

NUMBER 31

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH  
COMMUNICATIONS**

**2017**



# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 31



2 0 1 7

**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	中濱 一雄	
常務理事	樽井 直樹	
理事	熊谷 英彦 富田 房男 中瀬 崇 古川 謙介	鈴木健一朗 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

## 目 次

発酵研究所の歴史 (5)		
微生物株保存事業から研究助成事業への転換 - その激動の2年間 (2001.4 ~ 2003.3) -	波多野和徳	1
第11回助成研究報告会の開催	横田 明	13
<b>■ 平成27年度大型研究助成</b>		
不完全サビキンおよび内生型サビキンの系統分類学的所属の決定 ならびに生活環進化の解明のための情報基盤構築	山岡 裕一	17
レブリン酸を基幹化合物とする新規バイオ生産技術の開発 ~ 化学触媒変換とバイオコンバージョンの融合による 木質バイオマスの高効率転換 ~	羽部 浩	37
有害化合物汚染土壌の微生物集団による分解・浄化に向けた基盤研究: 分解菌と共存する非分解菌の役割の解明	津田 雅孝	47
窒素循環研究のパラダイムシフトを目指した未培養性硝化細菌の 網羅的高速ハンティング	常田 聡	57
<b>■ 平成23年度寄付講座助成</b>		
BioCentury を先導する次世代酵母リソース中核拠点の形成	金子 嘉信	67
メタノール資化酵母 <i>Ogataea polymorpha</i> における tRNA-sgRNA 融合を用いた CRISPR/Cas9 による ゲノム編集ツールの開発	金子 嘉信	75
メタノール資化酵母 <i>Ogataea polymorpha</i> では2つの 接合型遺伝子座間領域の染色体逆位により接合型が転換する	前川 裕美	87
メタノール資化酵母 <i>Ogataea polymorpha</i> の接合型変換に関わる 転写制御	前川 裕美	99
リン酸シグナル伝達経路の主要調節因子はメタノール資化酵母 <i>Ogataea polymorpha</i> で保存されている	金子 嘉信	107

## ■ 平成27年度一般研究助成

混合栄養生物としての能力を持つ放線菌の系統的分布範囲と生理特性の解明, および独立栄養に着目した新規な放線菌系統群の探索……………	菅野 学	121
コメツキモドキ-酵母栽培共生系の進化と酵母の拮抗菌抵抗性の関係……………	土岐和多瑠	121
ヒト腸内からの難培養性微生物の単離とその分類および バイオリソース整備……………	坂本 光央	122
植物工場に発生する植物病原性 <i>Plectosphaerella</i> 属菌の分類学的 および植物病理学的研究……………	宇佐見俊行	123
水田土壌の微好気性鉄酸化細菌の特性および生態に関する研究……………	渡邊 健史	124
プロファージによる細菌細胞分化における 遺伝子再構築機構の獲得と進化……………	佐藤 勉	125
浅海性無脊椎動物の体液に棲みつく新奇ヘリコバクターの 分類学的・生態学的性状の解明……………	中川 聡	125
担子菌アンズタケ類の生物学的特性解明： 特に、種分類、生態的分化ならびに菌根構造について……………	山田 明義	126
珪藻 DNA メタバーコーディング解析による河川湖沼水質評価法の開発 ……	佐藤 晋也	127
有害元素代謝機構の多様性解析から解き明かす 微生物エネルギー代謝の進化……………	濱村奈津子	128
アルミニウム耐性とアルカロイド産生能から読み解く 植物根内共生菌の多様性と共生関係の生態学的意義……………	広瀬 大	128
MqsR-YgiT toxin-antitoxin system によるバイオフィーム制御機構および バイオフィーム薬剤耐性機構の解明……………	山口 良弘	129
非天然マクロラクタム化合物の微生物発酵生産……………	宮永 顕正	130
大腸菌の菌外膜ベシクル生産促進機構の解明……………	尾島 由紘	131
酢酸菌の酸化発酵に関わる中央炭素代謝制御に関する研究……………	新井 博之	131
二倍体で、育種が比較的容易である上面ビール酵母に、 ビール醸造に適した凝集性を付与した菌株を造成し、 小規模多品種生産する地ビールへの貢献をめざす……………	尾形 智夫	132
放線菌生体内代謝の超高感度リアルタイム観測手法の開発と応用……………	Ulanova Dana	133
微生物機能を利用したバイオベースポリマー生産系の構築……………	岩木 宏明	134

ゲノム解析結果を利用した清酒酵母の減数分裂における 染色体組換えに関する研究	下飯 仁	134
免疫活性化能と乳化作用を併せ持つパン酵母の細胞表層構造解析	東 雅之	135
出芽酵母のリン酸飢餓応答におけるオートファジーの役割と その誘導機構に関する研究	新谷 尚弘	136
植物病原菌が病原性タンパク質を植物・微生物間インターフェースに 局在させるメカニズム	高野 義孝	137
省リン型農業実現のための土壌微生物難溶性リン酸塩資化スペクトルの 体系的分析とその資化機構の解明	岡野 憲司	137
エピジェネティックス制御の人為的再制御による 微生物生産機能の活性化	渡辺 賢二	138
緑藻クラミドモナスを用いた繊毛運動制御機構の解明	小田 賢幸	139
結核菌の表面に存在する酸素結合蛋白質を介した感染メカニズムの解明	若杉 桂輔	140
ビフィズス菌がヒト腸内に定着するために重要な スルファターゼ遺伝子の役割の解析	加藤 紀彦	140
限定的発現遺伝子の機能解析による新たな両賭戦略システムの解明	森川 一也	141
外来遺伝子の発現を抑制する CRISPR-Cas エフェクター複合体の 機能構造解析	沼田 倫征	142
微生物の中樞神経系への侵入経路およびその分子機構の解明	村上 正晃	143
細菌の光環境応答学の開拓	笠原 賢洋	143





## 発酵研究所の歴史 (5) 微生物株保存事業から研究助成事業への転換 - その激動の2年間 (2001.4 ~ 2003.3) -

波多野 和 徳

### はじめに

財団法人発酵研究所 (IFO) は2011年4月1日から公益財団法人発酵研究所として正式に研究助成を主とする事業の道を歩み始めた。思いおこせば2002年7月に60年近くかけて収集・保存してきた約15,000株の一般微生物株と8名の研究者を国が新たに設立した「生物遺伝資源保存センター (NITE Biological Resources Center (NBRC))」へ移管し、抜け殻となった財団法人は生き残りをかけアドホック的に「微生物研究者への研究助成」を中心とした事業へと方向転換した。それから8年後の2011年にようやくこの事業活動が正式に認められ今日に至った。これもひとえに当時の理事・評議員の方々の適切なるご指導、ご提言、ならびに国内の微生物研究者の方々からのご理解と協力ならびにご支援の賜とと思っている。改めて、この紙面をお借りしてお世話になった方々へ御礼申し上げる。

