングすることで, pGKE75-*cat* を得た. pGKE75-*tsr* と pGKE75-*cat* を高変異性好熱菌 (*G. kaustophilus* MK480) に導入し, 得られた形質転換体をチオストレプトンとクロラムフェニコールを含む LB 培地中で各々継代培養することで, 高温機能性のチオストレプトン耐性遺伝子ならびにクロラムフェニコール耐性遺伝子を発生させた.

### 結果および考察

#### *G. kaustophilus* における異種遺伝子発現

*G. kaustophilus* で機能する高発現プロモーターを同定するために, HTA426 ゲノム中の推定プロモーター領域を *bgaB* 遺伝子の上流に挿入し, 当該発現カセットを *G. kaustophilus* MK72 に導入した. 得られた形質転換体を炭素源が異なる様々な最少培地中で培養し, 産生され

る BgaB 量を比較したところ, 推定マルトース異化遺伝子群 (*GK0704*–*GK0707*) の上流領域 ( $P_{gk704}$ ) が, マルトース存在下において高発現することがわかった (Fig. 8A). その際の BgaB 比活性は, マルトースを含まない培地中で培養した場合よりも10倍以上高く, 本プロモーターはマルトースにより誘導されることが示唆された. 産生される BgaB 比活性は, MY 培地を用いることで向上し (Fig. 8B), 高コピープラスミド pSTE33T を用いて発現させることで更に向上した. このようにして最適化された発現方法を用いて, 様々な異種好熱菌の酵素遺伝子を *G. kaustophilus* 中で発現させたところ, *amyE*, *PH1171*, および *PCAL1307* 遺伝子が機能的に発現し,



**Fig. 8** *bgaB* expression in *G. kaustophilus*. (A) *G. kaustophilus* strains that harbor *bgaB* gene in chromosome under the control of  $P_{gk704}$  (solid bars) and  $P_{sigA}$  (hollow bars) was cultured in minimum media supplemented with the indicated sugar. Crude extracts were prepared from the resulting cells and analyzed for BgaB specific activity. (B) *G. kaustophilus* strain that harbors *bgaB* in chromosome under the control of  $P_{gk704}$  was cultured in MY medium. When OD600 reached 0.5, maltose was added to the medium at a final concentration of 1% (solid circles). After the medium was further incubated for the indicated period, crude extracts were prepared from the resulting cells and analyzed for BgaB specific activity. The culture without maltose was used as control (hollow circles).

**Table 5** Expression of heterologous genes in *Geobacillus kaustophilus*

Gene	Origin	Gene product	Relevant descriptions
bgaB	<i>G. stearothermophilus</i>	β-Galactosidase	This gene functionally expressed and conferred β-galactosidase activity.
amy	<i>G. stearothermophilus</i>	α-Amylase	This gene functionally expressed and caused extracellular α-amylase production.
PH0380	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	NTP transferase	The gene product was produced as soluble protein although not in <i>E. coli</i> .
PH1171	<i>P. horikoshii</i>	Cellulase	This gene functionally expressed and conferred cellulase activity.
PCAL1307	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Esterase	This gene functionally expressed and conferred esterase activity.
ST0649	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	D-Lactate dehydrogenase	The gene product was produced as soluble protein.
pyrF	<i>Geobacillus subterraneus</i>	OMP decarboxylase	This gene functionally expressed and was responsible for uracil prototrophy, although not in <i>E. coli</i> .
pyrF	<i>Bacillus caldolyticus</i>	OMP decarboxylase	This gene functionally expressed and was responsible for uracil prototrophy.
pyrF	Unknown thermophile	OMP decarboxylase	This gene functionally expressed and was responsible for uracil prototrophy.
tsr	<i>Streptomyces azureus</i>	RNA methyltransferase	This gene functionally expressed and conferred thiostrepton resistance.
cat	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chloramphenicol acetyltransferase	This gene functionally expressed and conferred chloramphenicol resistance.

それによってデンプン分解能、セルロース分解能、およびトリブチリン分解能が各々 *G. kaustophilus* に付与された (Table 5). *amyE* と *PH1171* の発現産物は細胞外に有意に生産された。酵素活性は確認していないが、*PH0380* および *ST0649* の発現産物が *G. kaustophilus* 細胞内に産生されることも確認した。以上の結果は、*G. kaustophilus* において異種好熱菌遺伝子が広く発現すること、そして好熱菌遺伝子の探索や細胞内分析において、*G. kaustophilus* を宿主とした発現系が有用であることを示唆している。また *PH0380* 発現産物は、大腸菌中では産生されなかったことから、*G. kaustophilus* 発現系は大腸菌発現系よりも、好熱菌遺伝子の発現に有利と言える。

#### *G. kaustophilus* の高効率形質転換株の作製

ある好熱菌のゲノムライブラリーを *G. kaustophilus* を宿主として構築できれば、その好熱菌の未知遺伝子を細胞内分析によって同定しやすくなる。*G. kaustophilus* へのプラスミド導入は、*E. coli* BR408 からの二者接合伝達によって行えるため (Suzuki & Yoshida, 2012), *E. coli* BR408 を宿主としたライブラリーが構築できれば、*G. kaustophilus* を宿主としたゲノムライブラリーの構築も理論上は可能である。しかしながら、*E. coli* BR408 の低い形質転換効率を理由に、*E. coli* BR408 株ひいては *G. kaustophilus* を宿主としたゲノムライブラリーの構築は、非常に困難であった。そこで本研究では、DNA 制限修飾系を欠失させることで形質転換効率を向上させた *G. kaustophilus* MK244 を作製し、*E. coli* DH5α からの接

**Table 6** Transformation efficiencies of *Geobacillus kaustophilus* using conjugation

<i>E. coli</i> donor	<i>G. kaustophilus</i> recipient	<i>E. coli</i> helper	Transformation efficiency (recipient <sup>-1</sup> )
BR408	HTA426	—	(1.3 ± 1.1) × 10 <sup>-4</sup>
DH5α [pUB307]	HTA426	—	<1 × 10 <sup>-7</sup>
DH5α [pUB307]	MK72	—	<1 × 10 <sup>-7</sup>
DH5α [pUB307]	MK244	—	(1.3 ± 0.8) × 10 <sup>-5</sup>
DH5α	HTA426	DH5α [pUB307]	<1 × 10 <sup>-7</sup>
DH5α	MK72	DH5α [pUB307]	<1 × 10 <sup>-7</sup>
DH5α	MK244	DH5α [pUB307]	(6.4 ± 4.3) × 10 <sup>-4</sup>

*G. kaustophilus* was transformed with pUCG18T using binary and ternary conjugation systems. The binary conjugation was performed between *G. kaustophilus* recipient and *E. coli* donor. The ternary conjugation was performed among *G. kaustophilus* recipient, *E. coli* DH5α donor, and the helper *E. coli* DH5α [pUB307]. Transformation efficiencies are expressed as the number of transformants per total number of recipients (mean ± SD; n = 4).

合伝達を利用した本株の形質転換を検証した。*E. coli* DH5α は広く利用される大腸菌株で、形質転換効率も高いことから、*E. coli* DH5α からの接合伝達が可能であれば、*G. kaustophilus* を宿主としたゲノムライブラリーの構築も容易になる。期待通り、MK244 株は *E. coli* DH5α から転移してきた接合伝達プラスミドを効率よく受容した (Table 6)。その際の形質転換効率は、*E. coli* BR408 株を用いた接合伝達によるものと同程度で、接合伝達ヘルパーを用いた三者接合伝達においても、MK244 株はプラスミドを効率よく受容した。さらに三者接合伝達を用いたプラスミド導入によって、*G. kaustophilus* MK244 を宿主とした好熱菌ゲノムの高規模ライブラリーも構築できた。得られた MK244 ライブラリーをウラシル原栄養性に基づきスクリーニングしたところ、複数の異種好熱菌の *pyrF* 遺伝子が同定できた (Table 5)。本結果は、*G. kaustophilus* MK244 を利用することで好熱菌 DNA の

ライブラリーが構築できること, ならびに当該ライブラリーが好熱菌遺伝子の活性スクリーニングに有効であることを示す。注目すべきことに, ここで同定された一部の *pyrF* 遺伝子は, 大腸菌内では発現しなかった (Table 5)。よって *G. kaustophilus* は, 好熱菌遺伝子の細胞内分析のための宿主として, 常温菌よりも有利といえる。

#### 高温機能性チオストレプトン耐性遺伝子の創出

微生物の複雑な遺伝子改変は, 複数の薬剤選択マーカーがあると容易になる。しかし, *Geobacillus* 属細菌で使用される薬剤選択マーカーは, カナマイシン耐性遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子に限られており, これは *Geobacillus* 属細菌の高度な遺伝的改変を制限する原因となっている。そこで本研究では, *G. kaustophilus* 細胞内の自発的変異を利用した耐熱化指向性の遺伝子変異 (Suzuki *et al.*, 2015) を利用して, *G. kaustophilus* で機能するチオストレプトン耐性マーカーの開発に取り組んだ。pGKE75-*tsr* で高変異性好熱菌 (*G. kaustophilus* MK480) を形質転換し, 形質転換体をチオストレプトン含有培地上で継代培養したところ, 60°C でチオストレプトン耐性を示す株が得られた。それらの株は, *tsr* 発現産物の H258Y 置換体をコードする変異遺伝子 (*tsr*<sub>H258Y</sub>) を有していた。*G. kaustophilus* MK242 [pGKE75-*tsr*] は, 50°C ではチオストレプトン耐性を示したが, 55°C で示さなかった。それに対し *G. kaustophilus* MK242 [pGKE75-*tsr*<sub>H258Y</sub>] は, 55°C でもチオストレプトン耐性を示した (Table 7)。また pGKE75-*tsr*<sub>H258Y</sub> は, チオストレプトンを選択薬剤とした *G. kaustophilus* の形質転換に利用でき, それに要するチオストレプトン濃度も低いものであった (*G. kaustophilus* に対するチオストレプトンの半数阻害濃度, 約 50 µg l<sup>-1</sup>)。以上の結果は, チオストレプトンが選択薬剤として実用的であること, そして *tsr*<sub>H258Y</sub> 遺伝子が *G. kaustophilus* の遺伝子改変に有用であることを示す。

#### 高温機能性クロラムフェニコール耐性遺伝子の創出

クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) は, *Geobacillus* 属細菌の形質転換に利用される薬剤選択マーカーの 1 つだが, 機能温度が低いため, その利便性は低い。そこで本研究では, *G. kaustophilus* 細胞内の自発的変異を利用した耐熱化指向性の遺伝子変異 (Suzuki *et al.*, 2015) を用いて, より高温で機能するクロラムフェニコール耐性マーカーの開発に取り組んだ。pGKE75-*cat* で *G. kaustophilus* MK480 を形質転換し, クロラムフェニコールを含有する培地上で継代培養したところ, 60°C でも安定にクロラムフェニコール耐性を示す株が得られた。それらは *cat* 発現産物の A138T 置換体をコードする変異遺伝子 (*cat*<sub>A138T</sub>) を有していた。*G. kaustophilus* MK242 [pGKE75-*cat*<sub>A138T</sub>] も, 60°C では効率的なクロラムフェニコール耐性を示した (Table 7)。しかし 65°C ではクロラムフェニコール感受性であったことから, より高温で機能するクロラムフェニコール耐性マーカーの発生を目的とし, *G. kaustophilus* MK480 [pGKE75-*cat*<sub>A138T</sub>] をクロラムフェニコール含有培地上で継代培養したところ, 65°C でも安定にクロラムフェニコール耐性を示す株が得られた。それが有するプラスミド pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> は, *G. kaustophilus* MK242 にも 65°C におけるクロラムフェニコール耐性を付与した (Table 7)。pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> の全塩基配列を解析したところ, 大腸菌内複製に必要な pUC レプリコン領域内に 2ヶ所の変異が見出された。これら変異は, いずれも高温クロラムフェニコール耐性に重要で, どちらか一方の変異だけでは高温クロラムフェニコール耐性の効率は低下した。pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> もしくはその親プラスミド pGKE75-*cat*<sub>A138T</sub> を保有する *G. kaustophilus* を液体培養した場合は, それら細胞内における CAT 活性, プラスミドコピー数, およびアセチル CoA 濃度に大きな差異は見られなかった。しかし平板培養した場合は, *G. kaustophilus* [pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub>] の CAT 活性は, *G. kaustophilus* [pGKE75-*cat*<sub>A138T</sub>] のも

**Table 7** Antibiotic resistance of *Geobacillus kaustophilus* carrying the indicated plasmid

Plasmid	Antibiotic	Culture temperature (°C)				
		50	55	60	65	70
pGKE75- <i>tsr</i>	Thiostrepton	+	-	-	-	-
pGKE75- <i>tsr</i> <sub>H258Y</sub>	Thiostrepton	+	+	-	-	-
pGKE75- <i>cat</i>	Chloramphenicol	+	+	±	-	-
pGKE75- <i>cat</i> <sub>A138T</sub>	Chloramphenicol	+	+	+	-	-
pGKE75 <sup>mut</sup> - <i>cat</i> <sub>A138T</sub>	Chloramphenicol	+	+	+	+	-

+, substantial resistance; ±, weak resistance; -, negligible resistance

のよりも顕著に高く、一方で pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> の *G. kaustophilus* 内プラスミドコピー数は、pGKE75-*cat*<sub>A138T</sub> のものよりも低い傾向が見られた。どうやら pUC レプリコン内の変異が *G. kaustophilus* 細胞内におけるプラスミド複製に影響を与え、pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> の *G. kaustophilus* 内コピー数を減少させたい。そして、そのコピー数減少がプラスミド維持エネルギーを減少させ、高温条件下における CAT 蛋白質産生の向上ひいてはクロラムフェニコール耐性効率の向上を引き起こしたと考えられる。注目すべきことに、pGKE75<sup>mut</sup>-*cat*<sub>A138T</sub> は *cat*<sub>A138T</sub> 遺伝子を選択マーカーとして *G. kaustophilus* を形質転換することができた。よって本プラスミドも、*G. kaustophilus* の遺伝子改変に有用と期待できる。

## 要 約

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来の糖代謝関連酵素の中には、大腸菌の類似酵素と比して、低い濃度の基質を代謝出来るが、その反応速度が遅いものが存在する。そこで、活性中心に位置する単一のアミノ酸残基に変異を導入することで、活性が促進された変異体の創製に成功した。また、C-末端のアミノ酸領域に欠失を導入することでも活性の上昇が確認された。これらの方法で作製された変異体酵素は応用面での利用に期待が持てる。

温泉土壌より得られた未知の微生物由来の遺伝子資源を用いて、既存の耐熱性 DNA ポリメラーゼである *Thermus aquaticus* 由来 DNA ポリメラーゼ (Taq ポリメラーゼ) の一部に未知の配列を融合させたキメラ酵素を創製し、活性スクリーニングにより、野生型より速い DNA 合成活性を持つ酵素を同定した。挿入された未同定遺伝子の配列を解析したところ、DNA ポリメラーゼのフィンガーサブドメインに相当する部位に挿入された 9 アミノ酸が DNA 鎖伸長活性を促進する可能性を見出した。野生型 Taq ポリメラーゼの相当する部位に 9 アミノ酸を挿入した組換え蛋白質を作製し機能解析した結果、DNA 結合能が上がりより速い DNA 合成活性を有しており、しかも耐熱性を保持して PCR に応用できる酵素の創製に成功した。