これまで、当財団の歴史については、歴代の各研究所長 (長谷川武治 (3代目)<sup>1)</sup>、飯島貞二 (4代目)<sup>2)</sup>、長谷川徹 (5代目)<sup>3)</sup>、竹内昌男 (6代目)<sup>4)</sup>) が、それぞれの所長時代における研究成果や苦労話を記してきた。そこには、設立以来60年近くにおよぶ研究を主体とした微生物株保存事業を遂行して、世界有数のカルチャーコレクション (CC) を確立し、さらには世界的に優れた研究成果を挙げてきた努力の道のりが記されている。その世界に誇るCCが何故に、如何にして短時日のうちに微生物株保存事業から研究助成事業へと転換しなければならなかったのか、その激動の経緯について明らかにしていきたい。

### 予 兆

生物多様性条約 (Convention on Biological Diversity; CBD) の発効とカルチャーコレクション (CC) へ及ぼした影響:

1993年12月29日に発効したCBDが日本国内に於いて微生物株保存事業を実施している各CCへ直接影響を

及ぼし始めたのは発効後5年ほど経ってからであろう。財団法人発酵研究所 (IFO) では、1995年頃からその影響を受け始めていた。

最初は、保存菌株の交換におけるATCC (American Type Culture Collection) の対応であった。これまでIFOとATCCとは何の問題もなくお互いの保存菌株の交換を行っていたが、1995年頃から菌株交換に関する応答が無くなった。一方、イギリスやヨーロッパなどにあるCCからは特段の変化が認められなかったことから、ATCCの対応は不審なことであった。1997年頃になってATCCの部門担当者から「ATCCはCBD (米国はCBD非批准国) に対応すべく菌株分譲に関する所内規則の整備を行った。これからは所内規則に従って対応する」との知らせが届いた。当時、IFOにおいてはCBDに関する認識は殆ど無く見過ごされていた。

つづいて、1997年の秋頃、バイオインダストリー協会 (JBA) から筆者へ「微生物資源に関する意見交換会を行いたいのでIFOからも出席して欲しい」という要請があった。最初の会合で集まったメンバーは日本微生物資源学会 (JSCC) に所属する数名の顔見知りの研究者に加えて見知らぬ通産省の関係者数名が含まれていた。しかし、日本の代表的なCCである理化学研究所微生物系統保存施設 (JCM) からは誰も出席していなかった。この席で初めてCBDの発効により各国、特に開発途上国は、自国内から産出される微生物に対して権利意識を持ち始め、「採取した微生物などを含む試料を勝手に国外に持ち出すことを禁じた」いわゆる微生物の囲い込みが始まり、CBDが単なる生物多様性の保全を謳った条約だけではなく、微生物によってもたらされる利益の配分にも影響を及ぼす経済闘争の元になり始めたことを知った。また、ATCCが菌株交換における不可解な行動を理解することもできた。この会合は、CBDの下で日本の微生物産業を護り発展させていく施策の検討に加えて、微生物を用いた諸産業の下支えをしている日本にあるCCの存在意義と将来における役割について話し合う目的で開かれたようであった。数回の会合の後、討論内容は次第にCCの将来像に移っていった。

## 新 BRC 設立における通商産業省（通産省）の戦略

OECD Workshop, Tokyo 1999 の開催と新 Biological Resources Center (BRC) 構想：

日本経済の振興を担っている通商産業省（通産省：現在の経済産業省）の一部局では「生物多様性条約（CBD）」は、発酵工業を得意とするわが国の産業に大きな影響を与えるに違いない。特に、発酵工業の根幹をなす微生物などの収集・保全・利用において受ける影響は大きいだろう。その対策として日本にある微生物株保存機関（CC）の整備をする必要がある」と考えた。通産省の外郭団体の一つである「バイオインダストリー協会」（JBA）を通じて IFO に対し「カルチャーコレクション（CC）に関する意見」を求められたのは 1998 年の初頭であった。その年の 2 月にはフランス・パリにある経済協力開発機構（OECD）の部会への出席を求められた。この会議で日本の通産省は「CBD に則った新しいコンセプトの CC すなわち New Biological Resource Center 構想」を披瀝し、これを具現化するためのワークショップを東京で開催することを提案した。この国際会議は、1999 年 2 月東京において世界中の主な CC の代表者を集め、まず「WFCC-WDCM\* Symposium, Tokyo」を開き、ここで「CC の現状と問題点、21 世紀における CC のあるべき姿」について討論した。翌日、日本政府主催で産業界、政府関係者、学术界、保存機関の代表者らによる「OECD Workshop, Tokyo 1999」が開催された。ここで、将来あるべき CC の理想像を政府サイド、産業界サイド、ならびに学术界サイドから要望と支援策などが論議された。（\*：World Federation for Culture Collections Committee on the World DATA Centre for Microorganisms）

通産省からの働きかけ（1999 年）：

東京ワークショップ終了後の 3 月に通産省の担当課長補佐は IFO の研究所を訪れ「通産省が計画する新 BRC」に関する青写真を示し意見を求めた。また、同年 5 月に JBA が開催する「日本の BRC を考える」に出席する竹内所長は藤野副社長に会い、「新 BRC に構想について」武田薬品側の考えを聞いたところ、既に通産省の堅尾課長が藤野副社長に会い、「通産省が計画する新 BRC に IFO が参画するよう」武田薬品側に打診し、武田薬品側は賛同の意向を示していたとのことであった。

通産省が設立を計画している新 BRC の規模と組織：

通産省が設立を計画している新 BRC は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の一組織として設け

られる。その施設は、千葉県木更津市かずさアカデミアパーク内に人員規模は 50 名、床面積 6000m<sup>2</sup>の建屋を建設する。新 BRC 設立に要する総予算として 60 億円を計上した。そして、NITE からは「新 BRC の設立」に関わる具体的な機器の選定などについて IFO に相談しにやってきた。

「カルチャーコレクションの未来像」に関する国内での議論：

東京で開催された CC に関する国際シンポジウムとワークショップと前後して、日本国内でも JBA または JBA-JSCC が主催する「CC の未来像」に関する討論会が開かれた。ここで、日本微生物資源学会（JSCC）の会長から「日本でも IFO を中核にして国内にある主要な CC を統合して ATCC に匹敵するような大きな CC を創るべき」との提言があった。当時、IFO の一研究員だった筆者は、「IFO が微生物株保存機関としての規模と質が高く評価されている」ことを認識しただけであった。

## 財団法人発酵研究所（IFO）を取り巻く諸情勢

IFO の財政状況：

IFO の財政に関しては、財団の設立者である武田薬品工業株式会社（武田薬品）社長六代目武田長兵衛とその一族である小西新兵衛が理事長を務めている間はなんの問題も生じなかった。お二人は、「IFO の役割は、微生物による発酵工業界や微生物の学术界などの発展を下支えするのに重要である」というメセナ的な考えで財団の運営に携わっていた。しかし、六代目武田長兵衛が亡くなり、小西新兵衛が退任したあとは、IFO への寄附金は武田薬品の経営幹部が裁量することになった。