また、様々な好熱菌遺伝子を容易に細胞内分析することを目的とし、*G. kaustophilus* HTA426 の遺伝学的ツールを広く開発した。P<sub>gk704</sub> は、HTA426 株中で機能する高発現プロモーターとして有用で、これを用いると様々な異種好熱菌遺伝子を発現できた。それら好熱菌遺伝子の多くは機能的に発現し、様々な機能を *G. kaustophilus* に付与した。一部の好熱菌遺伝子は、大腸菌中では機能的に発現しなかったことから、本発現システムは常温菌発現システムよりも好熱菌遺伝子の細胞内分析ツールと

して有利といえる。また本研究では、*E. coli* DH5 $\alpha$  からの三者接合伝達による *G. kaustophilus* 形質転換法を確立した。さらに、より高温で機能するチオストレプトン耐性遺伝子やクロラムフェニコール耐性遺伝子も創出した。これらは、*G. kaustophilus* を宿主とした好熱菌ゲノムライブラリーの構築や、*G. kaustophilus* の複雑な遺伝子改変を可能にする。以上のように確立された遺伝学的ツールは、より幅広い好熱菌遺伝子の分析に貢献すると期待できる。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Kawarabayasi, Y. The hyperthermophilic enzymes involved in carbohydrate metabolism as valuable resource for engineering, The 16th Japan-Germany Workshop on Enzyme Technology, September, 2011. Toyama, Japan
- 2) Kawarabayasi, Y. Characterization of the novel carbohydrate metabolic enzymes from the thermophilic archaea and their improvement, Engineering Conference international, September, 2011. Vail, USA
- 3) 鈴木宏和. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* を利用した高温バイオプロセス基盤の創出. 第12回 極限環境生物学会シンポジウム, 2011年6月, つくば市
- 4) 鈴木宏和, 吉田健一, 大島敏久, 河原林 裕. 好熱性グラム陽性桿菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の分子育種基盤の構築. 第12回 極限環境生物学会年会, 2011年11月, 長崎
- 5) 鈴木宏和, 大島敏久, 河原林 裕. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における異種耐熱性酵素遺伝子の発現. 2012年度日本農芸化学会大会, 2012年3月, 京都
- 6) Kawarabayasi, Y. Genome-based identification and improvement of novel activity on the thermostable sugar metabolic enzymes from archaea, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, September, 2012. Kanazawa, Japan
- 7) 河原林 裕. 好熱性アーキア酵素のアミノ酸置換による活性促進, 2012年度 酵素補酵素研究会, 2012年7月, 名古屋
- 8) Suzuki, H., Ohshima, T. & Kawarabayasi, Y. Heterologous gene expressions in *Geobacillus kaustophilus* HTA426 for generating functional thermophiles. 9th International Congress on Extremophiles, September, 2012. Sevilla, Spain
- 9) Kawarabayasi, Y. Opportunity of genomic information on thermophilic archaea, Delhi University, South Campus Seminar, July, 2012. New Delhi, India
- 10) 鈴木宏和, 古川 恵. *Geobacillus kaustophilus* HTA426 において DNA 変異を誘発する遺伝子改変. 2013年度日本農芸化学会大会, 2013年3月, 仙台
- 11) 鈴木宏和, 和田圭介, 古川 恵, 土居克己, 大島敏久. 三者接合法による *Geobacillus kaustophilus* HTA426 への高効率プラスミド導入. 2013年度日本生物工学会, 2013年9月, 広島
- 12) Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M. & Doi, K. 2013. Thermostabilization-directed gene evolution using

- adaptive mutations in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *BioMicroWorld*, 2013. Madrid, Spain
- 13) Kawarabayasi, Y. Characterization of Archaeal Enzymes with Thermostability for Enzymatic Production of Nucleotide-Sugar Molecules, *Enzyme Engineering XXII*, November, 2013. Toyama, Japan
  - 14) 鈴木宏和, 小林淳平, 古川 恵. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 における DNA 修復系遺伝子の発現変化. 2014年度日本農芸化学会年会, 2014年3月, 東京
  - 15) 和田圭介, 小林淳平, 古川 恵, 土居克実, 鈴木宏和. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の高変異性株を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子変異. 2014年度日本農芸化学会年会, 2014年3月, 東京
  - 16) 小林淳平, 古川 恵, 鈴木宏和. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 で機能するクロラムフェニコール耐性プラスミドの創出. 2014年度日本農芸化学会年会, 2014年3月, 東京
  - 17) 本田裕樹, 藏 茜(Qian Zang), 清水泰博, 大島敏久, 張 子蓮, 河原林 裕, 超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 ST0452 タンパク質へ導入された変異の UDP-GlcNAc 合成活性に与える影響の解析. 日本農芸化学会, 2015年3月, 岡山
  - 18) Kawarabayasi, Y. Importance of the functional analyses on enzymatic activities and metabolic pathways for utilization of the thermophilic archaeal genomic data, *Molecular Biology Society of Japan*, December, 2015. Kobe, Japan
  - 19) Ishino, S., Kajitani, Y., Watanabe, N., Yamagami, T. & Ishino, Y. 2015. Development of genetic engineering enzymes derived from research on DNA transactions of microorganisms. Workshop "The novel microbial functions based on variety and specificity and their applications." 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月, 神戸
  - 20) 河原林 裕. 超好熱アーキア由来糖代謝関連酵素のユニークな特徴, 微生物学の新たな発展, ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム, 2015年12月, 宮崎

原著論文

- 1) Zhang, Z., Shimizu, Y. & Kawarabayasi Y. 2015. Characterization of the amino acid residues mediating the unique amino-sugar-1-phosphate acetyltransferase activity of the archaeal ST0452 protein. *Extremophiles* **19**: 417–427.
- 2) Akutsu, J., Zhang, Z., Morita, R. & Kawarabayasi, Y. 2015. Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles* **19**: 1077–1085.
- 3) Yamagami, T., Matsukawa, H., Tsunekawa, S., Kawarabayasi, Y., Ishino, S. & Ishino, Y. 2015. A longer finger-subdomain of family A DNA polymerases found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities. *Gene* **576**: 690–695.
- 4) Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y. & Ishino, Y. 2014. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front. Microbiol.* **5**: 261.

- 5) Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M. & Doi, K. 2014. Thermostability-directed enzyme evolution in an error-prone thermophile derived from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 149–158.
- 6) Suzuki, H., Yoshida, K. & Ohshima, T. 2013. Polysaccharide-degrading thermophiles generated by heterologous gene expression in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 5151–5158.
- 7) Suzuki, H., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K. & Ohshima, T. 2013. A ternary conjugation system for the construction of DNA libraries for *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 2316–2318.

総説

- 1) 鈴木宏和, 2011. 高温バイオプロセスを志向した好熱菌の遺伝子工学. 極限環境生物学会誌 **10**: 69–76.
- 2) 鈴木宏和, 大島敏久, 2012. 第5章5節 高温バイオプロセスのための好熱菌宿主の開発, 極限環境生物の産業展開, p.153–159, シーエムシー出版.
- 3) Kawarabayasi, Y. 2013. "Improvement of Thermostable Enzyme with Sugar Metabolic Activity by Targeted Mutagenesis" In *Advances in Enzyme Biotechnology*, ed. Shukla, P. & Pletschke, B. Springer, pp 1–8.

謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄付金による援助のもと行われたもので、ここに感謝の意を表したい。また、本研究への九州大学大学院農学研究院大島敏久教授のご支援とご協力に感謝の意を表したい。さらに本研究は、協力講座（微生物遺伝子資源学分野、生物化学分野、蛋白質科学分野）の皆様、当寄付講座に在籍したポストドク・技術補佐員等の職員並びに教官の皆さん、当分野で実質的な研究を行った大学院生・学部生の皆様のご協力の元で成し遂げられたもので、ここに感謝の意を表したい。

機能解析実験をおこなっていただいた九州大学生物資源環境科学府の松川博昭氏と恒川冨恵氏に感謝の意を表したい。

当該プロジェクト [Ⅲ] に参画していただいた小林淳平博士（現：神戸大学）、古川 恵技術補佐員、および学生の皆様、ならびに好熱菌遺伝子操作の技術開発にあたり多大な協力を賜りました吉田健一教授（神戸大学）に心より感謝したい。

文 献

- Eom, S.H., Wang, J. & Steitz, T.A. 1996. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* **382**: 278–281.
- Ishino, S. & Ishino, Y. 2014. DNA polymerase as a useful reagent

- for genetic engineering ~history of developmental research on DNA polymerase-. *Front. Microbiol.* **5**: 465.
- Perler, F.B., Kumar, S. & Kong, H. 1996. Thermostable DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* **48**: 377–435.
- Suzuki, H., Kobayashi, J., Wada, K., Furukawa, M. & Doi, K. 2015. Thermoadaptation-directed enzyme evolution in an error-prone thermophile derived from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 149–158.
- Suzuki, H., Murakami, A. & Yoshida, K. 2012. Counterselection system for *Geobacillus kaustophilus* HTA426 through disruption of *pyrF* and *pyrR*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7376–7383.
- Suzuki, H. & Yoshida, K. 2012. Genetic transformation of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 by conjugative transfer of host-mimicking plasmids. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1279–1287.
- Suzuki, H., Wada, K., Furukawa, M., Doi, K. & Ohshima, T. 2013. A ternary conjugation system for the construction of DNA libraries for *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 2316–2318.
- Suzuki, T., Iwasaki, T., Uzawa, T., Hara, K., Nemoto, N., Kon, T., Ueki, T., Yamagishi, A. & Oshima, T. 2002. *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles* **6**: 39–44.
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F. & Horikoshi, K. 1997. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 279–285.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G.-J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S. & Uchiyama, I. 2004a. Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Res.* **32**: 6292–6303.
- Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shinamura, S. & Takaki, Y. 2004b. Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. *Extremophiles* **8**: 351–356.
- Terpe, K. 2013. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 10243–10254.
- Yamagishi, A. & Oshima, T. 1990. Circular chromosomal DNA in the sulfur-dependent archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1133–1136.
- Zhang, Z., Tsujimura, M., Akutsu, J., Sasaki, M., Tajima, H. & Kawarabayasi, Y. 2005. Identification of an extremely thermostable enzyme with dual sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from an acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J. Biol. Chem.* **280**: 9698–9705.
- Zhang, Z., Akutsu, J., Tsujimura, M. & Kawarabayasi, Y. 2007. Increasing in archaeal GlcNAc-1-P uridylyltransferase activity by targeted mutagenesis while retaining its extreme thermostability. *J. Biochem.* **141**: 553–562.



# 平成26年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成26年4月～平成28年3月



汽水湖に生息する孔径 0.22  $\mu\text{m}$  の  
メンブレンフィルターを通過可能な  
極微小微生物の分離と、地理分布、  
系統学的多様性およびその生態の解明

新谷 政己

静岡大学大学院工学領域  
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

目的：静岡県浜松市の佐鳴湖は、水深が浅く、川で連結された下流の浜名湖から潮汐の影響で塩濃度の高い水が遡上するため、滞留時間の長い（40日前後）汽水湖である。先行研究で、本湖から孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターを通過し、培養可能な極微小微生物が存在することが示されたため、本研究では、本湖とその周囲に生息する極微小微生物の分布と種類を明らかにすることを目的として行った。

方法：佐鳴湖とその周辺的环境水から、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターを通過可能な微生物を、栄養源の種類・濃度を変えた培地を用いて単離後、16S rRNA 遺伝子配列を解読し、系統学的解析を行った。また単離株について、透過型電子顕微鏡観察を行うとともに、様々な炭素源や、異なる塩濃度・温度の培養条件下で生育試験を行った。新種と推定される菌株については全ゲノム配列を解読し、その新奇性について検証を行った。さらに、佐鳴湖とその周辺（上流の段子川、下流の新川、および下流でつながる浜名湖）の各環境試料を濾過し、濾過前後の試料から全 DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子を増幅し、産物の塩基配列を解読して菌叢比較を行った。

結果・考察：これまでに 385 コロニーを得て、そのうち 145 株については単離後、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統分類学的解析を行った。得られた菌株は、*Proteobacteria* 門 (74株)、*Bacteroidetes* 門 (44株)、*Firmicutes* 門 (18株)、*Actinobacteria* 門 (9 株) に属すると推定された。このうち *Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門に属する一部の菌株は、新目、新属細菌と推定され、いずれもフィルターを通過しうると示唆さ

れた。*Bacteroidetes* 門に属する菌株 M8-2, M15, M34 株は、それぞれ *Algoriphagus* 属、*Flavobacterium* 属や *Aquiflexum* 属細菌の基準株と 16S rRNA 遺伝子が類似していたが、特に M15 および M34 株はその一致度が 92–93% と低かった。またいずれも近縁種とは異なる基質を代謝可能で、特に M15 株が、近縁種より多くの基質を代謝できることが示唆された。3 株のゲノム配列を解読したところ、それぞれ 3.88 Mb (M8-2 株)、4.89 Mb (M15 株)、2.91 Mb (M34 株) であり、各近縁種と比べると、ゲノムサイズは比較的小さかった。また *Proteobacteria* 門の新目候補株についても、ゲノムサイズが 3.65 Mb と小さかった。

一方、湖水中の細菌を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターに捕集した試料（通常サイズの微生物）、濾過液をさらに孔径 0.1  $\mu\text{m}$  フィルター上に捕集した試料（極微小微生物）について、菌叢解析を行った。その結果、通常サイズの微生物の試料と比較して、極微小微生物の試料中の細菌叢は、いずれの地点でも *Proteobacteria* 門・*Bacteroidetes* 門が優占化しており、両者の合計は、試料の細菌叢の 90% 以上を占めた。上流域では *Bacteroidetes* 門の占める割合がより高く、佐鳴湖下流の新川との接続地点を境に *Proteobacteria* 門の割合が高くなっていた。どの地点においても、*Bacteroidetes* 門の 90% 以上を *Flavobacterium* 綱が占めており、顕著にフィルターを通過することが示唆された。*Proteobacteria* 門については、上流域では *Alphaproteobacteria* および *Betaproteobacteria* 綱が、中流では *Gammaproteobacteria* 綱が、下流域では *Alphaproteobacteria* 綱の細菌が優占化しており、上流・中流・下流域で異なる極微小微生物が生息する可能性が示された。

倒木に発生する変形菌類の窒素炭素安定  
同位体比分析による食性解析と、  
変形菌類が倒木中の養分無機化および  
樹木実生の生長に果たす役割の解明

深澤 遊

東北大学大学院農学研究科  
fukasawayuu@gmail.com

目的：森林生態系において倒木など植物遺体中に広く生息する変形菌類は、細菌や菌類を摂食することで養分を無機化し、物質循環に重要な役割を果たしていると考えられるが、その食性や養分無機化機能を評価した研究は少なく、生態系の中での役割はよくわかっていない。本研究では、様々な分解段階の倒木に発生する多種の変形菌および菌類の窒素炭素安定同位体比を網羅的に解析することで、倒木に発生する変形菌の食性を明らかにすると共に、室内実験により変形菌の無機化機能を明らかにすることを目的とした。

方法：山形県千歳山国有林のアカマツとコナラが優占する二次林において、様々な分解段階のアカマツ倒木に発生する変形菌と餌候補である真菌の子実体発生パターンを2013年から2015年にかけて調査し、結果を座標付け分析により解析した。また、採集した変形菌16種34サンプル、真菌11種29サンプル、およびアカマツ倒木の材について、窒素炭素安定同位体比を測定した。さらに、枯死木上によく見られ、真菌の子実体を摂食している様子が観察されている変形菌であるイタモジホコリ (*Physarum rigidum*) の変形体を用いたマイクロコズム実験を用いて、木紛中での変形体の活動による養分無機化について検証した。

結果・考察：アカマツ倒木上に発生した変形菌と真菌の子実体について、共通した発生パターンを示す組み合わせを複数見いだした。例えば、真菌のニガクリタケ (*Hypholoma fasciculare*) と変形菌のトビゲウツボホコリ (*Arcyria ferruginea*) は、倒木分解の初期に同じ倒木に発生する傾向があった。また、真菌のチャホウキタケモドキ (*Ramaria apiculata*)、ツエタケ属菌

(*Oudemansiella* sp.)、スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*)、マツオウジ (*Neolentinus suffrutescens*)、クヌギタケ属菌 (*Mycena* spp.)、ムラサキゴムタケ (*Asco-coryne sarcoides*) と変形菌のタチフンホコリ (*Cribraria cribrarioides*) およびシロウツボホコリ (*Arcyria cinerea*) は、倒木分解の比較的後期に同じ倒木に発生する傾向があった。変形菌の炭素安定同位体比はサンプルにより大きくばらついたが、平均23.5%で、真菌の22.9%と近い値であった。一方、腐朽材の<sup>13</sup>C炭素安定同位体比は26.5%と、変形菌や真菌の値とは大きく異なったことから、変形菌は腐朽材よりもむしろ真菌を炭素源としている可能性が示唆された。また、変形菌の<sup>15</sup>N窒素安定同位体比は真菌の値よりも平均で1.2%程度高く、やはり変形菌が真菌を摂食している可能性が示唆された。さらにマイクロコズム実験では、イタモジホコリの生きた変形体を入れた木紛でナトリウム、硝酸、マグネシウム、カルシウムの各イオン濃度が増加しており、変形体の働きによる無機化が起こった可能性が示唆された。以上の結果は、枯死木中において変形菌が真菌を摂食し、養分の無機化に貢献していることを示唆している。

従属栄養性珪藻類の進化・多様性と  
分子生態学的研究基盤の確立

神川 龍馬

京都大学大学院地球環境学堂/人間・環境学研究科  
kamikawa.ryoma.7v@kyoto-u.ac.jp

目的：一次生産の20%を担うと報告されている珪藻類は最も記載された種数の多い藻類の一つであり、水圏生態系の重要な一次生産者として生態系の維持に貢献している。これは珪藻類が非常に効率の良い二酸化炭素濃縮機構を有しているためと考えられている。このように、主要な一次生産者として知られている珪藻類であるが、一次生産者であるはずの珪藻類において偏性従属栄養性を示す種が知られている。従属栄養性珪藻類が担う生態的役割および一次生産者から分解者へ

の進化過程を理解するため、従属栄養性珪藻類培養株の詳細な形態観察ならびに分子情報の蓄積および分子系統解析を行った。

方法：サンプリングは沖縄県石垣市にあるマングローブ林にて行い、環境サンプルから従属栄養性珪藻類をマイクロピペティング法にて単離した。単離・株化した従属栄養性珪藻類は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて観察した。得られた株の核コード 28S rRNA 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子配列を PCR 増幅後、サンガー法にて決定した。分子系統解析は最尤法およびベイズ法を用いて行った。得られた従属栄養性珪藻類の葉緑体ゲノムを次世代シーケンサーで解読した。

結果・考察：従属栄養性珪藻類の形態観察の結果、これまでに得られている株は披針形や S 字など形態的特徴に多様性が見られた。透過型電子顕微鏡観察の結果、4 重膜に包まれた構造が観察され、この構造は縮退した葉緑体であると考えられた。従属栄養性珪藻類への進化を解析するため、従属栄養性珪藻類の 28S rRNA 遺伝子配列を決定した。珪藻類の 28S rRNA 遺伝子分子系統解析では、従属栄養性珪藻類は単系統群を形成せず、少なくとも 3 つの独立したクレードを形成した。このことは、従属栄養性珪藻類が比較的最近になって、複数回独立して光合成性から従属栄養性への進化を遂げたことを示唆している。これらの株からは葉緑体 16S rRNA 遺伝子が決定できたため、従属栄養性珪藻類が葉緑体を有している可能性がさらに支持された。これらの配列は、光合成性種の配列と比較して進化速度が非常に大きく、塩基配列進化における機能的な制約が緩んでいることを示唆している。独立して生じた光合成能の喪失進化が葉緑体ゲノムに及ぼした影響を解析するため、系統的に遠縁な 2 株の従属栄養性珪藻類の葉緑体ゲノムを比較解析した。その結果、ゲノム上に存在する遺伝子は 2 ゲノム間に違いが見られたものの、光合成に関連する遺伝子はほぼ欠失している点が共通しており、従属栄養性生物への収斂的ゲノム進化が観察された。

## 植物寄生菌の熱帯環境への適応進化の解明

高松 進

三重大学大学院生物資源学研究所  
takamatu@bio.mie-u.ac.jp

目的：重要な植物寄生菌の一つであるうどんこ病菌は北半球高緯度地域で最初に分化し、初期の宿主である広葉落葉樹とともに新生代第三紀の地球の冷涼化に伴って南方に移動したと考えられる。その後、一部の種が熱帯、亜熱帯地域へと分布を拡大したのであろう。私たちは数年前から東南アジアを中心とする熱帯地域に生息するうどんこ病菌の系統解析を行った結果、温帯地域では見ることのできない特異な菌が多く分布することが明らかになってきた。これは熱帯という温帯とは全く異なる環境にうどんこ病菌が適応して進化した結果生まれてきた菌類であると考えている。しかし、それらの全貌については未だに明らかではないので、本研究ではうどんこ病菌の熱帯環境への適応進化の実態とその要因について明らかにしようとした。本研究の目的は大きく二つに分けられる。1) 広範囲の熱帯果樹・樹木類に寄生するうどんこ病菌は同一種なのかを明らかにする。2) 東南アジアおよびわが国を含む東アジアにおける未記録種を探索する。

方法：インドネシアやタイなどの東南アジア熱帯地域および日本を含む東アジア地域でうどんこ病罹病標本を採集し、分子系統解析および形態観察に供した。分子系統解析では、キレックス法により全 DNA を抽出し、PCR 法により rDNA ITS 領域、28S rDNA D1/D2 領域および IGS 領域を増幅した。増幅領域の DNA シークエンスを決定し、最大節約法および最尤法により系統樹を作成した。分生子世代の形態観察では、Shin & La (1993) の方法により乳酸を用いて乾燥標本からの形状復元を行い、分生子、分生子柄、付着器、発芽管のサイズ、形状を記録した。閉子のう殻がある場合は 3% 水酸化ナトリウム水溶液にマウントし、閉子のう殻、付属糸、子のう、子のう胞子の数、サイズ、形状

等を記録した。

結果・考察：東南アジアで採集した熱帯果樹類うどんこ病菌の分子系統解析と形態観察を行った結果、ドリアン、ランブータン、ブーヒニアに寄生するうどんこ病菌が同一種であることが明らかになった。既往の研究から、パラゴムノキ、マンゴー、カンキツ、カシューナッツ、アカシア、ベニノキにも同種菌が寄生し、また台湾で2種の植物に同種菌が寄生することが報告されている。この結果、広範囲の植物科にまたがる11種の熱帯果樹、樹木類に同種うどんこ病菌が寄生し、この菌は温帯でコナラ属植物に寄生する *Erysiphe quercicola* であることがわかった。うどんこ病菌は植物の絶対寄生菌であるため宿主範囲は狭く、宿主範囲は近縁な植物に限定されると考えられてきた。今回の結果は熱帯地域ではこのような常識を再考する必要性があることを示唆している。また、インドネシアおよび日本において未記載種を発見し、*Phyllactinia poinsettiae*, *E. baliensis*, *E. sidae*, *E. viburni-plicati*, *E. kissiana* および *Podosphaera photiniae* の6種を新種として記載、発表した。

運動性乳酸菌の選択分離法の  
開発とその応用：  
運動性乳酸菌の多様性の解析

乙 黒 美 彩

山梨大学大学院総合研究部  
motoguro@yamanashi.ac.jp

目的：乳酸菌は運動性を持たないと言われているが、近年、運動性乳酸菌の分離例が増加している。しかし運動性を持つ既知種が少ないため運動性と系統の相関は不明である。本研究では運動性乳酸菌を効率的に分離できる分離法を構築し、ワイン醸造過程や自然界から分離することを目的とした。

方法：対照株として運動性が報告されている *Lactobacillus* 属7種 (*L. agilis* JCM 1187, *L. ghanensis* JCM 15611, *L. mali* NBRC 102159, *L. nagelli* JCM 12492, *L. sat-*

*sumensis* JCM 12392, *L. vini* JCM 14280, *L. curvatus* NBRC 15884) の運動性を soft agar 法により判定した。次に0.1Mリン酸緩衝液に乳酸菌を懸濁し、経時的に顕鏡し運動性の発現にかかる時間を調査した。また、*L. ghanensis*, *L. nagelli*, 非運動性の *L. plantarum* NRIC 1067を用い運動性と非運動性細胞の差別化のために遠心条件を検討した。これらの結果をもとに分離法を設定し、ワイン醸造過程中的のもろみより運動性乳酸菌の分離を試みた。

結果・考察：*L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelli*, *L. satsumensis* の4種は soft agar 法で運動性を確認することができた。*L. vini* は soft agar 法では運動性を確認できなかったが、顕鏡下では運動性を確認でき、*L. vini* の運動性は他の菌種と比較して非常に弱いと考えられた。一方、*L. curvatus*, *L. agilis* はいずれの方法でも運動性は確認できなかった。

リン酸緩衝液に菌体を懸濁し15分後には全ての株で運動性が認められ、90分後にも持続していた。*L. ghanensis* および *L. nageli* と非運動性の *L. plantarum* を用い遠心分離条件を検討した。700×g・10分間の遠心処理後の細胞の回収率は運動性乳酸菌で約54~57%、*L. plantarum* で50%以下となり遠心分離により非運動性と運動性細胞の差別化は低効率だが可能であると考えた。

以上より分離源をリン酸緩衝液に懸濁後30℃で1時間保温し、溶液の一部を700×g・10分間遠心分離して上清を分離培地に塗布する分離法を設定した。本法をブドウもろみに適用し運動性乳酸菌の分離を試みたが、得られた分離株はワイン中の主要な乳酸菌である *L. brevis* が大半を占めた。

本研究では遠心分離が運動性乳酸菌の分離に利用できる可能性を示したが、ブドウもろみからは分離できなかった。今後は遠心分離技術と集積培養を組み合わせるなど分離頻度を向上させるための検討を進めていく。

## 高濃度塩泉水・鹿塩温泉における 好塩微生物相の解析

峯 岸 宏 明

海洋研究開発機構 深海・地殻内生物圏研究分野  
minegishih@jamstec.go.jp

目的：長野県下伊那郡大鹿村にある鹿塩温泉は、無機塩類の違いはあるが、その塩分濃度は海水とほぼ同等から2倍程度の塩泉である。その由来はスラブ起源の熱水ではないかと推定されている。しかしながら、その起源は未だ謎に包まれており、また微生物叢解析の報告も皆無である。そこで本研究では、鹿塩温泉における微生物多様性を理解するために網羅的なアプローチを行った。

方法：本研究では鹿塩温泉湯元・山塩館の協力の下、山塩館側の手押しポンプ(Well)と風呂場吐水口(Bath)、塩川対岸からの自動ポンプ(Pump)による3カ所から採水した。採取したサンプルに関して温泉成分のガス・化学組成解析、水素酸素同位体比解析を行った。また微生物叢の確認は、各種培地による直接分離、クローン解析(PCR増幅したDNA断片を挿入したプラスミドを大腸菌に形質転換し、得られたプラスミドDNA中の16SrRNA遺伝子配列を解析：約1500bp)および次世代シーケンサーによるメタ16S rRNA遺伝子解析(試料から抽出した微生物DNAにプローブを付加し塩基配列を解読：約350bp)を行った。

結果・考察：サンプル時における温度は各サンプルとも12℃付近であり、pHは7.5付近であった。特筆すべきはリチウムイオン濃度が高いことであり、これは鹿塩温泉の起源が熱水であった可能性を示している。さらに水素・酸素同位体比を測定した結果、鹿塩温泉の由来は化石海水およびマグマ水ではないことが示唆された。また、各サイトの比率は天水線から離れていたため、天水の混入は少なく純粋な温泉水であることが示唆された。温泉ガス分析の結果、鹿塩温泉は各採水サイトいずれもメタンが非常に多いことが分かった。次世代シーケンサーによる16S rRNA遺伝子アンプ

リコン細菌叢解析の結果、どのサンプルにおいても *Proteobacteria* 門が優占していた。古細菌叢は、Wellでは *Thaumarchaeota* 門の Marine Group I が最も多く、Pumpでは *Methanomicrobia* 綱、Bathではそのほとんどが *Woesearchaeota* 門であった。これらの結果より Well, Pump では中央構造線で発生した断層水素と温泉中の炭酸カルシウムが固体として沈殿するとき生ずる二酸化炭素からメタン菌がメタン生成を行い、さらに生成されたメタンを資化する細菌が優占したという図式が考えられた。クローン解析においてもほぼ同様の結果が得られた。マリンプロス2216培地による分離では、塩濃度15%で増殖できる中度好塩菌の分離に成功した。これら分離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した結果、海洋性細菌が多く分離できていることが分かった。海洋から遠く離れた南アルプスに囲まれた場所から海洋性細菌が分離できたことは非常に興味深い。現代の海水がこのような場所に染みこんでくることがないと考えられるので、このような海洋性細菌は太古の昔に断層の隙間に綴じ込まれたものが、現代の環境に適応して生き残ったとも考えられる。また、分離株の中には既知種との相同性が低く、非常に新規性が高い株も存在し、これらは鹿塩温泉に特有なものと考えられた。

## 温泉に生育する真菌の分離培養方法の確立と 系統分類および二次代謝産物生産能の解析

内 田 龍 児

北里大学薬学部  
uchidar@pharm.kitasato-u.sc.jp

目的：真菌は有用な微生物資源の一つであり、医薬品をはじめとする様々な生物活性物質の探索源として利用されている。地球上に生息する真菌は150万種と推定されているが、実際の発見数はその約5%と僅かで未開拓な真菌が殆どである。そこで本研究では、真菌の新たな分離源を開拓し、新規生物活性物質の発見に繋げることを目的とし、これまでに分離報告例が少なく

日本に数多く分布する温泉（硫黄泉）に着目して真菌の分離およびその二次代謝産物の解析を試みた。

方法：まず、硫黄泉を模倣するために湯の花を用いた分離方法を検討した。箱根大湧谷、霧島硫黄谷および登別地獄谷の源泉の高温噴出口から採取した土壌の懸濁液を、酸性度（pH3 および 6）および湯の花の添加量（終濃度 0.2 および 2.0 mg/mL）の異なる 4 種類の分離培地に塗布した。これを 27°C および 40°C で 2 週間培養し、生育した真菌を釣菌した。また、分離株について、D1/D2 26S rDNA 領域の塩基配列に基づく遺伝子の相同性検索により属種の推定を行った。次に分離株の二次代謝産物の生産性を調べるために、湯の花添加および無添加の培地を用いた生産培養を行い、その EtOH 抽出液を HPLC（ODS カラム）で分析した。また、抽出液の生物活性（抗菌活性および細胞毒性）についても測定した。さらに所属研究室で試験できる 10 項目の生物活性のスクリーニング系にも供した。