筆者が入所した当時（1993 年）の IFO の財政は、武田薬品からの寄附金に加えて預貯金などの高金利に支えられ豊かであった。当時の長谷川徹所長は、豊かな資金をもとに研究を充実させるため研究者を増やし、所員数 27 名を数えるほどになった。また、研究内容も質・量ともに充実していた。しかし、この頃から景気の後退が進み、金利の低下とそれに伴う収入減に陥り、1995 年度にはかなりの金額の赤字を計上せざるを得なくなり、武田薬品から緊急に寄附金の追加を仰ぐことになった。これを契機に武田薬品から「IFO の組織をスリム化して寄附金の範囲内で運営するよう」求められ、やむなく 7 名の研究者を出向元である武田薬品に引き取って貰わざるを得なくなった。この財政危機に陥る前までの IFO は、本来の業務である保存菌株の分譲収入や安全寄託株や特許株の寄託収入に加えて武田薬品からの受託研究などによる収入で健全な財政状況を保っていた。しかし、赤字

を補填するための寄附金の追加を求めたことにより武田薬品経営陣はIFOの運営に対して厳しい目を向け始めた。それと同時に、1993年から武田薬品の社長を継いだ武田國男は事業の中心を医薬品関係におき、また、コストパフォーマンスを重視する施策を実行し、社会的貢献度は高いが寄附金に見合った利益をもたらさないIFOに対し「寄附金なしで運営すること」を求めてきた。

#### 寄附金の減額と研究施設からの退去要請：

2000年4月にIFOは武田薬品のIFO担当部門の部長から「2001年度から寄附金を毎年5,000万円ずつ減額する。ただし、3年後に残っている2,500万円を減額するかは未決定である」旨が口頭で通知された。さらに9月には当時在住していた研究棟が3年後に建て替える予定であることを理由に「2002年度末までに今の場所を明け渡すよう」通達された。城攻め、兵糧攻めに遭ったIFOはその年の11月24日に臨時理事会・評議員会を開いた。この会の冒頭、理事長から「IFOは、現時点において武田薬品から寄附金の減額と現在居住している施設からの退去が要請されている」ことが披露された。この臨時理事会・評議員会終了後、出席した理事・評議員の全員で「通産省が設立を進めている新BRCへの移転について」自由討論が行われたが、その内容は明らかにされていない。

#### 通産省からの新BRCへの参画要請

##### 最初の参画要請：

1999年11月に開かれた5省庁会議において、通産省は「IFOを主体にして生物資源保存機関を創る」ことを明らかにし、12月に通産省の堅尾課長は森田理事長を訪れ、「新BRC設立におけるIFOの協力と参入」を正式に申し入れた。この時の理事長は、新BRC設立への協力は約束したが、参入に関しては態度を保留した。このことは竹内所長を通じてIFOの全所員に対して「通産省が千葉県木更津市かずさアカデミアパーク内に新しい生物資源保存施設を創る。その中核としてIFOがその候補に挙げられている」ことが明らかにされた。2000年3月に理事会が開催され、その会の終了後、「通産省が設立を計画している新BRCへIFOが参画を求められていること」に関して意見交換を行った。これについては、竹内元所長が「発酵研究所の活動－発酵研究所を継いだ人たち（1995.4～2001.3）」において詳述されているので割愛するが、どの出席者からも新BRCに移行した後もIFOが実施してきた微生物に関する研究活動が継続する事ができるか懸念される意見が出された。

新BRCの設立を進めたい通産省は、2001年からIFO

に対し新BRCへの参画要請の働きかけを一層強くしてきた。

##### 第2回目の参画要請：

2001年2月7日に通産省製造産業局生物化学産業課（以下、経産省と略す）塚本課長と渡辺班長が森田理事長を訪れ、IFOに対し新BRCへの参画を正式に申し入れた。この時の会談内容は、森田理事長によって「IFO関連面談要旨」<sup>5)</sup>としてまとめられた。その概略は

1. BRCとは、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の生物情報解析部（仮称）<sup>(註)</sup>の中に生物遺伝資源施設を作り、それと新財団（IFOが母体）とが一体になった組織を称する。
2. BRCの当面の人員は施設職員5名、技術情報担当者5名以上
3. BRCの予算は平成12年度2.24億円確保、平成13年度は4.1億円確保
4. その他、新財団設立などのタイムスケジュールが示されていた。
5. また、理事長の要望として
  - ① 運営費の継続的な確保
  - ② IFO事業が国の支援によって国際的に見て相応しい位置づけで業績を挙げ得る体制に整備されることは望ましい事であると考えている
  - ③ 武田薬品の株式の保全については武田薬品との長年の信頼関係の上からも万全を期すつもりである。

<sup>(註)</sup>：後のバイオテクノロジーセンター

上述したように、ここでは通産省が構想している新BRCの規模と予算の大枠が示され、それに対する森田理事長の考えが明らかにされている。この会談内容は、武田薬品経営陣にも伝えられた。また、後日、森田理事長から「通産省の新BRCへのIFOの参画のあり方」について具体的な考えが示され、竹内所長を通じて全所員に知らされた。

2001年3月9日武田薬品から武田國男社長名で森田理事長あてに「貴財団に対する当社の要望について」の書類が届く<sup>6)</sup>（資料：武田薬品からの要望）。

それによれば、

1. IFOが経産省プロジェクトに「新財団」として参加する場合、「新財団」はIFOを母体とした衣替えではなく、別途「新財団」を設立すること。
2. 発酵菌株は「新財団」に寄附すると共に研究担当者は異動し、経産省に協力する。
3. IFOは存続するものの、寄附行為に掲げた目的範囲を遵守し、スリムな態勢による事業運営を図る。当社の資金支援を受けることなく事業運営をはかる。

4. 経産省プロジェクトに参画することなく、IFOが独自の事業活動を図る場合、国から要望があれば発酵菌株を提供し、研究担当者の一部を異動させることも視野に入れておく。
5. この場合も、当社からの資金支援を受けることなく事業活動を図るためのスリムな態勢を整えることを要望する。
6. 2001年度の寄附金は1億円とする。次年度からの寄附金は情勢に応じて判断するが、いずれにしても当社からの資金支援を受けずに運営体制を整えることを要望する。

この様な要望書が武田薬品から提出されてきたにも拘わらず、2001年3月14日に開かれた理事会・評議員会では何ら討議された形跡は伺えない。

### 第3回目の参画要請：

2001年3月27日に経産省の塚本課長、渡辺課長補佐は、前回の訪問時(2月7日)よりさらに具体化した案「経産省が進める新BRC構想へのIFOの関わり方」を持って森田理事長を訪れ、IFOにたいして新BRCへの参画を要請した。これを受けて、森田理事長は理事・評議員・監事の方々に対して、「これからのIFOがとるべき進路」について下記に示すような見解を表明した。その全文を下記に示す。

- ② 生物資源センター(仮称)(2002年4月1日完成予定)は、機構の一部門として総工費60億円で建設中です。
- ③ 同センター完成時に現IFO研究者を中核とする研究者ならびにカルチャーコレクションを迎え入れる構想で作業が進められています。
- ④ 「機構」に所属する生物資源センター(専従人員は5名程度)と独立財団法人たる「新財団」(現IFOの研究者が管理および研究実務を担当する)を一括してBRCと称す。
- ⑤ 「BRC」の予算規模は約3~4億円/H13年度でその大半は新財団への委託費に充当する。
- ⑥ 菌株分譲に伴う収入は「機構」に入る。
- ⑦ 知的所有権は原則として新財団に帰属する。
- ⑧ 2002年度から、新財団は微生物系統保存・提供のほかに、もう一つの分野である「技術開発研究」を立ち上げる。このための予算と人員は別枠で考える。
- ⑨ 新財団の研究所長は未定。IFO理事長案として、波多野現IFO所長を推薦する意向を表明した。
- ⑩ 新財団の運営については独立性が損なわれないことが肝要である旨を指摘した。特に、微生物系統保存・提供が百年を越えて継続される長期研究であるのに対し、技術開発研究はせいぜい10~20年のスパンで浮沈する性質の研究である点を指摘し、研究および研究者の評価に際して基礎研究者が犠牲にならないような配慮が肝要であることを述べた。
- ⑪ 新財団の運営は原則的に独立組織として行われるが、技術開発研究を推進するため必要な研究者の雇用と併せて理事・評議員に若干の変更があり得る。
- ⑫ 新財団の本拠地(登記場所)は、BRC近隣が望ましい。
- ⑬ 現状では、IFOの組織全体がそのまま新財団になる可能性が高いと思われる。

以 上

H 13年3月28日

理事・評議員・監事 各位殿

### 経過報告

-(財)発酵研究所の進路について-

理事長 森田 桂

#### 1. 経過の概要

先人の高い志によって創設され、多くの研究者が心血を注いで今日の姿に育てあげたIFOに対して、今回国の援助の下でより長期的かつ国際的視点に立ってIFOをセンター・オブ・エクセレンスとして発展させたいという提案が寄せられています。財団を預かる者としては、この提案に示される「新財団」のゆるぎなき姿が見通せる段階に至るまで、自らの責任で誤りのない舵取りを行いたく存じます。当然のことながら、関西を離れて千葉のかずさ研究所に移られる現IFO所属の研究者にとって、新財団が希望に充ちた受け皿であるべきことは言を待ちません。

本件につきまして理事、評議員各位のご忌憚のない御意見と倍旧のご支援をお願いいたします。

#### 2. 経済産業省からの説明と提案 (H13.3.27付)

- ① 独立行政法人「製品評価技術基盤機構」(以下「機構」と呼ぶ)

2001年4月1日発足予定、417名

この「経過報告」は、森田理事長が実質上「IFOを母体とした新財団を設立し、新財団ごと新BRCへ参画する」ことへの表明であった。

#### 新BRC構想に対する武田薬品の見解：

森田理事長への訪問後、経産省の二人は武田薬品を訪問し「経産省BRC構想に対するIFOの関わり方」について説明した。

この席で示した武田薬品側の考えは、先の3月9日にIFOに対して示した社長からの「要望書」の内容と殆ど同じであった。

- 1) 経産省が推進する国家プロジェクト「BRC構想」に協力する。発酵菌株、研究担当者の移管には全面的に協力する。研究担当者の「新財団」への移動をスムーズに行うため当社からの出向とすることでの協力を検討する。

- 2) ただし、IFOの基本財産のうち当社株式については何らかの形で当社の影響下におくことが出来ることが必須条件である。
- 3) IFOを基にした新財団の設立ではなく、独自の財団を設立してIFO本体は残しておく。これによって当社株式の散逸などの恐れがなくなる。
- 4) それが不可能なら、IFOにたいして「BRC構想」には参画せず、独自の財団法人として事業活動を継続する要請をする。この場合でも経産省から要請されれば発酵菌株の提供、研究担当者の異動については協力しても良い。

などを主張したようである。

この武田薬品側の主張に対して、経産省側は、

- 1) 独自の財団の設立は不可能に近いこと、
- 2) 武田薬品側の株式の保全に対する考えは理解したが、現時点では良い解決策はない。結局、IFOを「経産省プロジェクト」に参画させるという武田薬品側と経産省との話し合いは、武田薬品が「IFOが保有する武田薬品の株式の保全」を主張することで暗礁に乗り上げ、話し合いは不調に終わった。

筆者は2001年4月1日に竹内所長から所長／常務理事を引き継いだ。この時すでに武田薬品から今年度の寄附金が1億円に減額され、さらに2002年度の寄附金はどうなるか見通せない状況であった。就任後すぐに、森田理事長から「これからのIFOを運営するための基本理念を箇条書きにして示すこと。また、今後5年間に起こる諸情勢を考慮に入れてIFOの収支についてシミュレーションしておくように」と指示があった。また、「IFOは独立した組織なのだから武田薬品の思惑に左右されず、IFOが創立されたときの理念を守る独自の考えで物事を進めるべきだ」というような趣旨の助言をいただいた。

微生物株保存機関としての生き残りをかけて(2001.4～7):

武田薬品は、経産省との会談後、IFOが保有する武田薬品株の散逸を確実に防ぐ為にはIFOにこれまで通りの業務を遂行させるのが良策と考えたようで、4月下旬、武田薬品はIFOの担当部門である本社総務人事部を通じて「2001年以降におけるIFOの運営内容とそれにかかる費用額の試算」を至急検討するように要請してきた。この時が「IFOがCCとして生き残っていく」唯一の好機であった。まず、IFOの「寄附行為」を逸脱しない運営が出来ることを前提に、IFOが予めシミュレーションしてあった収支予測をたたき台にして、総務人事部の担当者とは種々検討し、最終的に下の表に示す3通りのケースにまとめた。

IFOの収支予測（ケース別）

収 入	ケース1	ケース2	ケース3
	(百万円)	(百万円)	(百万円)
基本財産からの配当金、預金利子	120	120	120
事業収入（菌株分譲）	45	15	0
菌株保管収入（特許株、安全寄託株）	15	15	0
寄附金	100	0	0
収入合計	280	150	120
支 出	所員15名	所員13名	所員6名
人件費（給与など：1人当たり1100万円）	165	143	66
運営費（業務費、光熱費、不動産借用料等）	115	77	54
支出合計	280	220	120
過不足額	0	-70	0