結果・考察：分離方法の検討においては、湯の花：2.0 mg/mL（終濃度）、酸性度：pH 3、培養温度：27°C で良好にコロニーが生育し、これを硫黄泉からの分離方法として確立した。この方法を用い、3 箇所の硫黄泉土壌から 66 株（12 属）の真菌を取得し、その内訳は *Acidomyces* 属が全体の 38% を占め、次いで *Penicillium* 属（24%）、*Aspergillus* 属および *Ochroconis* 属（共に 4.5%）の順で得られた。この内訳は日本本土の一般土壌（*Penicillium* 属：24%、*Trichoderma* 属：8.1%、*Fusarium* 属：5.2%、*Aspergillus* 属：2.9% の順）とは異なり、中でも *Acidomyces* 属、*Ochroconis* 属および *Acrodontium* 属（1.5%）などは一般土壌では分離されていない真菌だった。次に、二次代謝産物の生産性およびその生物活性を解析した結果、湯の花を添加した生産培地で、*Penicillium* 属（4 株）、*Acidomyces* 属（2 株）、*Lecytophora* 属（1 株）および未同定株（1 株）の計 8 株（12%）で、二次代謝産物の生産性に於いて顕著な変化を示した。また生物活性については 66 株中 26 株（39%：8 株が未同定真菌）の培養液が生物活性を示し、その中で湯の花を添加した培地でのみ生物活性を示し

たものは 6 株（9%）と少なかった。このことは真菌の分離時と異なり、二次代謝産物の生産には湯の花が必要成分でない可能性を示唆している。さらに *Penicillium adametzii* BF-0003 株が生産する新規抗酸化剤 pyranonigrin L および *Aspergillus nidulans* BF-0142 株が生産する新規物質 helvafuranone の発見に繋げることに成功し（論文投稿中）、現在、*Acidomyces* 属、*Ochroconis* 属および *Acrodontium* 属等の温泉特有真菌の二次代謝産物の解析を継続している。以上の結果より、温泉は未利用な真菌を取得できる有効な分離源として十分期待され、硫黄泉以外の源泉に生育する真菌にも興味もたれる。

### ダイズ根粒菌の生態学的特性と 環境因子による群集構造の構築および 亜酸化窒素発生抑制に関する研究

佐 伯 雄 一

宮崎大学農学部  
yt-saeki@cc.miyazaki-u.ac.jp

目的：ダイズ根粒菌は、ゲノム多型からいくつかのタイプに分類され、その地理的分布において緯度に沿ったニッチを示す。さらに、水田転換畑において特定のゲノムタイプの根粒菌の優占性が観察される。この根粒菌は *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 クラスタに属する菌株群で、窒素固定能が高く有用根粒菌として農業利用が期待されている。さらに、USDA110 クラスタ株の多くは、完全脱窒能を有し、亜酸化窒素（ $N_2O$ ）を放出せずに窒素まで還元する能力を有する。近年、不完全脱窒能を示す根粒菌の共生に伴うダイズ根圏からの  $N_2O$  放出が問題視されており、有用根粒菌の根粒占有率を高めることの重要性が認識されている。本研究では、転換畑土壌に完全脱窒能を示す根粒菌が優占していることに着目し、環境因子として温度と湛水状態および *nosZ* 遺伝子の有無が、根粒菌群集構造に及ぼす影響を解析し、根粒菌の生態的特性と機能を利用した根粒菌群集の人為的コントロールの可能

性を検討した。

方法：滅菌土壌（黒ボク土・灰色低地土）に、*B. japonicum* USDA110 野生 (wt) 株と、完全脱窒能に必要な  $N_2O$  還元酵素遺伝子である *nosZ* 遺伝子を破壊した *B. japonicum* USDA110 $\Delta$ *nosZ* 株、および土着根粒菌の代表株として *B. japonicum* USDA6 株 ( $N_2O$  発生型)、*B. japonicum* USDA123 株（非脱窒型）、*B. elkanii* USDA76 株 ( $NO_2^-$  生成型) を混和してマイクロゾム土壌を調製した。土壌水分を好気的条件と湛水条件に調整したマイクロゾムを、三段階の培養温度 (20, 25, 30°C) で 30–60 日間共存培養した。土壌から環境 DNA を抽出し、根粒菌の 16S-23S rRNA 遺伝子 ITS 領域の多型を利用した変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法によって各菌株の優占度を評価し、完全脱窒能の有無と土壌の温度・酸化還元状態が根粒菌群集構造に及ぼす影響を解析した。また、リアルタイム PCR によって根粒形成遺伝子発現の温度依存性を解析した。

結果・考察：*B. japonicum* USDA110wt 株は土壌の種類にかかわらず湛水条件下において優占化したが、好気的条件下における優占化は認められず、USDA6 株や USDA76 株が優占化した。また、USDA123 株は好気的かつ低温環境下で優占化する傾向が認められた。USDA110 $\Delta$ *nosZ* 株は何れの条件でも優占化は認められなかった。リアルタイム PCR による根粒形成遺伝子発現の温度依存性解析の結果、*B. elkanii* は高温で強く発現し、*B. japonicum* は中温において強い発現が認められた。しかしながら、北日本で優占する USDA123 株は低温において強い発現を示した。これらの根粒菌群集構造の環境因子依存的遷移は土着根粒菌の地理的分布と一致していた。主成分分析の結果、根粒菌群集構造に影響を及ぼす環境因子は、まず湛水条件、次いで温度が挙げられた。以上の結果より、*nosZ* 遺伝子を有する有用根粒菌の土着化に関して、土壌の湛水処理による完全脱窒能の発現によって高窒素固定能を有し亜酸化窒素を放出しない有用根粒菌を人為的に優占化させ得る土壌管理技術開発の可能性が示唆された。

## 嫌氣的湖沼環境に潜む菌類様初期真核微生物群の多様性解明と培養への挑戦

長濱 統彦

ノートルダム清心女子大学人間生活学部  
mail:nghm@post.ndsu.ac.jp

目的：深海、湖底堆積物などの嫌氣的環境においては、クリプト菌門 (Cryptomycota, Rozellomycota) やそれらを含む Aphelids-Rozella-Microsporidia (ARM) クレードなど、難培養性の原始的系統群が優占菌類として現れることがある。これらの国内湖沼堆積物における遺伝的多様性と地理学的分布の解明を通じて、分離培養に向けての知見の蓄積を試みた。

方法：西日本の10湖沼 [赤湖 (兵庫県), 岡山県総合グラウンド池 (岡山県), 藤波池 (岡山県), 大芦池 (岡山県), 東郷池 (鳥取県), 常盤池 (山口県), 豊田湖 (山口県), 小田の池 (大分県), 志高湖 (大分県), 御池 (宮崎県)] において、エクマン・バージ採泥器もしくは柱状採泥器を用いて、堆積物のサンプリングを実施した。一部のサンプルについては、培地、松花粉、バルサ材による集積培養を試みた。サンプルは直接観察すると同時に、速やかに凍結し、ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene) を用いて、核酸の抽出を行った。抽出した核酸を基に、菌類を特異的に増幅する PCR プライマー (nu-SSU-817, nu-SSU-1536) を用いて、小サブユニット rRNA (SSU rDNA) 遺伝子約 750 塩基を増幅した。加えて、大サブユニット rRNA (LSU rDNA) 遺伝子を増幅するプライマー (12組) の評価を行った。さらに、10湖沼において最も普遍的に出現した ARM 系統に特異的な PCR プライマーをデザインし、その有効性を評価した。増幅産物は、精製後 pTAKN-2 プラスミド (BioDynamics) に組み込み、形質転換後、各クローン配列をサンガーシーケンシングにより決定した。決定した DNA 配列は、代表的な菌類系統、および Blast による近縁配列と共に webPRANK を用いて整列され、gBLOCK により配列を抽出、TOPALi に含まれている PhyML および MrBayes を用いて、BIC 基準

による最適進化モデルに基づく最尤樹および各配列の系統分類学的位置が推定された。

**結果・考察：**サンプリングを行った堆積物の全てから菌類 SSU rDNA の特異的増幅が確認され、その全てから ARM クレードは検出された。一方、菌類外真核生物の混入は数%であった。環境サンプルを用いて既知の菌類共通 LSU rDNA プライマー (LR3, LR5, LR6, LR7, Vilgaly's lab. webpage より) による PCR クローンの菌類多様性を評価したところ、LR7 は ARM クレードを効率よく増幅するが、LR3, LR5, LR6 は、ほぼ増幅しないことが明らかになった。ARM クレードの割合は、全菌類中平均約 3 割であり、各湖沼の間で 3%~78% と大きく変動していた。うち 1 割ほどが複数の淡水湖沼に共通して表れていた。そのうち、最も普遍的な ARM 系統を検出する PCR プライマーを作成し、特異的検出を確認した。加えて、湖沼堆積物コアの鉛直分布を調べたところ、表層と 5 cm 以深の間で、ARM クレードの出現割合にはそれほど大きな変化は見られなかった。一方、ARM クレードの菌類多様性を見ると、表層とそれ以外の間で大きな質的変化が見られ、5 cm 以深に特異的に現れる新規 ARM 系統群も確認された。また、東郷池サンプルを用いて、培地や木材を用いた集積培養を行ったところ、木材中にも ARM クレードは増殖していることが確認された。ARM クレードの一部は、プランクトン寄生性のみならず、陸上植物などの難分解物質の分解にも関与している可能性を見出した。

メタゲノム解析及び生元素の安定同位体  
解析を用いた温泉バイオマットにおける  
微生物群集構造と代謝の化学的特徴付け

中川 麻悠子

東京工業大学環境エネルギー協創教育院,  
現 東京工業大学地球生命研究所  
nakagawa.m.ae@m.titech.ac.jp

**目的：**長野県中房温泉から流れた湯川では、水温、光環境、溶存酸素濃度に変化し、異なる色のバイオマッ

トが形成されている。バイオマットを構成する微生物種は進化系統樹の始原生物に系統的に近いことが報告されており、初期生態系のモダンアナログといえる。バイオマット生態系が安定に形成される過程において、どのような環境変動が、どのような微生物種の繁栄を促し、どのような物質代謝を獲得することで、安定化するのかは明らかになっていない。そこで本研究では、バイオマット中微生物群集がバイオマスの形成にどのように寄与しているのか、メタゲノム解析及び脂質脂肪酸の炭素、水素同位体比解析 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ ・ $\delta^2\text{H}_{\text{FA}}$ ) による定量を試みた。

**方法：**水温の影響をみるため、中房温泉湯川の異なる水温域 (63–77°C) で形成される特徴的なバイオマットを分析した。次に、層状バイオマット形成過程を追うため、55°C における層状バイオマットを引き剥がし、1, 9, 13, 35 日後に形成されたバイオマットを 1 mm 層毎に分析を行った。メタゲノム解析では微生物相と炭素固定回路毎 (カルビン、還元的 TCA, 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3-HP), 還元的アセチル CoA) の鍵酵素について解析した。 $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ ・ $\delta^2\text{H}_{\text{FA}}$  解析に関して、主な構成微生物が生成する脂肪酸種及び代謝毎の同位体比分布を先行研究からまとめ、バイオマスへの各微生物・各代謝の寄与率を計算した。

**結果・考察：**異なる水温域におけるバイオマットの何れかで 0.1% 以上占める細菌は好熱性細菌を中心に 8 門 16 属であった。炭素固定回路の鍵酵素について、カルビン回路は *Cyanobacteria*, 還元的 TCA 回路は *Aquificae*, 3-HP 回路は *Chloroflexi*, 還元的アセチル CoA 経路は *Thermodesulfobacteria* から検出された。各微生物で特徴的に多く生成する脂肪酸種と  $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ ・ $\delta^2\text{H}_{\text{FA}}$  値分布から 75°C 以上では化学合成独立栄養がバイオマス有機物生成に関して優占しており、水温が 75°C から 63°C へ下がるとともに光合成独立栄養による寄与が大きくなった。また、55°C における層構造バイオマットに関してはまず *Chloroflexi* が優占した緑色の光合成マットが生成し、9 日後、その下に *Firmicutes* などの従属栄養細菌マットが形成された。1 ヶ月後、表層の緑

色マットは脂肪酸種と  $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$  値が増加したことから従属栄養細菌が加わり多様性が増したことが示唆された。更に *Deinococcus/Thermus* などの従属栄養細菌を中心とした従属栄養的な中層マットが形成された。本研究では複雑な微生物生態系に対しゲノム解析と同位体比解析を併用することで、独立的にも従属的にも生息可能な微生物がどちらの栄養段階で寄与しているかを示すことができた。

### 海洋性菌類の生態に関する研究

澤山茂樹

京都大学大学院農学研究科  
sawayama@kais.kyoto-u.ac.jp

目的：菌類は、エタノール発酵やセルラーゼ等の酵素生産微生物として、広く産業利用されている。通常菌類の分離源としては、土壌等の陸上域が多く、水圏特に海洋域での分離・研究例は比較的少ない。海洋では、塩分濃度が高いことと比較的嫌気性になりやすいことが、分離例が少ない原因と考えられる。そこで本研究では、海洋環境から広義の海洋性菌類を分離し、その性状・特性等を解析することにより、単離した海洋性菌類についてその生態や産業利用の可能性に関する知見を得ることを目的とした。

方法：舞鶴湾（京都府）の海底堆積物表層サンプル、竹原市海岸の潮間帯木片等、ナンキョクオキアミ排泄物を採取し、PD 寒天プレートを用いて菌類様コロニーを単離した。単離したコロニーから DNA を精製し、PCR 法・Dye Terminator 法を用いて、18S rRNA 遺伝子、23S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域、ITS 領域の塩基配列を解析した。メロン香の分析は、バイアルで培養した気層について、ガスクロマトグラフィーを用いて標準物質と比較することで行った。

結果・考察：舞鶴サンプルから16株、竹原サンプルから3株、ナンキョクオキアミサンプルから16株の菌類様コロニーを単離した。舞鶴サンプルから単離した株

の内、MS1 株と MS2 株の PD 寒天プレートからメロン様香が認められた。MS1 株と MS2 株の培養液気相部をガスクロマトグラフィーによって分析した結果、メロン香の4つの主成分である3,6-ノナジエン-1-オール等を産生していることが推定された。更に26S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域及び ITS 領域の塩基配列を解析して分子系統樹を作成した結果、MS1 株と MS2 株は *Geotrichum candidum* に近縁であった。両株は特に、*G. candidum* のチーズ製造スターター酵母株と ITS 領域塩基配列の相同性が高いことが分かった。

MS1 株と MS2 株が、メロン様香を発するのは何らかの誘引物質である可能性が考えられる。MS1 株と MS2 株は、特に運動性は認められないことから、メロン様香が有性生殖に関連しているとは考えにくく、生理・生態学的な働きについては今後の研究の進展が期待される。芳香産生を生かした何らかの形での産業利用が想定できることから、理化学研究所バイオリソースセンターに MS1 株 (JCM 31318) の寄託を行った。また、ナンキョクオキアミ排泄物からは、*Trichosporon* 属酵母株が比較的多く単離された。

### 上部消化管内優勢乳酸桿菌種のペプチド要求性に関する研究

荒川健佑

岡山大学大学院環境生命科学研究科  
karakawa@okayama-u.ac.jp

目的：ヒト小腸内優勢の乳酸桿菌 *Lactobacillus gasseri* (以下 *L. gasseri* とする) は、様々な保健機能が知られる有用なプロバイオティクスであるが、乳などの食品素材中で良好に生育しないことから、その利用性は制限されている。本研究では、*L. gasseri* のペプチド要求性を明らかにし、乳中で生育可能な培養法（発酵乳製造法）の確立を試みた。