ケース1：現況（2001年度）：所長、事務長、事務員2名、研究者11名、その他パートタイマー3名、業務委託2名

ケース2：所長、事務長、事務員、研究者10名

ケース3：所長、事務長、研究者4名

ケース1：現況（2001年度のIFOの活動）（所員15名）

新たな分析機器などの購入は控えるが、微生物株保存事業（菌株の収集・保存・分譲、安全寄託株ならびにEPO特許株の適正な保存・管理）を実施する。一般菌株の分譲や契約株、特許株の保管などから上がる収益は従来通りとする。

総収入は1億8千万円、総支出は2億8千万円で1億円の赤字になるが、今年度の寄附金1億円で相殺される。しかし、次年度以降は寄附金が望めないののでこのケースでは2002年度以降1億円の赤字になる。

ケース2：最低限レベルにおける微生物株保存事業活動（所員13名）

一般微生物株は新BRCへ移管する。IFOの保存事業は「寄附行為」から逸脱しないよう最低限のレベルで実施する。菌株の分譲や契約株などからの収入は減少する。

総収入は1億5千万円、総支出は2億2千万円で7千万円の赤字になる。

ケース3：寄附金なしでの活動（所員6名）

一般微生物株は新BRCへ移管する。研究者は各部門（カビ、酵母、細菌、放線菌）1名とし、菌株の保存・分譲のみ行う。保管している特許株、契約株は近い将来新BRCまたは適当な保存機関へ移管することを模索する。ヨーロッパ特許庁（EPO）へ国際寄託機関としての地位を返上する申出を行う必要がでてくる。

総収入および総支出は1億2千万円。

このケースでは、財団としての「寄附行為」がほとんど実施できなくなり、財団は解散への道を進むことになる。

ケース2であればIFOの「寄附行為」に則った微生物株保存事業とEPO国際寄託機関の地位を一定レベルで保てる。しかし、これには武田薬品から7千万円の寄付金が必要であった。森田理事長の了解を得て上の3案を武田薬品の総務人事センターを通じて経営企画部へ挙げ、社長も出席する「経営企画会議」に上程し、「ケース2」を認めて貰えるよう決済を受けることにした。結論から言うとこの案は、企画部長ならびに副社長までの了解は得られたが、武田國男社長の「IFOの運営は寄付金なしで行う。保存菌株や研究者は国の要請があれば移す。ただし武田の株券は武田薬品の管轄化に置く」との考えを付度し、上程されず社長の目には触れることはなかった。IFOの微生物株保存機関としての生き残りをかけた武田薬品との交渉も不調に終わり、さらに両組織のトップである森田理事長と武田國男社長との話し合いも実現せず、またIFOの事業内容やそれによって生じる社会、学術界における役割と貢献度を説明するからとの波多野からの申し出も無視され、武田薬品との話し合いは暗礁に乗り上げたままになってしまった。

7月に入り、経産省から新たな提案がIFOに示された。

#### 第4回目の参画要請：

##### 経産省からの新たな提案

2001年7月18日に経産省から「IFOがBRCへ参加することについて」の新たな提案が示された。この会談に出席した経産省の塚本課長と渡辺課長補佐、(独)製品評価技術基盤機構(NITE)・バイオテクノロジーセンター菊池所長、IFOの森田理事長ならびに波多野の5人が本音をぶつけ合い、突っ込んだ討論をした。

経産省側が用意した提案は、

#### 1. IFOがBRCへ参加する為に受け入れ側が考慮すべき事項として

- 1) IFOの独立性が確保されていることが必要である。それが担保されるためにはIFOの独自財源が必要である。
- 2) 公益法人制度改革との関係から、国からIFOへ委託できる総資金は、IFOの独自財源の2倍以下にならざるを得ない。

#### 2. 受け入れるNITEの方針

- 1) NITEはBRCの職員を将来的には50名程度に拡充する用意がある。
- 2) NITEには、直ちに10名程度をBRCの職員として採用または配置換えすることが可能である。

NITEとIFOは、IFOの自己資金と総額とのかねあいで、仕事の分担を設定することが必要である。これらを考慮して以下の4案を提案した。

【案1】IFOはタイプカルチャーコレクション(TCC)を担当し、基本財産運営収入の2倍を超えない範囲(1.5~2億円)で委託を行う。

- ・IFOへの委託の内容はTCCの維持・管理・充実とする。
- ・微生物多様性コレクション\*はNITEの仕事として行う。したがって、その責任者はNITEで採用する。
- ・この案1では、公益法人制度改革で拠出金の制限を受ける限り、TCC部門への拠出金額に不安が残る。

【案2】IFOが全てのコレクションの維持・管理・充実を担当し、NITEはインテリジェントサービスなどの仕事を担当する。

- ・IFOへの委託の内容はTCCの維持・管理・充実とする。
- ・IFOとNITEはそれぞれ全く異なる仕事を分担することから、相互に補完するという関係が構築され、相互依存の強力な協力関係が構築できる。
- ・「案1」と同様NITEからの拠出金の制限を受けるため、TCC部門への資金に不安が残る。

【案3】IFOの職員をNITEで採用し、完全に吸収する。この場合、IFOは引き続き大阪に残り、NITEとの継続的な関係はない。

- ・IFOはカルチャーコレクション研究への助成機関として仕事の内容を衣替える。
- ・この場合、IFOはカルチャーコレクション事業から撤退することとなり、IFOの理事会・評議会の賛同が得られない可能性が高い。
- ・NITEにおけるIFO研究者への人件費の確保は可能と考えられるが、給与が下がる可能性がある。
- ・この案が認められれば、TCC部門に安定した資金が投与できる。

【案4】IFO職員がNITEに出向する、又は、IFOがかずさに分室を設置する。

- ・IFOのポテンシャルをそのまま維持することが容易である。
- ・NITEに出向する、または分室を設置するという場合、NITEとIFOの仕事の切り分けが不明確になる。仮に、TCCをIFOが所有したまま担当するとした場合、NITEに出向する、又は分室を作る必要性が存在しない。

\*：産業応用微生物、遺伝子、DNAなどで細胞株は含まない。将来、病原菌も考慮に入れる。微生物の能力を十分に生かした利用が出来るようにする。

### 森田理事長の見解

1. 組織における責任の所在をはっきりさせるには、「案1」より「案3」が望ましい。
2. IFO 本体は、CC 研究助成財団として残す。
3. IFO の保有する菌株には、IFO No. を付することを続ける。
4. NITE 内に Type Culture Collections と Diversity Collections の二本柱を建て、それぞれ独立運営とする。

経産省が示した新たな提案に対する森田理事長の見解は、これまで理事長が「経過報告」で明らかにしていた「新BRCへはIFOを母体とした新財団として参加し、NITEとは連携するものの独立した組織としてCCを運営する。武田薬品のIFOに対する思惑とは一線を画し、IFOは最良と思われる独自路線を選択する」とした参画方針を変更し、武田薬品が経産省へ示した見解と殆ど同じになった。話し合いの中で、「案1」は、「経過報告」で示した見解を受け入れた案であったが、この案では新BRCにおける命令系統が一本化されないあやふやな状態になる恐れがあり組織運営上好ましくないと判断され、最終的に「案3」を採択する事になった。この案を進めるための最大の関門は、「案3」にたいして理事・評議員から同意が得られるかであったが、理事長は理事・評議員の説得に対して強い意志と自信を示した。

この会談の結果は、最終的に以下のような会談議事録としてまとめられた。

### 会談議事録

日 時：平成13年7月18日(水) 10:00～11:30  
場 所：武田薬品工業(株) 大阪本社9階応接室  
出席者：経済産業省・製造産業局・生物化学産業課 塚本課長、渡辺課長補佐  
(独)製品評価技術基盤機構・バイオテクノロジーセンター 菊池所長  
(財)発酵研究所 森田理事長、波多野所長

(独)製品評価技術基盤機構の生物遺伝資源センターの整備と(財)発酵研究所の協力について以下の事項について話し合いがあり、歩み寄りがあった。

1. 独立行政法人製品評価技術基盤機構（以下、「NITE」という）はOECDレポートにも謳われている定義に基づくわが国の中核的生物遺伝資源機関（以下、「BRC」という）を「かざさ」に整備する。BRCを整備するにあたり、タイプカルチャーコレクションとして実績のある財団法人発酵研究所（以下、「IFO」という）に参画を求め、これを基盤としてBRCを発展させるとともに、活動の幅を学術および産業応用まで広げることとする。

2. IFOはこの趣旨を理解しNITEに協力する。NITEはこれまでのIFOの歴史と実績のあるタイプカルチャーコレクションを維持・継続・発展させることを前提とし、BRCを整備する。
3. IFOが所有する保存菌株（特許菌株を除く）はNITEに無償で譲渡し、NITEの所有とする。NITEは譲渡を受けたコレクションをIFO番号で管理し、引き続き維持・発展させる。特許菌株については別途協議する。
4. NITEは、IFO所員をNITE職員として採用し、この職員を中心としたタイプカルチャーコレクション事業を立ち上げる。NITEはこの事業の継続性を確保する。
5. IFOから譲渡された菌株の維持・管理・充実はタイプカルチャーコレクション事業の部署で実施する。
6. NITEは、タイプカルチャーコレクション事業とは別に、従来のカルチャーコレクションが取り扱っていた微生物資源より幅の広い微生物および遺伝子資源を対象とした事業を立ち上げ、幅広く産業応用をめざす。両事業はお互いに協力し合い、BRCの発展に寄与する。
7. NITEがIFOのタイプカルチャーコレクション事業を内部化することに伴い、IFOは主たる事業を研究助成事業等に変更する。その本体は大阪に置く。
8. IFOは、平成14年夏までに研究リソース（保存株・所員・研究資材など）を大阪にある研究所施設内からNITE生物資源保存供給施設内に移転する。
9. NITEとIFOは、タイプカルチャーコレクション事業をIFOからNITEに移転するための具体的な課題やその対応策などの詳細を検討するためのタスクフォースを共同で設置し、平成13年8月31日までに検討結果を取りまとめる。

### 四者会談

平成13年7月18日に合意した「会談議事録」を基に「IFOがBRCへ参加すること」についての合意を確かなものにするため、平成13年8月22日に武田薬品工業(株)大阪本社において「四者会談」が持たれた。(財)発酵研究所からは森田理事長、(独)製品評価技術基盤機構からは斉藤理事長、武田薬品工業(株)からは藤野会長、経済産業省製造産業局からは増田次長が出席した。この四者会談で「(独)製品評価技術基盤機構の生物遺伝資源センターの整備について」の覚書を最終的に確認した（「会談メモ」<sup>7)</sup>として文書化されている）。なお、この会談における現認者として、IFOからは波多野が、NITEからは菊池所長が、経産省製造産業局からは生物化学産業課の塚本課長、渡辺課長補佐が、産業技術環境局からは知的基盤課の小谷課長が同席した。この会談は当初午前中に本社で開催される予定であったが、折からの台風22号の影響で新幹線の到着が遅れ、急遽、午後から開催されることになり、また場所を「クラブ関西」へ移すという波乱含みの会談であったが、「会談議事録」の中身についてはそれぞれの組織に不満はなく、すんなりと各事項について確認・承認した。

## 文部科学省（文科省）への経過説明

四者会談が終了した後、平成13年8月24日文科省へ赴き「財団法人発酵研究所（IFO）の研究資源を独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）に移転するにあたってその経緯の説明ならびにその後のIFOの事業形態に関する意見交換」という事案にたいして詳細な説明をおこなった（文科省との会談メモ<sup>8)</sup>。文科省はIFOからのこの突然の申し出に、驚愕と困惑、微生物株保存事業関係への危機感、さらには、この重要な案件にたいして主務官庁の一つである文科省へ一言の相談もなかった事に対して憤りを感じたことだろう。その証拠に、この会合には担当部局である研究振興局学術機関課から主任以下3名が出席したのみならず、ライフサイエンス課から2名、研究助成課から2名、その他数名の職員が出席していたことから明らかである。

IFOからは、まず研究資源をNITEに移転しなければならなくなった経緯とその後のIFOは微生物株保存事業を細々と続けるものの、それに加えて研究助成事業を行うということについて説明した。

文科省側からの質問は、

①これまでIFOは大学の研究機関に年間どれほどの菌株を分譲していたのか、これらがNITEの保存機関（NBRC）に移されたら大学の研究機関に分譲されなくなるのではないかであった。この質問は、CCの本質をまったく理解していない質問であったが、「IFOは大学の研究機関に対して年間1,300～1,400株分譲している。NBRCがCCを標榜する限りは、菌株の分譲に関しては所属機関による分譲制限をするようなことはしない。CCの使命は保存菌株を学術的または産業的に利用しようとする研究者に対し平等に分譲する事である」と説明した。

②IFOが研究助成を行う事に関しては、「これは明らかに「寄付行為」の内容の変更にあたり「寄付行為の違反」になる、研究助成を主事業にするなら財団を解散し、新財団を設立して研究助成事業をするべきだ」と厳しく指摘された。

これに対して、IFOからは、「研究資源の大半はなくなるが、特許株の受託・保存・分譲ならびに安全寄託株の保存、さらには危険分散のため移管する一般微生物株の一セットは大阪に保存することなどから、IFOは規模を縮小して従来の業務を遂行している。その中からでてきた資金の一部を研究助成に回すのだ」と説明した。また、「研究助成は寄付行為の中にある研究委託に相当する」と説明したが、この会談では文科省からの了解は得られず、今後とも連絡を密に取り合い話し合いを続ける