方法：窒素源を除いた MRS 培地成分にカゼイン（乳タンパク質）、トリプトン（酵素分解カゼイン；ペプチド混合物）およびカザミノ酸（酸分解物カゼイン；

遊離アミノ酸混合物)をそれぞれ添加し、各培地中の *L. gasseri* 3 菌株の生育度を測定した。また、還元脱脂乳をベースとした同様の試験を行い、同菌種のペプチド要求性を評価した。

次いで、*L. gasseri* を用いた発酵乳製造に向けて、発酵基材のプロテアーゼ処理の有効性を以下のようにして評価した。還元脱脂乳を食品利用可能な 7 種のプロテアーゼ (ペプシン, トリプシン,  $\alpha$ -キモトリプシン, レンネット, フィシン, プロメライン, パパイン) で処理し、各プロテアーゼ処理乳中での *L. gasseri* 基準株の生育度を測定した。ペプシンによる処理は他の乳素材 (全乳, ヒト母乳, 還元チーズホエー, 酸ホエー培地, カゼイン培地) についても行い、同様に基準株の生育度測定を行った。また、ペプシン処理全乳における生育度試験は、他の *L. gasseri* 4 菌株に対しても実施した。

乳素材のプロテアーゼ処理とは異なる *L. gasseri* 発酵乳製造法として、乳酸球菌との乳中共培養を試みた。まず、当研究室保有の乳酸球菌 59 菌株から、37°C 共培養下で *L. gasseri* 基準株の乳中生育を促進する菌株を選抜・同定した。次に、選抜菌株を他の *L. gasseri* 4 菌株との乳中共培養試験に供し、*L. gasseri* 発酵乳製造に向けた選抜菌株との共培養法の有用性を評価した。

結果：供試 *L. gasseri* 3 菌株はいずれも、トリプトンを添加することにより、窒素源を除いた MRS 培地および還元脱脂乳で良好に生育したが、カゼインもしくはカザミノ酸の添加ではほとんど生育しなかった。本結果により、*L. gasseri* は窒素源としてタンパク質や遊離アミノ酸ではなく、ペプチドを要求することが明らかとなった。

*L. gasseri* のペプチド要求性が示されたことから、その生育度に与える乳素材のプロテアーゼ処理の影響を試験したところ、レンネットを除く 6 種のプロテアーゼ処理によって基準株の乳中生育度は向上した。特に、ペプシン処理の影響は顕著で、還元脱脂乳だけでなく、他の乳素材においても同様に高い生育促進効果が見られた。また、ペプシン処理の効果は、基準株だけでな

く、他の *L. gasseri* 4 菌株に対しても認められた。

*L. gasseri* 基準株の乳中生育性を向上させる共培養乳酸球菌として、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 4B254 および *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* OR-1 を選抜した。両共培養菌株は、基準株だけでなく、他の *L. gasseri* 菌株の乳中生育も促進した。

以上、本研究では、*L. gasseri* のペプチド要求性を明らかにし、ペプチド添加に頼らない *L. gasseri* 発酵乳製造法として、発酵基材のプロテアーゼ処理法および乳酸球菌との共培養法を確立した。

中枢代謝, ATP 生産能, 蛋白質発現量を  
強化した微生物宿主による  
有用ポリケタイドの発酵生産

鮎 信 学

静岡県立大学食品栄養科学部  
funa@u-shizuoka-ken.ac.jp

目的：本研究では、生命にとって必須である脂肪酸合成酵素 (FAS) を阻害することにより、マロニル-CoA の代謝プールを増強し、二次代謝産物の生産に適した *Escherichia coli* (大腸菌) の宿主を開発する。

方法：FAS の阻害は、FabB/F を阻害するセルレニンを用いた。また、 $\lambda$  Red recombinase および Cre/loxP を用い、大腸菌の FAS 遺伝子 *fabH*, *fabF*, *fabB* の in-frame mutant を作製した。また、*fabB/fabH*, *fabH/fabF* の二重破壊株も作製した。アセチル-CoA およびマロニル-CoA 量は LC-MS を用い定量した。また、マロニル-CoA 量は III 型 PKS・RppA およびモノオキシゲナーゼ MomA によりフラビオリンに変換し、定量した。遺伝子の転写量は RT-PCR により、解析した。

結果・考察：脂肪酸はマロニル-CoA を前駆体として脂肪酸合成酵素により合成される。大腸菌の脂肪酸合成経路において FabH, FabF, FabB はマロニル-CoA を消費する酵素である。6.3  $\mu\text{g/ml}$  のセルレニンの投与により、103  $\mu\text{g/ml}$  のフラビオリンが蓄積した。以上より、脂肪酸合成酵素を阻害すると、ポリケタイド

の生産量が増えることが明らかになった。

*fabB/fabH* 破壊株において 113  $\mu\text{g/ml}$  と親株と比較して37倍のフラビオリンを生産していることが判明した。細胞内アセチル-CoA およびマロニル-CoA を定量した結果、*fabH/fabF* 破壊株においてアセチル-CoA、マロニル-CoA の生体内量は親株と比較してそれぞれ6倍、45倍であった。

FadR は脂肪酸の生合成を正に制御する制御因子である。FAS 破壊株では親株と比較して FadR の転写量が顕著に増加していた。実際、FAS 破壊株では親株と比較して FAS 遺伝子の転写量が増加していた。FadR は、アセチル-CoA カルボキシラーゼ (AccABCD) とグリオキシル酸回路の負の転写因子 IclR の転写も活性化する。実際、FAS 破壊株では親株と比較して AccABCD、IclR の転写量が増加していた。IclR の転写量の増加に伴い、グリオキシル酸回路の AceA、AceB の転写量は減少していた。AceA、AceB はアセチル-CoA を消費する酵素であるため、これらの転写量が減じたことがアセチル-CoA 量が増えた理由であると考えられる。また、AccABCD はアセチル-CoA からマロニル-CoA の合成を触媒する酵素であるため、マロニル-CoA 量が増えたと考えられる。

単一バクテリア内 ATP の  
絶対濃度計測法による  
エネルギー代謝と増殖の解析

今村 博 臣

京都大学白眉センター、  
現 京都大学大学院生命科学研究所  
imamura@lif.kyoto-u.ac.jp

目的：近年の研究から、遺伝的に同一な細胞集団であっても個々の細胞内部の mRNA やタンパク質の数は驚くほど多様である事がわかって来た。このような確率的な振る舞いに基づいた多様性は、個々の細胞を異なる戦略に導き、集団としてのリスクを減らしていると考えられている。一方、細胞の代謝物については、その濃度が細胞の振る舞いを大きく左右すると想定され

るものの、その多様性については検討されていなかった。特に ATP 濃度は細胞のエネルギー状態を規定し、様々な代謝経路に作用して、その流量を制御しているため、非常に重要なパラメータであると考えられる。本研究では、バクテリア内 ATP 濃度を個々の細胞ごとに決定する技術を確認し、その技術を用いて ATP 濃度と増殖の関係を明らかにすることを目指した。

方法：ATP 結合タンパク質である枯草菌 ATP 合成酵素  $\epsilon$  サブユニットの N 末端側 107 アミノ酸残基と C 末端側 24 アミノ酸残基の間に、円順列変異 GFP を融合させた人工タンパク質を作成した。 $\epsilon$  サブユニットと円順列変異 GFP を繋ぐリンカーを検討し、ATP 結合により蛍光励起スペクトルが大きく変化するクローンを選抜し「QUEEN」と名付けた。QUEEN は 405 nm と 490 nm に 2 つの励起ピーク、510 nm に蛍光ピークを有しており、ATP 濃度が上昇するに従って 490 nm の励起ピークが低下し、逆に 405 nm の励起ピークが上昇した。すなわち、490 nm で励起した場合と、405 nm で励起した場合の 510 nm における蛍光強度の比を求めることで ATP 濃度を見積もることが可能であることが示された。QUEEN を発現する大腸菌の解析から、QUEEN の蛍光シグナルは増殖速度に非依存的であること、そして QUEEN の蛍光シグナルから高い定量性で細胞内 ATP 濃度を算出できることが示された。次に、QUEEN を発現する大腸菌をイメージングすることによって大腸菌内 ATP の絶対濃度を個々の細胞ごとに決定することに成功した。その結果、全く同一のゲノムを持つ大腸菌を同一環境で培養した場合であっても、細胞集団における実際の ATP 濃度の分布は大きな広がりを持ち、かつ正規分布をとらないことが明らかとなった。ATP 濃度と細胞増殖の関係を調べたところ、興味深いことに、ATP 濃度が高い細胞より、平均に近い ATP 濃度を持つ細胞が最も増殖が速いという現象が観察された。

考察：QUEEN を用いた ATP イメージング技術によって、単一細胞レベルでエネルギー代謝を議論する道が開けた。集団の平均を解析する従来法では調べるこ

が困難な、休眠細胞などのエネルギー代謝を解析する手法として非常に有効であると考えられる。

### 大腸菌におけるメタボリックスイッチ 制御機構の解明

島田 友裕

東京工業大学資源化学研究所  
tshimada@res.titech.ac.jp

目的：代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。そこで、研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を行った。

方法：グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用いて、炭素源代謝ステートがグルコース酸化により解糖系を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート（Glycolysis Phase）から、酢酸やアミノ酸を利用して TCA cycle 中心にエネルギーを獲得し、糖新生を行う代謝ステート（TCA cycle/Gluconeogenesis Phase）へと順次遷移していく実験系を確立した。その際の中間代謝産物の細胞内濃度を測定した。さらに、代謝経路の活性の遷移に関与する遺伝子の同定を試みた。

結果・考察：Acetyl-CoA を酢酸へ変換する Acetate excretion pathway を構成する Phosphate acetyltransferase (*pta*) または Acetate kinase (*ackA*) を欠損させると、Glycolysis Phase から TCA cycle/Gluconeogenesis Phase への切り替える際に、細胞増殖が著しく停滞することが観察された。このことから、Acetate excretion pathway を利用した代謝を切り替えるための遷移期（Metabolic Transition Phase）が存在する事が示唆された。また、その際の野生株における細胞内中間代謝産物の濃度変

化を測定したところ、フリーの CoA の濃度が一過的に上昇していることが観察された。その一方で *pta* 欠損株においては CoA 類の総量は野生株と同等であるものの、フリーの CoA の濃度の上昇は観察されなかった。そこで、*pta* 欠損株において CoA の前駆体であるパントテン酸を添加したところ、増殖の停滞が部分的に回復した。さらに、解糖系および TCA cycle 上の各酵素の遺伝子発現を誘導した影響を観察したところ、Pyruvate dehydrogenase (PDH) または 2-Oxoglutarate Dehydrogenase (OGDH) の特定のサブユニットを過剰発現させることで *pta* 欠損株における増殖の停滞が部分的に回復した。そこで、これら二つの酵素の活性を経時的に測定したところ、野生株では Metabolic Transition Phase を境に PDH 活性が低下し、OGDH 活性が上昇していたが、*pta* 欠損株においては PDH 活性が低下しない一方で、OGDH 活性が増殖停滞の間に著しく上昇していた。これらの事から PDH に対する OGDH の活性比が一定以上になることが Glycolysis Phase から TCA cycle/Gluconeogenesis Phase への遷移を規定している事が示唆された。

本研究から、Glycolysis phase から TCA cycle/Gluconeogenesis Phase への遷移にはフリーの CoA の生産、および、PDH/OGDH 活性比を切り替えるための Metabolic Transition Phase が存在する事が示唆された。

### シロアリ消化管内共生バクテリアによる 木質分解機構

徳田 岳

琉球大学熱帯生物圏研究センター  
tokuda@comb.u-ryukyu.ac.jp

目的：系統的に下等なシロアリ類の消化管内では、共生原生物が木質分解に主要な働きを示すことが知られているが、高等シロアリでは腸内に分布する共生バクテリアが木質分解に関与することが示唆されている。しかし、木質分解に関わる酵素はメタゲノム解析によって断片的に明らかになっているだけで、高等シ

シロアリにおける木質分解のメカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究ではシロアリ腸内で木質分解に関わるバクテリア叢を単離し、その種類と遺伝子情報を網羅的に解析することによって、有用な微生物遺伝子資源を取得することを目的とした。

方法：本研究では西表島よりタカサゴシロアリ (*Nasutitermes takasagoensis*) を採集し、後腸膨大部より腸内容物を回収した。Percoll 密度勾配遠心によって木片付着バクテリア叢のみを精製し、抽出した DNA を用いて HiSeq2000 による 16S rDNA およびメタゲノム解析を実施した。さらに同様の方法で調製したバクテリアより抽出した RNA を用い、3つの独立したサンプルについてメタトランスクリプトーム解析を併せて実施した。

結果・考察：16S rDNA によるバクテリア叢の解析を行った結果、*Fibrobacteres* (全体の約 40%) および *Spirochaetes* (全体の約 44%) が主に認められた。それらに次いで、TG3 門に属するバクテリアも比較的多く (約 7%) 認められた。メタゲノム解析の結果、約 2100 万のペアドエンドリードから、12万7千個のコンティグを得た。得られた遺伝子配列のうち、全体の 2.3% が糖代謝関連酵素遺伝子であった。BLAST サーチにより 1552個の糖質加水分解酵素遺伝子が見つかり、これらのうち 1/3 がセルロース分解に寄与する遺伝子であると推定され、1/3 がヘミセルロース分解に関与すると想定された。さらにメタトランスクリプトーム解析の結果、各サンプルあたり約 13万個の転写物が得られた。このうち明らかにタンパク質をコードしている 12万個について dbCAN による糖代謝関連酵素遺伝子の同定を試みた結果、2661個 (全体の 2.2%) が糖代謝関連酵素遺伝子の転写物であると推定された。これら転写物の発現レベル (FPKM) について検討したところ、興味深いことに GH11 に属する遺伝子群の転写レベルが全体の約 40% を占めていた。GH11 はヘミセルロースの主要成分であるキシランを分解する酵素 (キシラナーゼ: EC 3.2.1.8) を含むファミリーとして知られている。さらに興味深いことに、GH11 のキシラナーゼ

を構成する発現遺伝子群のうち 3つの遺伝子のみで総発現量の 60% を占めており、CBM (Carbohydrate-binding Module) 36に属するキシラン結合ドメインを有していた。今後、これらのヘミセルロース分解酵素の機能解析を実施していくことで、効率的なヘミセルロース分解系の構築の足がかりとなることが期待される。

### 微生物による有機物の化学エネルギーから電気エネルギーへの変換能力解明に向けた基礎的研究

井上 謙 吾

宮崎大学農学部  
kinoue@cc.miyazaki-u.ac.jp

目的：鉄還元菌による高効率な細胞外電子伝達に必須な最小単位の遺伝子セットを解明する。

方法：鉄還元菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA 株は有機物分解によって細胞内に生じた電子を細胞外に存在する酸化鉄や電極などの電子受容体へ伝達する能力を持つ。本株は発電時に *c* 型シトクロム (OmcZ など) を細胞外へ分泌する。

PCA 株ゲノム内には 2つの II 型分泌系遺伝子群が存在する。それぞれの II 型分泌系遺伝子における機能に必須な遺伝子を破壊した株、*gspCDEF* 遺伝子破壊株、*oxpG* 破壊株について、その全生産タンパク質と分泌タンパク質のプロファイルを SDS-PAGE に続くヘム染色、抗 OmcZ 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。また、それぞれの破壊株について微生物燃料電池での発電能力について調べた。

OmcZ は微生物燃料電池での発電に必須な *c* 型シトクロムである。OmcZ は 50 kDa と 30 kDa の大小二つのサイズで存在する (それぞれ OmcZ<sub>L</sub>, OmcZ<sub>S</sub>)。OmcZ 遺伝子の下流にあるズブチリシン様プロテアーゼ (Ozp) の遺伝子破壊株を作製し、生産されるタンパク質を解析し、微生物燃料電池での発電能力を調べた。また、Ozp を過剰発現する大腸菌を作製し、再構成系での OmcZ<sub>L</sub> に対する切断活性を調べた。

著者らが分離した新規分離発電株 YM18 株について、全ゲノムを決定し、既報の発電株 *G. sulfurreducens* PCA 株、KN400 株との比較ゲノム解析を行った。

結果・考察：*gspCDEF* 破壊株は生産タンパク質については、野生株と変化は見られなかったが、発電能力は失われていた。一方、*oxpG* 遺伝子破壊株については、OmcZ<sub>S</sub>の生産量が著しく低下し、発電能力も失われていた。これらのことから、*gsp* 遺伝子は *c* 型シトクロム以外の発電に関わる何らかのタンパク質の分泌に関わることで、*oxpG* は OmcZ の細胞外分泌に関わる遺伝子であることが示唆された。

*ozp* 遺伝子破壊株は、OmcZ<sub>S</sub>を全く生産せず、発電能力を失っていた。また、Ozp を過剰発現する大腸菌の粗酵素抽出液は OmcZ<sub>L</sub>を切断する活性を持っていた。このことから、Ozp は OmcZ<sub>L</sub>を切断し、OmcZ<sub>S</sub>を生産する役割を担っていることが示された。

YM18 株の全ゲノム配列を決定したところ、約 3.7 Mbp で、3,354 の ORF を持っており、PCA 株に対して、122,022 個の SNPs を有していた。発電能力が PCA 株よりも高い YM18 株と KN400 株のみに共通する遺伝子が 35 個見いだされ、これらの遺伝子が高い発電能力に何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

カビの細胞内レドックス変化にตอบสนองした  
エピジェネティック制御による  
遺伝子発現調節機構の解明

志水元亨

名城大学農学部  
moshimi@meijo-u.ac.jp

目的：ポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は真核生物に特異的なタンパク質の可逆的翻訳後修飾である。この反応には、NAD<sup>+</sup>を基質として PAR を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) が関与する。高等真核生物において、*parg* をノックダウンさせると過

剰な PAR 化が引き起こされ細胞死が誘導される。これは、過剰な PAR の合成に大量の NAD<sup>+</sup>を使用することで NAD<sup>+</sup>が枯渇するため、ATP の生成が抑制され細胞死を引き起こすと考えられている。また、NAD<sup>+</sup>を基質にすることから、PAR の合成および分解は、細胞内のレドックスと密接に関係していることが考えられた。さらに、PARP による PAR 化のターゲットタンパク質は主に核内に存在しており、ヒストンもターゲットであることから、PAR 化によるエピジェネティックな遺伝子発現の制御が存在していることも考えられた。しかしながら、糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノム中には *parp* の ortholog が 1 つ存在するが、酵母および *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノムの中には、既知の *parg* の ortholog は見出されない。本研究では、糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し、その生理学的役割を明らかにすることを目的とした。

方法：*A. nidulans* のゲノム情報から *parg* 候補遺伝子を 7 種 (NdxA, B, C, D, NppA, B および HP) 選抜し、リコンビナントタンパク質を調製した。調製した 7 種のリコンビナントについて PARG 活性を測定した。PAR の分解産物は LC-MS/MS にて解析した。また、 $\Delta$ *fparg* 株を作製し、DNA 損傷剤に対する感受性を検討した。

結果・考察：7 種の *parg* 候補のリコンビナントタンパク質を調製し PARG 活性を測定したところ、ヒト PARG (hPARG) と同様に、HP のみ Mg<sup>2+</sup> 依存的に PAR を分解した。PAR の分解産物を LC-MS/MS にて解析したところ、ADP-リボースが検出されたことから、このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と命名した。

次に、 $\Delta$ *fparg* 株を作製し、3 種の DNA 損傷剤に対する影響を検討した。その結果、野生株に比べて、 $\Delta$ *fparg* 株は DNA 損傷剤に対して感受性を示した。また、fPARG の細胞内局在を解析したところ、主として核に局在していた。さらに、PAR の分解を経時的に追跡したところ、 $\Delta$ *fparg* 株では PAR の分解活性が顕著に低下していることが示された。現在、二次代謝物の生産に対する影響を検討している。

以上のことから、糸状菌では fPARG が PARG として機能しており、DNA 修復機構などに関与していることが明らかになった。

**過酷な生育環境から単離された  
微細藻類がもつ新奇な有用機能に関する研究**

川崎 信治

東京農工大学応用生物科学部  
kawashin@nodai.ac.jp

目的：植物は強光が付随する環境ストレス下では、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し枯死にいたる。筆者らは一般植物の生育が困難な過酷な生育環境から微細藻類の探索を行い、70株ほどの真核微細藻類を単離・保有している。これら極限藻類は淡水性でありながら強い耐塩性を示し、強光下の水分が0%の環境で数ヶ月間生存するなど優れた環境ストレス抵抗性を示すことから、一般植物には無い環境ストレス耐性機構の存在が示唆された。真夏のアスファルトから単離した微細藻類 Ki-4 株において、強光が付随する環境ストレス下でアスタキサンチンを結合する新奇な水溶性タンパク質 (AstaP) が大量に発現することが発見され、2013年に報告した。水溶性のカロテノイド結合タンパク質は真核の植物界には分布しないと考えられていたことから、極限藻類がもつ研究材料としての新奇性が示された。そこで本研究では、極限藻類がもつ優れた物質生産能力の調査とさらなる微細藻類の探索を目的とした。

方法：AstaPはカロテノイドを水溶化する能力があるタンパク質であるが、その生物分布は不明である。そこで研究室の単離株やモデル藻類を用いて AstaP の分布調査を行い、加えてストレス耐性能力の評価やプロテオーム解析、HPLCによる生体成分解析などを行った。また極限藻類からの新奇な能力の探索を目的として、自然界からサンプリングした試料を用いてスクリーニングを行い、微細藻類の単離と有用機能の発見を目指した。

結果・考察：クラミドモナスやクロレラなどのモデル真核藻類や Ki-4 株と近縁のセネデスムス属などの微細藻類を用いて水溶性カロテノイド結合タンパク質の生産能を調査した。その結果、近縁種でのみ AstaP 類似タンパク質の発現が検出されたが、その発現量は顕著に低かった。遺伝子を解析したところ AstaP と高い相同性を有するタンパク質であることが判明し、一次構造内のモチーフも類似していたことから進化の過程で近縁種に広く保存されたタンパク質であることが推定された。極限環境に生息する有用微細藻類のさらなる単離と解析を行った。助成期間中に複数回のスクリーニングを行い、約20株の微細藻類の単離に成功した。単離株のうち1株は Ki-4 株に匹敵する優れた AstaP 類似タンパク質の生産能を有していた。また特定のカロテノイドを大量に蓄積する微細藻類が単離されたため分子生物学的な解析を行っている。

**イノシトール遊離能をもつ  
細菌由来フィターゼ：  
*Klebsiella pneumoniae* 9-3B 株由来  
フィターゼの解析と新規フィターゼの開発**

曾根 輝雄

北海道大学大学院農学研究院  
sonet@chem.agr.hokudai.ac.jp

目的：フィチン酸 (イノシトール 6 リン酸) は植物のリンの主要貯蔵形態である。フィターゼはフィチン酸からリン酸基を遊離する酵素である。フィターゼは飼料添加物、あるいはフィチン酸からのイノシトールの生産に有用である。筆者らは細菌由来で初めてのイノシトール遊離能を持つ *Klebsiella pneumoniae* 9-3B 株由来フィターゼ (Phy9-3B) を発見した (Escobin-Mopera *et al.*, 2012)。一方、本酵素の応用に関しては、由来菌が BS レベル 2 であり、より安全性の高い菌種由来の同様の酵素の発見が求められている。本研究では、Phy9-3B のイノシトール遊離能に関する構造的特徴を明らかにすること、またそれにより安全性の高

い細菌由来のフィターゼを開発することを目的とした。方法：*K. pneumoniae* ゲノムから PCR で増幅を行い、大腸菌用発現ベクター pET28(b) にクローニングした。組換えフィターゼはアフィニティー、疎水性相互作用、サイズ排除の各クロマトグラフィーにより精製を行った。精製酵素を 0.2 M 酢酸カルシウム、20%(w/v) PEG 3350、懸滴法で17日間 20℃ インキュベートし、得られた結晶を用いて X 線解析を行った。

結果：*K. pneumoniae*9-3B ゲノムから 3-フィターゼと相同な遺伝子を増幅し、大腸菌にて発現を行い、同酵素から Phy9-3B と同様にイノシトール遊離活性を確認した。精製酵素は 498 U/mg と、大腸菌由来のフィターゼに相当する高い比活性を示した。また、Phy9-3B は 2 量体を形成していた。組換え Phy9-3B の結晶化に成功し、X 線構造解析により既知の *E. coli* 由来のフィターゼ AppA と類似した構造が明らかとなったが、活性中心においては Tyr238 残基が異なっており (AppA では Phe)、イノシトール遊離能との関連が期待された。

インドネシアの発酵食品テンペ、タペを用いてイノシトール遊離フィターゼのスクリーニングを行い 5 株のイノシトール遊離フィターゼを生産する細菌が得られたが、いずれも *K. pneumoniae* であった。

考察：*E. coli* AppA との活性部位の比較から、Tyr238 残基に Phy9-3B のイノシトール遊離能との関連が指摘された。これについては現在変異導入解析を行っている。また、新規フィターゼのスクリーニング系として、イノシトール資化能をもつ *B. subtilis* を宿主としてメタゲノム由来 DNA を導入し、フィチン酸を単一炭素源とする培地での生育を指標とする系を構築するため、ベクターの改良を行っている。

## CO<sub>2</sub>から石油を高生産する シアノバクテリア株コレクションの構築

寺本真紀

高知大学総合研究センター  
maki.teramoto@kochi-u.ac.jp

目的：本研究では、アルカン系炭化水素を細胞内で高蓄積生産できる *Proteobacteria* 門の新規細菌 A 株からこの炭化水素高生産遺伝子を単離し、炭化水素生産能に優れた高増殖性シアノバクテリアに導入することで、CO<sub>2</sub>から炭化水素を高生産できるシアノバクテリア株コレクションを構築することを目的とした。

方法：アルカン系炭化水素の構造は、反応試薬と標品を用い GC-MS 解析にて同定した。炭化水素高生産遺伝子は、A 株の全ゲノム解析をおこない、炭化水素の構造から合成に関わる遺伝子を推定し、大腸菌で発現させ、生産物を GC-MS 解析することで同定した。シアノバクテリア株の調査は、国立環境研究所のシアノバクテリア株のうち増殖性が比較的高い 60 株について、増殖した (培地あたりの) 湿重量を調べ、GC-MS 解析により炭化水素生産能を調べた。

結果・考察：本研究により、A 株の生産するアルカン系炭化水素の構造の同定に成功し、またこの高生産遺伝子の取得に成功した。この高生産には 2 つの遺伝子が必要で、これらは隣接していた。1 つの遺伝子 (*phsA*) は還元酵素遺伝子と相同性を示し、*phsA* の発現のみで炭化水素の生産が見られたが生産量は少なかった。もう 1 つの遺伝子 (*phsB*) を *phsA* と同時に発現させると、炭化水素の生産量が格段に増加した。これらのことなどから、PhsB は PhsA の基質を生産すると推定された。また *phsA* は、シアノバクテリア由来の炭化水素生産遺伝子である PCC7942\_orf1594 (還元酵素遺伝子) と PCC7942\_orf1593 (還元酵素遺伝子と相似性を示す脱カルボニル化酵素遺伝子) とアミノ酸レベルで比較して、16% 以下の相同性と 69% 以下の相似性を示すことから、新しいタイプの炭化水素生産遺伝子であることが分かった。また *phsAB* 遺伝子群のすぐ上流に

炭化水素生産を抑える DNA 領域があることも明らかにした。さらに *phsAB* 遺伝子群の下流には、細胞の増殖を遅くする DNA 領域があることが示唆された。

一方シアノバクテリア株については、測定した60株全てからアルカンが検出されたことから、シアノバクテリアは一般的にアルカン生産能をもつことが示唆された。最も増殖性が高かった株は *Spirulina* 属で、この株が生産した炭化水素はほぼヘプタデカンであった。しかしこの炭化水素生産量は、A株と乾重量あたりで比較して1/22になると推定された。2番目に増殖性が高かった株は *Calothrix* 属で、この株が生産した炭化水素はほぼペンタデカンであった。近い将来、これら株を含む“高増殖し炭化水素生産能に優れたシアノバクテリア株に、A株の *phsAB* を導入して炭化水素を高生産させることで、CO<sub>2</sub>から炭化水素を画的に高生産できる株の構築が期待できる。

### 第3の生体運動，戦車のように動く バクテリアの運動メカニズム

中根 大介

学習院大学理学部  
daisuke.nakane@gakushuin.ac.jp

目的：バクテロイデス門に属する土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は、ガラスなどの固形物表面上で前進・後進・反転・回転する複雑な運動をおこなう。この動きはべん毛や線毛など既知の生体運動とは全く異なっており、詳細な運動メカニズムはほとんど解明されていない。私たちは一見、複雑に見える上記の運動様式が実は簡単な2つの要素、つまり1.表面タンパク質が左巻きらせんのループに沿って外膜上を動き回ること、2.表面タンパク質が固形物表面との接着力を変えること、で生じるという運動モデルを提案した。これは戦車の走行装置である『無限軌道（キャタピラ）』とよく似ている。本研究課題では、筆者らが提案した無限軌道モデルを拡張し、バクテリアの自己組織化メカニズムを解明することに挑戦した。

方法：筆者らは、バクテリアの培養液を寒天上にスポットすると、滑走運動によって表面上を広がり、20-30時間後には、自身の1000倍にもなる複雑な渦状パターンを形成することを見出した。この集団運動の様子を渦形成の開始から終焉まで、低倍率の位相差顕微鏡で30時間以上連続的に観察した。超安定性光学システムを改良し、パターン形成の観察に特化した手法を検討することで、渦の中に含まれるバクテリア1匹1匹を観察できるまでに条件を調整した。

結果・考察：バクテリアの複雑な高次構造を簡易に観察する実験系を構築することに成功した。この複雑なパターンは最大で3mmにも達し、バクテリア1個体(5μm)の1000倍近くにも達した。この渦形成過程時には、ほとんどすべての個体が左に回転しながら0.3μm/sの速さでダイナミックな挙動を示した。この高度に組織化された集団運動は、バクテリア1個体の動きの特性によって決定されていると仮定した。そこで、バクテリア1個体の動きを最適な関数で近似して、その中心位置や角度を関数のパラメーターとして所得した。興味深いことに、バクテリア1個体が左旋回しながら運動する傾向を持つことを見出した。このような渦形成時の左回転および1個体の左旋回の特徴は、飢餓状態に特異的であり、グルコースを加えるとパターン形成および左旋回の動きの特性が消失した。