ことで終了した。後日談として、平成15年4月に中濱新常務理事と共に文科省研究振興局学術機関課を訪問し、「今年度からアドホック的に研究助成事業を開始した」ことを告げ、了解をもとめた。これに関して、「主事業の内容が研究助成であることは明らかに寄附行為の違反である。この見解は曲げられないが、この事業はアドホック的に始めた研究委託であると考えている」と態度を軟化させていた。さらに、「この事業を正式に実施するためには平成18年度から発効する「公益法人制度改革」に従って対応するように」との助言を貰った。

## 臨時理事会・評議員会の開催

平成13年9月7日に「臨時理事会・評議員会」を開催し、下記の2議案について審議した。

- 1) (財)発酵研究所の研究リソースをNITE生物資源保存供給施設（NBRC）に移転することについて
- 2) 研究助成事業を行うことについて

1)のNBRCへの移転に関する議案については、二人の理事から反対する意見が出され<sup>脚註)</sup>、移転の話を進めたい理事長と真向から対立し激論が交わされたが、最終的に双方が少しずつ譲歩し、「移転するという原則に立って交渉をすすめる」で落ち着いた。

2)の議案については、そのままの字句ではIFOの寄付行為から逸脱する恐れがあると指摘され、「研究助成事業を行うことを加える」と修正して承認された。

<sup>脚註)</sup> IFOの研究資源を新BRCへ移すことに対する反対意見は、2人の理事から出された。まず、

- 1) 新BRCにおいてIFOがこれまで実施してきた微生物に関する幅広い研究が継続してできるような運営がなされるかどうかの疑念であった。この理事を含めて学術界を背負ってきた理事・評議員の方々は、これまでの経験で通産省が行ってきた微生物に関する諸施策への対応に不信感を持っている方が多くおられた。もう一つの反対意見は、
- 2) 先に理事長が「経過報告」で述べたようにIFOを母体とした新財団ごと新BRCに移動すると説明していたのに、一般保存菌株を含む研究機材と研究者のみが新BRCに移動することになったという変更であった。それに加えて、
- 3) 一般保存菌株を無償譲渡することであった。IFOから新BRCへ無償譲渡された場合、譲渡される全菌株の所有権がIFOにあるのかどうか明確にしておくべきで、「これらが明らかにならないうちは軽々にことを進めるべきではない」と主張した。

ただ、多くの理事・評議員の方々はIFOの本体が大阪に残ることについて安堵し、移転を容認する態度であった。



## IFOの微生物株保存事業をNITEへ移管するためのタスクフォース

IFOの微生物株保存事業をNITEに移管することについてIFOでは未だ正式に決定されていなかったが、移管を進めるという前提で「IFO-NITEタスクフォース」が動き出した。IFOからは、微生物株保存事業（CC）についてあまり知識をもっていないNITEにたいして、CCの意義ならびに役割についてその基本的な事柄について解説することから始まった。NITEからはCCにおける組織や保存する菌群ごとに必要な研究者の数ならびに実験補助者数などの相談を受けた。実務的なことは簡単に処理できたが、一番の難問題は何名のIFO研究者がNITE生物資源保存供給施設（NBRC）に移動してくれるかであった。NITE側は、異動を希望するIFO所員は全員受け入れる用意をしていた。しかし、大阪において研究生活を送っていたIFO所員にとって、全く見知らぬ土地である千葉県に生活拠点を移すと言うことは大変な事で、解決すべき数多くの問題が立ち上りだした。また、IFOの殆どの所員は武田薬品からの出向社員であるため、どのような身分と処遇でNITEへ異動するかはIFOでは決められず、結局、NITE企画管理部と武田薬品人事部との話し合いに委ねられた。異動の対象となった所員の身分・処遇については揉めに揉めて翌年のはじめまで決着がつかなかった。そのため、IFO所員の多くがNBRCへ異動するかどうか決めかねていた。ただ、IFOの実務責任者としては、研究者全員がNBRCへ移動してくれるよう説得するのみであった。それは、NBRCへ移されたIFOの保存菌株の維持、管理、分譲といったCCの主要な部分を経験のある研究所員が担当し、NBRCの微生物株保存事業の立ち上げに協力し発展させて貰いたかった。それに加えて、所員達が持っている微生物研究における諸キャリアを無駄にして欲しくなかった。出向元の武田薬品に帰る途もあったが彼らのキャリアを生かせる道は殆ど閉ざされていた。

最終的に、移動を了承したIFO所員は、武田薬品からの出向者としてではなく、IFOへ出向したまま勤務地変更という状態でNBRCへ移動し、それぞれのキャリアに基づいてNBRCで格付けされ、天上がりの非常勤研究職員として処遇されることになった。勿論、NITE側は、彼らが一日も早くNITE職員となって業務に携わってくれることを切に願っていた。

## 元常務理事飯島貞二氏のご逝去

微生物の保存事業について、その重要性和社会的貢献

を強く意識し、現役時代にはその実現に向けて指導的役割を果たし、また、退任した後も当財団の行く末を案じてくれていた。筆者の心の支えであった飯島貞二氏が2002年3月3日にご逝去された。前年の10月に飯島さんのご自宅に伺い、これからのIFOの運営やNBRCにおける事業の進め方など多岐にわたりご相談申し上げたときは、些か辛そうではあったが財団とNBRCの運営に関する基本的理念について熱く語っていたのと思うと飯島さんの訃報に接したときは、一種の虚脱感に襲われた。

## 微生物株保存事業の移管

平成14年3月8日、第114回理事会ならびに評議会<sup>9)</sup>においてIFOが所有する一般微生物株約15,000株、研究資材をNBRCへ移管する事と研究者の移動を正式に決定し、ここに60年近く続けられてきたIFOの微生物株保存事業は正式に幕が下ろされた。残った財団は、危機管理のために残した微生物株の1セットと契約株、特許株の保管を行うとともに研究委託を主体にした研究助成事業を始めることになった。

平成14年7月4日：IFOが保存していた一般微生物株と研究資材ならびに研究者は、武田薬品大阪工場地区から千葉県木更津市かずさにある生物遺伝資源センター（NBRC）へ移転した。IFOには常務理事、事務長、事務員の3名が残り、菌株などの保管と事務処理を行う。

## IFOの研究活動（2000.3～2002.6）

さて、経産省がIFOに対して「新BRC設立への協力と参入」を申し入れてからNBRCへ微生物株保存事業を移管するまでの2年余り（2000.3-2002.6）の間におけるIFOの保存事業と研究活動はどうであったのだろうか。2001年度における保存事業の実績は下記に示すように前年度と比べて全く遜色ない。2002年は、6月に菌株の分譲業務を終了したため分譲数は減少した。一方、各所員の保存菌株の品質管理に関する研究や菌株収集の意欲は衰えず、彼らの研究意欲と努力の成果が学術発表数に現れている。