では、左回転と左旋回はどのような仕組みで生じているのだろうか。申請者らはタンパク質の動きに依存していると考えている。つまり、運動に必須の表面タンパク質が左巻きらせんに動くことで、1個体・集団レベルでの対称性の破れが生じる、というモデルである。しかし、これはあくまで仮説であるので、今後はバクテリア1個体の上で、1個の分子機械の動きを3次元的に、高時間分解能、高位置決定能で検出できる光学顕微鏡を用いて、ナノメートルレベルで、表面タンパク質の挙動を追跡する必要があるだろう。

白色腐朽菌の順遺伝学：  
担子菌特有の酸化酵素の  
分泌メカニズムの理解にむけて

中 沢 威 人

京都大学大学院農学研究科  
tnakazaw@kais.kyoto-u.ac.jp

目的：担子菌の一部“白色腐朽菌”は、木質中の難分解性高分子リグニンを生分解（単独で無機化）できる地球上唯一の存在である。その特殊能力の正体は、白色腐朽菌のみが分泌生産する酸化酵素 [リグニン・ペルオキシダーゼ (Lip) およびマンガニン・ペルオキシダーゼ (MnP)] であると言われている。一方で担子菌では、他微生物とは異なる特殊なタンパク質の糖鎖修飾様式・分泌経路の存在が先行研究によって示唆されている。また、上記のリグニンとリグニン分解酵素の関係は、一般的な基質と酵素の関係とは異なり、それを取り巻く「反応場（環境）の構築」が重要であることも色々と示唆されている。そのような特殊な機構が存在するためか、リグニン分解酵素を活性ある状態で異種生産することが極めて難しい。そこで本研究では、白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 野生株からリグニン分解酵素の活性が消失した突然変異体を分離し、その原因変異遺伝子を同定する順遺伝学アプローチによって、担子菌特有の翻訳後修飾・分泌に関わる因子を同定することを目的とした。

方法：ゲノム解読済みのPC9株に対して、致死率90%になるようにUV照射を行い、変異を導入した。その後、リグニン分解能力と相関がある色素脱色能力を指標として、突然変異体のスクリーニングを行った。

結果：150株に1株の割合で、色素脱色能力不全をきたす突然変異体を獲得できた。その後、交配可能な別の野生株との交雑から得たF<sub>1</sub>子孫の解析から、単一（もしくは隣接する複数）遺伝子変異が原因で、変異表現型になったであろうことを確認した後、新たに作成した遺伝解析系（遺伝マーカー）を用いて、原因変異遺伝子が存在するゲノム領域を絞り込んだ。ゲノ

ム・リシーケンスの結果、その絞り込んだ領域に変異した遺伝子が発見できた（これを推定原因変異遺伝子とした）。相補形質転換および遺伝子破壊実験を行った結果、現在までに4種類の原因変異遺伝子を確定するに至った。

考察：今回確定できた原因変異遺伝子の4遺伝子のうち、転写以降（翻訳後修飾）の段階に関わると考えられる遺伝子が2種類あった。よって、本実験系が目的達成のために有効に機能していることが示された。今後は、本実験系を用いた遺伝子の決定を行うことで「なぜリグニン分解酵素が異種生産できないのか？その原因はどこにあるのか？」に迫ることを新たな目標とする。

細菌毒素を認識するRNAアプタマーの  
創製と検査、診断および治療への応用

伊 藤 佐生智

名古屋市立大学大学院薬学研究科  
s-itoh@phar.nagoya-cu.ac.jp

目的：一本鎖RNAは転移RNAやリボソームRNAの例から示されるように配列に依存した高次構造を取りうる。ランダムな配列のRNAプールは無数の立体構造をとるRNAを含み、これを標的分子でスクリーニングすることで、標的分子に特異的に結合するRNA、“RNAアプタマー”を創製することができる。RNAアプタマーは抗体のように標的を特異的に認識し、かつ物理・化学的に安定で合成可能など抗体にはない優れた性質を持つ。一方で細菌毒素は病原性の発現に重要な役割を果たしており、毒素の検出、中和は細菌感染症のコントロールの重要な位置を占める。病原性細菌の中でも、黄色ブドウ球菌は多彩なタンパク質毒素を産生し、毒素が病原性の発現に寄与している。また本菌は食品や医療現場における汚染が問題となっている公衆衛生上重要な細菌である。本研究では黄色ブドウ球菌毒素の中でも全ての分離株において保有されており、病原性への寄与も高いα毒素に対するRNAアプ

タマーの創製を目指した。

方法： $\alpha$ 毒素に結合する RNA の取得は試験管内分子進化法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, SELEX 法) により行った。両側に T4 RNA ポリメラーゼ転写開始配列およびプライマー配列を持つ 40mer のランダム配列からなる 2 本鎖 DNA を鋳型に T4 RNA ポリメラーゼで転写させることでランダム RNA プール ( $10^{14}$ 種類) を得た。Ni セファロースに 6xHis タグを介して結合あるいは NHS 活性化セファロースを用いて共有結合した  $\alpha$  毒素またはニトロセルロース膜に固相化した  $\alpha$  毒素を用いて RNA を結合させ、洗浄したのち、イミダゾール、フェノール、フリーの  $\alpha$  毒素のいずれかを用いて RNA を溶出、回収し、逆転写後 PCR を行い鋳型 DNA を得た。結合・溶出条件を変動させながらこのサイクルを繰り返すことで  $\alpha$  毒素に特異的に結合する RNA を濃縮した。 $\alpha$  毒素を用いないコントロール実験と比較して特異的結合が十分増加したところで PCR 産物をクローニングし、塩基配列を解析した。

結果・考察：サイクルごとに RNA と  $\alpha$  毒素のモル比を調整し、かつ RNA の結合と溶出の条件を変化させて、SELEX 法を行った。8 サイクルの選別ののち、対照実験に比べて特異的に結合する RNA を取得することができた。これをプラスミドにサブクローニングし塩基配列を解析した結果、取得された配列の集団は相同性から 3 つのグループに収束していた。今後これらの RNA と毒素の結合親和性を表面プラズモン共鳴などで測定し、 $\alpha$  毒素の溶血活性に対する中和能、黄色ブドウ球菌培養上清や検体などに存在する野生型の  $\alpha$  毒素の検出の可否を確認する予定である。今回の研究により、細菌毒素に結合する RNA の創製法を確立することができた。今後様々な細菌毒素を対象に RNA アプタマーの創製に取り組む予定である。

医学・農学的応用を見据えた  
細胞膜脂質非対称センサーの  
分子解剖及びエンジニアリング

小原 圭介

北海道大学大学院薬学研究院  
obarak@pharm.hokudai.ac.jp

目的：細胞膜の脂質二重層では、その内層と外層で脂質組成や役割が異なる。その様な「脂質非対称」は真核細胞の生存に必須である。ヒトでは脂質非対称の部分的な破綻でさえ様々な疾患を引き起こす。筆者らは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に於いてその様な脂質非対称の状態を感知する脂質非対称センサー Rim21 を同定した。Rim21 は Rim101 経路という情報伝達経路の最上流に位置している。Rim101 経路は病原性真菌が宿主内で増殖するのに必要である。その様な背景の下、本研究では Rim21 による脂質非対称感知機構の解明および医学・農学的応用に向けた知的基盤の形成を目指した。

方法：出芽酵母を用いて、Rim21 の変異解析を行った。作製した Rim21 変異体の機能は、Rim101 経路の活性化能の有無で評価した。また、Rim21 の C 末端細胞質領域 (Rim21C) 部分のみを GFP と融合すると (GFP-Rim21C)、通常は細胞膜に結合し、脂質非対称の変化に応じて解離することを既に見出している。この性質を利用して、変異を導入したアミノ酸残基が細胞膜との相互作用に直接的に関わるか否かを検証した。また、大腸菌で Rim21C の組換えタンパク質を作製し、各種脂質をスポットしたニトロセルロース膜との結合実験を行った。病原性真菌 *Candida glabrata* の Rim21C と GFP の融合タンパク質を発現し、脂質非対称変化に際した挙動を追跡した。

結果・考察：Rim21C 前半部に位置する 3 つの連続したグルタミン酸残基 (3E 配列) をアラニンに置換した Rim21 変異タンパク質は機能を失っていた。この 3E 配列は、Rim21 の細胞内局在や他因子とのセンサー複合体の形成には関与していなかった。しかし、3E 配列

に変異を有する GFP-Rim21C は、脂質非対称が変化した際も細胞膜から解離しなかった。即ち、3E 配列は脂質非対称の感知に直接的に関わり、細胞膜からの反発力を生み出していた。また、その直前にある正電荷クラスター (RK 配列) は、3E 配列とは逆に細胞膜への結合力を生み出していることも判明した。脂質結合実験では、Rim21C 組換えタンパク質は、細胞膜内層に豊富に存在する負に荷電した脂質と結合した。また、*C. glabrata* の Rim21C は出芽酵母の Rim21C と同様に脂質非対称変化に応じて細胞膜から解離した。

結果を総合すると、Rim21 は柔軟性の高い Rim21C を触角の様に用い、細胞膜内層との相互作用を繰り返しながら脂質非対称を感知していると考えられる。RK 配列と負荷電脂質との親和性と 3E 配列による反発力の拮抗作用は、通常は親和性が優勢であるが、脂質非対称が変化し負荷電脂質が細胞膜内層から減少すると反発力が優勢となり、Rim21C が解離してシグナルが発せられると考えられる。このような「触角仮説」は *C. glabrata* にも適用できると考えられる。

微生物が持つ高次機能の解析：  
大規模ゲノム操作技術が拓く  
新たな遺伝子工学

柿澤 茂行

産業技術総合研究所生物プロセス研究部門  
s.kakizawa@aist.go.jp

目的：微生物は、感染性・病原性・運動性など、多数の遺伝子が連動することによって発現する「高次機能」を多く持つ。これら高次機能の全貌解明は微生物学の大きな命題であるが、その手法は極めて限られている。

本研究は、近年開発された「大規模ゲノム操作技術」を用いることで細菌が持つ高次機能の全容を解明しようとするものである。対象とする細菌は Class *Mollitutes* (モリキューテス綱) に属するスピロプラズマを用いる。スピロプラズマは哺乳類・植物・昆虫・甲殻

類などに感染する病原性細菌であり、らせん形状をしており、回転しながら宿主の体液中を泳ぐことが知られている。興味深い例として、スピロプラズマがショウジョウバエに感染すると雌のみが生まれる「オス殺し」現象が知られている。これらの感染・病原性発現・運動等の機構は興味深い高次機能であるが、スピロプラズマの培養と遺伝子操作は困難である例が多く、そのメカニズムはほとんど解明されていないのが現状である。本研究は、大規模ゲノム操作技術を活用し、スピロプラズマの全ゲノムをクローニングすることでその機能の解明を行うことを目指す。

方法：まずは培養可能なスピロプラズマ (*Spiroplasma chrysopticola*) を用いた。細菌から環状のゲノムを抽出するため、菌体をアガロースゲルに包埋し、その中でタンパク質と脂質の分解を行った。その後、ゲル中で制限酵素処理を行い、パルスフィールドゲル電気泳動によりゲノムサイズを確認した。全ゲノムクローニングのためのベクターは、すでに開発されている酵母人工染色体ベクターを用いた。このベクターには、酵母のセントロメア領域・酵母の選択マーカー・マイコプラズマの選択マーカー等の遺伝子が含まれる。また酵母の形質転換法としては、酵母の細胞壁を除いてからポリエチレングリコールを用いるスフェロプラスト形質転換法を用いた。

結果：スピロプラズマゲノムを抽出・切断し、ゲノムの長さを確認すると共に、クローニング領域を選定した。3種類の制限酵素 (*I-CeuI*, *SfiI*, *AscI*) で切断した断片と、1つの制限酵素で切断した全ゲノムのクローニングを行い、すべてクローニングに成功した。得られたクローンの選抜には、新たに確立したマルチプレックス PCR の系を用いた。その後、パルスフィールドゲル電気泳動にてインサートサイズを調べ、目的のサイズのゲノムがクローニングできていることが確認できた。

考察：酵母を用いたゲノムクローニングでは、より小さな断片のほうが効率よくクローニング出来ることが分かった。200-300 kbp 程度までは非常に高い効率で

クローニング可能であり、インサートサイズが長くなると効率が少しずつ下がる傾向にあった。しかし1 Mbp を超える配列でも問題なくクローニングできることがわかり、今後の機能解明に向けた研究を行うことが出来た。

酵母を利用した翻訳過程不全による  
ミトコンドリア病の分子メカニズムの研究

行 木 信 一

群馬大学大学院理工学府  
nameki@gunma-u.ac.jp

目的：リボソームが終止コドンのない mRNA を翻訳してしまうなど様々な理由により、翻訳は停滞する。最近になりミトコンドリアの翻訳系における停滞解消には、ICT1 蛋白質（翻訳停滞解消因子）がリボソーム上で機能することが明らかにされた。興味深いことに、ミトコンドリアではさらにもう一つの翻訳停滞解消因子 C12orf65 蛋白質が必須なことが報告され、その欠損はヒトではミトコンドリア病を引き起こすことが示された。この2つの因子は酵母からヒトまで普遍的に保存されていることから細胞にとって必須なことは明らかであるが、ミトコンドリア特有の翻訳停滞状況に対し、ICT1 と C12orf65 がどのような役割分担し機能するのか未知である。本研究の目的は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の系によるミトコンドリアでの翻訳停滞解消機構の解明である。それらの因子の欠損が細胞およびミトコンドリアにどのような影響を与えるのかを詳細に調べ、ミトコンドリア病の発症メカニズムの解明に結びつける。

方法：出芽酵母における *ict1* 欠損株 ( $\Delta$ yo114c 株) および *c12orf65* 欠損株 ( $\Delta$ ylr281c 株) について Flow cytometry を用いて細胞そしてミトコンドリアへの影響を様々な角度から調べた。

結果・考察：ミトコンドリアの機能が必須な非発酵性培地（炭素源がグリセロール、以下 YPG 培地）において、2つの欠損株に野生株との増殖能（濁度）の差

はないが、寿命解析を行うと野生株より短くなり、かつその影響は  $\Delta$ ylr281c 株の方が大きかった。YPG 培地での対数増殖期の細胞周期解析では、 $\Delta$ yo114c 株は G2 期に移行できず S 期でトラップされ、一方、 $\Delta$ ylr281c 株は S 期に移行できず G0/G1 期でトラップされていた。また、定常期では2つの欠損株は S 期でトラップされていた。さらに、2つの欠損株は対数増殖期、定常期ともにミトコンドリア膜電位が低下した。この原因をミトコンドリアに限定して考察するならば、 $\Delta$ yo114c 株ではミトコンドリアの分離が正常に行われないことが示唆され、一方、 $\Delta$ ylr281c 株ではミトコンドリアの融合が正常に行われていないか、あるいは異常なミトコンドリアを積極的に排除する機構が活発化していることが示唆される。一方、定常期では2つの欠損株は細胞周期の S 期で滞り、ミトコンドリアが分離することができない状況にあること、もしくは融合したまま機能しようとするミトコンドリアが多いことが示唆される。本研究により、培養細胞の系では明確にできなかった *yo114c* の欠損と *ylr281c* の欠損との影響の相違点が初めて明らかになった。さらに、*ylr281c* の欠損によりミトコンドリアの融合が正常に行われていないことが、ヒトのミトコンドリア病の患者で同様に起きているか検証する必要がある、発症メカニズム解明の手掛かりとなると考えられる。

組織血液型決定抗原様物質を保持する  
腸内細菌がヒトノロウイルスの  
環境中動態に与える影響の解明

佐 野 大 輔

北海道大学大学院工学研究院  
dsano@eng.hokudai.ac.jp

目的：ノロウイルス (NoV) は感染の第一段階である宿主細胞への吸着の際に、細胞表面に提示された組織血液型抗原 (histo-blood group antigen: HBGA) との相互作用を利用すると考えられているが、申請者らは HBGA 様物質を細胞外に有する腸内細菌 *Enterobacter*

sp. SENG-6がNoVを特異的に捕捉することが可能であることを報告した。本研究では、HBGA様物質を保持した腸内細菌が水環境中にどの程度存在しているのか、また細菌由来HBGA様物質に捕捉されたNoVはどのような形態で存在するのかを明らかにすることを目的とした。

方法：膜分離活性汚泥処理槽から得られた未処理下水サンプルをソースとし、抗HBGA抗体（抗A抗原抗体、抗B抗原抗体、抗H抗原抗体）を固定した96ウェルプレートを用いてHBGA陽性腸内細菌のスクリーニング・単離を行った。菌株の単離後、血液型検査キット（鎌倉テクノサイエンス）を用いてHBGA様物質の有無を判定した。さらに単離株の16S rRNA遺伝子シーケンス解析及びBD BBLクリスタルE/NF（Becton, Dickinson and Company）により菌種同定を行った。菌体由来のHBGA様物質を検出するためにウェスタンブロットティングを行い、NoVの細菌への吸着状況の観察するために菌株とノロウイルス様粒子（norovirus-like particle: NoVLP）の混合液を透過型電子顕微鏡（Transmission electron microscope: TEM）にて観察した。

結果・考察：今回単離されたHBGA陽性細菌株は*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., もしくは*Stenotrophomonas* sp.に属するものであり、3科4属に分類されたことから、下水および活性汚泥中には多様なHBGA陽性細菌が存在することが明らかとなった。ウェスタンブロットティングにより細菌由来HBGA様物質を検出したところ、リボ多糖からはHBGA様物質が検出されなかったのに対し、培地中に分泌された溶解性微生物代謝産物（Soluble microbial products: SMP）及び細胞外物質（Extracellular polymeric substances: EPS）がHBGA様物質を含んでいた。これらの結果は、HBGA陽性細菌との共存下におけるNoVの存在形態として、菌体に捕捉された状態と菌体から離れた状態の両方を考慮する必要があることを示している。TEM観察の結果、上清中から菌体から離れSMPに覆われた状態のNoVLPが観察され、ペレット再懸濁液中からは菌体に吸着した状態のNoVLPが

観察された。以上の結果より、NoVはHBGA陽性細菌との共存下において、菌体に捕捉された状態と菌体から離れSMPに覆われた状態のどちらかの形態で存在するといえる。

大腸菌縮小ゲノムシステムによる  
潜在的必須遺伝子群の同定解析と  
合成生物学的手法による  
「光合成大腸菌」の作製

加藤 潤 一

首都大学東京大学院理工学研究所  
jkato@tmu.ac.jp

目的：大腸菌は分子レベルで最もよく理解されているモデル生物であるが、臨床的には病原菌でもあり、一方産業面では広く利用されている宿主でもあり、種々の面から重要な生物である。その大腸菌を用いた先端的なゲノムサイエンスを基盤として、次世代の抗生物質の新規な標的と成り得る遺伝子群を同定して解析する。また合成生物学的手法により「光合成大腸菌」の作製を試みる。

方法：16S rRNA前駆体のプロセッシングに關与する必須遺伝子 *yqgF* がコードする YqgF タンパク質を精製して、*in vitro* で16S rRNA前駆体を基質としたRNase活性を調べた。また *yqgF*<sup>ts</sup> 変異株のリボソームの構成タンパク質をLC-MS/MSで調べた。さらに16S rRNA前駆体の5' leaderの欠失変異を作製して表現型を調べた。

また我々がこれまでに作製してきた大腸菌染色体の広域欠失変異株群、ゲノム縮小株群を利用して、潜在的な必須遺伝子を同定して調べた。

光合成に必要なクロロフィル合成の再構成を、紅色光合成細菌の光合成関連遺伝子群などを大腸菌で発現するように導入することによって試みた。またこれらの合成に重要となる大腸菌のヘム合成経路の解析を進め、中間体増産株の作製、機能未知関連遺伝子群の解析を行った。

結果・考察：精製したYqgFタンパク質が、Mg<sup>2+</sup>では

なく  $Mn^{2+}$  存在下で 16S rRNA 前駆体を分解することを示し、RNase であることを明らかにした。また *yqgF*<sup>ts</sup> 変異株のリボソームでは S1 タンパク質が欠損していることがわかり、16S rRNA 前駆体の 5' leader はリボソームの形成に重要であると同時に、S1 タンパク質のリボソームへのアセンブリを阻害することを示した。YqgF タンパク質は、細胞内で形成されている間に不活性型で存在していたリボソームを、形成後に活性型に変換するスイッチとして働いている可能性が考えられた。

潜在的な必須遺伝子を、合成致死関連遺伝子群として探索するシステムを構築し、実際に DNA ポリメラーゼ III のサブユニットと相互作用する、DNA 修復に関与する新規遺伝子 *yoaA* を同定した。さらに広い意味での酸化ストレス耐性に関与する遺伝子群の同定にも成功した。

系統的に離れた紅色光合成細菌の多数の光合成関連遺伝子群を大腸菌で発現するように導入することにより、クロロフィル合成の中間体であるクロロフィライド a の合成に成功した。またこれらの合成に重要となる大腸菌のヘム合成経路の解析を進め、中間体増産株を作製し、機能未知関連遺伝子 *hemX*, *hemY* 遺伝子の機能解析を行った。

### バクテリアの無機炭素濃縮機構と ポリアミンの関わり

安元 剛

北里大学海洋生命科学部  
yasumoto@kitasato-u.ac.jp

目的：ポリアミンは分子内に複数のアミノ基をもつ低分子化合物の総称で、バクテリアの細胞内には特に多く存在し、「普遍的かつ高濃度で存在する」という点で他の生体アミンとは異なる。我々はこのポリアミンが空気中の二酸化炭素 ( $CO_2$ ) と高い親和性を有し、 $CO_2$  を溶液中に取り込み海洋細菌の石灰化に寄与することを明らかにした。 $CO_2$  取り込みは光合成にも必須

であるため、ポリアミンがシアノバクテリアの光合成にも寄与している可能性は高い。そこで本研究では、光合成における  $CO_2$  固定酵素であるルビスコのカルボキシレーション反応に、ポリアミンが取り込んだ  $CO_2$  が供給されるのかを検証するとともに、シアノバクテリア培養液にポリアミン生合成阻害およびポリアミン輸送体阻害剤を添加し、増殖と光合成速度に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法：0.1M の各種ポリアミン（プトレシン、スペルミジン、スペルミン）水溶液を2日間静置し空気中の  $CO_2$  を吸収させた。このポリアミン溶液を市販の精製ルビスコの反応溶液に添加し、酵素活性を測定した。また、シアノバクテリアの *Synechocystis* sp. ATCC 27184<sup>TM</sup> を、25°C、光量  $40 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  条件下、BG11 培地で培養し、合成したポリアミン生合成阻害  $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) およびポリアミン輸送体阻害剤 L-Lys(palmitoyl)-*N*<sup>3</sup>-spermine (PTI-1) を添加した。所定の期間培養したのち蛍光強度から細胞数を算出した。増殖阻害がみられた阻害剤については、添加後に光合成活性を温度制御機能液相酸素測定装置（ハンザテック OXYT-1）で測定した。測定条件は温度 25°C、光量約  $500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  とし、培養液に  $NaHCO_3$  を 5mM となるよう添加した直後に測定を行った。

結果・考察：市販ルビスコに空気中の  $CO_2$  を吸収させた各種ポリアミン溶液を添加すると顕著なカルボキシレーション反応が見られた。空気中の  $CO_2$  を吸収した各種ポリアミン溶液は、*in vitro* でルビスコに  $CO_2$  を供給できることが明らかになった。ポリアミンは細胞内に高濃度で存在していることが知られているが、ポリアミンと  $CO_2$  との高い親和性は知られておらず、 $CO_2$  濃縮や光合成との関与は明らかにされていない。そこで、高い  $CO_2$  濃縮能を有することが知られているシアノバクテリアの培養液に合成した DFMO および PTI-1 を添加し、増殖や光合成速度に及ぼす影響を調べた。その結果、ポリアミン生合成阻害には強い増殖阻害がなかったのに対し、PTI-1 を 60~80  $\mu M$  付与するとシ

アノバクテリアの増殖は有意に抑制され、光合成活性(酸素発生速度)も添加後に減少した。DFMOは動物細胞中のポリアミン量を減少させることは知られているが、藻類のポリアミン量を減少させるにはその他のポリアミン生合成阻害剤を用いる必要があることが示唆される。PTI-1はシアノバクテリアに対する増殖阻害と光合成速度を減少させることが明らかになった。本研究により、シアノバクテリアの新たなCO<sub>2</sub>濃縮機構を提唱することが出来た。今後より詳細に検証していく予定である。

プロテオーム解析法を用いた未分化能を  
有する歯肉上皮系前駆細胞における  
歯周病菌産生毒素の標的膜タンパク質の探索

中山 真 彰

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
nakay-m@okayama-u.ac.jp

目的：歯周病菌の長期感染による歯周病は、口腔機能の顕著な低下に繋がる。本研究では、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の感染による歯周病の病態発症の解明のために、Pgが産生する病原性プロテアーゼ“ジンジバイン (Gp)”に着目し、Gpの宿主細胞への毒性発現機序の解析を行った。我々は、Pgの感染により宿主細胞の多様な生理的機能を制御するホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) /Aktの抑制を見出した。そこで、Gpによる歯周組織破壊の分子作用機序を明らかにするために、PI3K/Akt抑制の分子機序とGpの宿主細胞に対する標的膜タンパク質を解析した。

方法：PI3K/Aktの活性抑制の分子機序を明らかにするために、歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) を用いて、Pg ATCC33277 標準株 (WT株) と Gp欠損株 (MT株) を感染させ、比較実験を行った。GpによるPI3Kの活性抑制における膜タンパク質とPI3Kの調節サブユニット p85との結合への影響を検討した。アビジン-ビオチン標識法を用いて、膜タンパク質のビオチンラベルを行ない、感染後に細胞を破碎し、アビジンビーズに

よる沈降後、p85の検出を行った。次に、HGEPの膜タンパク質をビオチン標識し、細菌感染後のビオチン化膜タンパク質の変化を調べ、変化が得られたタンパク質のMALDI-TOF質量分析 (Bruker社) を行なった。異なるアプローチとして、既報の中からPgが切断する膜タンパク質の検索を行ない、上皮成長因子受容体 (EGFR) の報告があったことからEGFRとp85の結合を調べた。

結果・考察：WT株とMT株をHGEPに感染させ、ビオチンラベルした膜タンパク質とp85との結合を調べた結果、WT株の感染では複合沈殿物からp85が認められなかった。MT株の感染ではp85が検出された。p85と結合している膜タンパク質をGpが切断することが、PI3Kの活性抑制とその伝達カスケードの攪乱に繋がっていると考えられた。WT株とMT株のHGEPへの感染における、ビオチンラベルされた膜タンパク質の変化を調べた。その結果、およそ100kDa, 110kDa, 120kDa付近の3つの膜タンパク質の消失が認められたため、MALDI-TOF質量分析を行なったが、明確な結果が得られなかった。従って、実験法を改善し、今後も継続して実験を行なう予定である。EGFRとp85の結合に対するGpの影響を調べた結果、菌株の感染・未感染のいずれもEGFRとp85の結合は認められなかった。GpによるPI3Kの抑制とEGFRの切断とは関係性がないと考えられた。以上から、GpによるPI3K抑制のメカニズム、およびGpの標的膜タンパク質の解析を継続し、歯周病態形成に繋がるGpの病原性発現機序を明らかにしていく。

# 平成25年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：平成25年4月～平成28年3月



## 鉄酸化細菌によるアスベスト 分解メカニズムの解明と応用

石田 丈典

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

目的：アスベストは、悪性中皮腫を引き起こすことが明らかとなりその使用が全面禁止になったものの、まだ問題が解決したわけではない。建物の解体によるアスベスト含有廃棄物量の増加や、これまでのアスベストの暴露によって今後2030年前後までに約10万人の中皮腫の発症が予測されている。鉄酸化細菌とアスベストを混合して培養したところ、結晶構造が壊れている様子が電子顕微鏡により観察された。そこで、本研究では、鉄酸化細菌を用いたアスベストの分解を目指した。また、アスベストは肺に吸引されると分解されず体内に蓄積し、周囲の鉄または鉄含有タンパク質（フェリチン）を吸着しアスベスト小体を形成する。このアスベスト小体の形成による鉄の沈着は、生体内の鉄の恒常性を壊し、活性酸素の発生を増加させており、これが癌化の一因と考えられている。アスベスト小体の鉄の被覆物を溶解し取り除くことができれば、鉄による活性酸素の発生を抑制することができ癌化のリスクを低減させることができるのではないかと考えた。そこで、本研究では、人の肺中アスベスト（アスベスト小体）を分解することも目指した。

方法：鉄酸化細菌を、アスベストと黄鉄鉱を添加した培地で、28℃の条件で培養を行なった。アスベストの分解は形状の変化を顕微鏡で観察することにより評価した。アスベスト小体の分解は、患者から分離したアスベスト小体に50mMに調製した供試物を添加して、アスベスト小体の鉄の被覆物が溶解するかを顕微鏡で観察し評価した。

結果・考察：*Acidithiobacillus ferrooxidans* とアスベストと混合して培養を行ない、アスベストを電子顕微鏡で観察した結果、アスベストの表面の結晶構造が壊れている様子が観察された。しかし、それ以上分解するこ

とは難しくアスベストの繊維構造を完全に分解することはできなかった。

アスベスト小体の分解を目指し検討を行なった。アスベスト小体の鉄の被覆物は、主にフェリチン由来の水酸化鉄であることが知られている。予備検討として、水酸化鉄を溶解する物質を探索したところ、鉄キレート作用を持つトリポリリン酸が酸性条件で水酸化鉄を溶解することが分かった。そこで、患者から分離したアスベスト小体と、酸性条件でトリポリリン酸を混合したところ、5日でアスベスト小体の鉄の被覆物をほぼ完全に溶解できることが分かった。しかし、生体内は中性であるため、中性条件でアスベスト小体を分解することが望ましい。トリポリリン酸は、中性条件ではアスベスト小体を分解することができなかった。そこで、中性条件でアスベスト小体を分解できる物質の探索した結果、アスコルビン酸が中性条件でアスベスト小体の鉄の被覆物をほぼ完全に溶解できることが分かった。アスコルビン酸（ビタミンC）は、安価で生体毒性も低いいためアスベストによる悪性中皮腫の予防に応用できる可能性がある。

発酵研究所助成研究報告 第30号 【非売品】

平成28年12月10日 印刷

平成28年12月20日 発行

編集委員長 中瀬 崇  
編集委員 伊藤忠義, 大島敏久, 熊谷英彦  
徳増征二, 阪井康能, 左子芳彦  
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