	2000年*	2001年	2002年	2003年
保存株数	16,442	16,373	1,255**	1,118
分譲株数	8,501	8,819	2,040***	13

\*：既出（竹内昌男<sup>4)</sup>）

\*\*：2002年度の保存数

\*\*\*：2002年6月までの分譲数。一般微生物株は同年7月にNBRCへ移管した。

学術発表

	誌上発表	口頭発表	講 義	執筆(共著)
国 内	17	15	2	2
海 外	14	3	0	0
合 計	31	18	2	2

この中には、見方洪三郎が「酵母の系統保存法に関する技術開発」の功績で日本微生物資源学会「技術賞」を受賞した受賞講演と報告論文、岡根泉が「植物内生菌の分類および生態に関する研究」で日本菌学会奨励賞受賞講演が含まれている。

彼らの活力は新しいNBRCの職場に於いても十分に発揮された。

## 新 IFO の新運営方針

IFOがNBRCに研究資源を移した後、財団の新しい運営方針を決めるため平成14年11月7日に臨時理事・評議員会を開催した。(参考資料：H14年臨時理事会・評議員会議事録)<sup>10</sup>。

議題は、

1. 平成15年度から5年間における財団の具体的運営について
2. 寄付行為変更について－主務官庁への働きかけとその経過報告

出席者は、

理 事：岡田、岡見、波多野、早石、藤野、森田  
 評議員：大村、木村、駒形、竹内、竹中、武田、豊島  
 監 事：大嶋

である。討議は多岐にわたり含蓄の多い内容であったが、ここにはその要約を記す。

- 1) 微生物に関する出版物を刊行する。内容は微生物の「実験提要」のようなものにして研究者の指標となるようなレベルとし、有料とする。

大島泰治監事が出版事業委員長として指名された。

- 2) 研究助成は国が実施している助成とは重ならないように配慮する。

選考委員長

- I. 駒形和男評議員：微生物・分類・保存関係
- II. 豊島久真男評議員：微生物に関し全体を網羅した研究、後に健康と環境に関する研究と具体化された。

- 3) 助成した研究成果の評価をする

評価委員長：早石修理事、副委員長：岡見吉郎理事

- 4) 寄附行為の変更については具体的な文案が出されたが、評議員の一人から、国は「公益法人制度改革」について審議を始めているので、その情報を収集し、

法案が決まったらすぐに対応できるよう準備しておくようにとの助言を貰った。

これで新IFOの今後の運営方向が決まった。

平成15年3月の理事会・評議員会において波多野は常務理事を退任し、中濱一雄が新しい常務理事に就任することが承認された。

平成15年4月1日から、森田理事長、中濱常務理事主導の下でアドホック的に研究委託の一環として研究助成事業を開始した。

## そ の 後

生物遺伝資源センター（NITE Biological Resource Center：NBRC）の誕生

NBRCは、NITEの1部門であるバイオテクノロジーセンターのBRCセンターとして2002年5月23日に開所式を迎え正式に発足したが、菌株の分譲業務を始めとする全ての業務はIFOからの研究資材が到着するまで準備状態にあった。諸々の業務が本格的に動き始めた頃のNBRCの体制は、系統保存課（CC担当）には、9名のIFO研究者に加えて、NITEが雇用した微生物研究を専門とする任期付研究者ならびにNBRCの研究職員として教育とトレーニングを受けた4名のNITE若手職員を含め総勢17名が、資源開発課には、任期付き研究職員を含め30名が、管理課（事務担当）には11名が配属され、これに17名の派遣社員が加わり総勢75名の大所帯から成っていた。

2002年7月にIFOからの研究資材が到着し、7月10日からNBRCにおいて一般菌株の分譲業務を開始した。これにはIFOから移動してきた研究者とIFOが開発した分譲システムが多大な貢献をした。IFOからNBRCに移動した研究者は、カビ担当3名（伊藤忠義、中桐昭、岡根泉）、細菌担当2名（中川恭好、内野佳仁）、放線菌担当1名（田村朋彦）、情報担当1名（末永格：翌年3月退職）、IFO所員の統括責任者である筆者の8名である。さらに、強力な助っ人として元IFO所員であった細菌のスペシャリストである坂根健と酵母のスペシャリストである見方洪三郎の2名が加わり総勢10名となった。この10名が中心となってNBRCにおける微生物の保存と分譲業務を動かした。特筆すべきは、系統保存課の責任者として坂根健が課長に就任し、保存菌株の品質管理から研究指導まで幅広く貢献したこと、また、見方洪三郎と伊藤忠義はNBRCに雇用された初心者である派遣社員の人々にたいして菌株保存方法の一つでIFOが開発したL-乾燥法の技術と微生物研究では基本中の基本である培地調整の実施指導を行い、IFOで培われた技法の実施教育と普及に努めた。また、菌株の分譲シ

テムは、IFOが開発したシステムをそのまま踏襲し、移管後わずか1週間で分譲開始をする事ができた。このシステムはその後、NBRCがIFOのシステムをベースに開発したシステムが動き出すまで用いられた。

IFOから移動した研究者のその後を追ってみよう。2004年3月末にNITEから懸命な慰留要請があった坂根健が、同年9月末には伊藤忠義が、同年12月末には見方洪三郎が退職した。この3名はIFOに於いても菌株の保存管理のスペシャリストでその力をNBRCにおいても遺憾なく発揮し、NBRCにおける微生物株保存事業の基礎を築いたと言っても過言ではない。坂根、伊藤、見方の3名は、IFOが実施していた微生物株保存事業がNBRCへ移された後、この事業がきちんと継承・実施される事を見届けたら退職する心づもりでNBRCへ来たようであった。残りの5名は、2008年に正式にNITE職員として雇用された。IFOから移動した所員の行く末に一段落つけた波多野は2009年3月にNITEを退職した。東日本大震災後、中桐昭は鳥取大学へ、岡根泉は筑波大学へと転出した。現在(2017年)NBRCに残っているのは中川恭好(系統保存関係の課長)、田村朋彦(特許株担当)と内野佳仁(開発関係を担当)の3名となった。彼らはそれぞれの部門においてその重責を担い、NBRCを支え、旧IFOが実施してきた微生物株保存事業を継承・発展させている。

## おわりに

財団法人発酵研究所(IFO)は、設立当初(1944年)から有用微生物の収集・保存・分譲を行うと共に、集めた微生物の基礎ならびに応用研究などを実施してきた。応用研究部門を切り離した1964年からは、微生物の収集・保存・配布とこれらの基礎研究をする所謂カルチャーコレクション(CC)に専念し、保存菌株の数ならびにそれらの質の高さ、さらに保存菌株を用いた基礎研究の質の高さにおいて日本はもとより世界に誇る組織となった。これはひとえにこの財団の社会的重要性を認めその設立に尽力し、常に経済的支援をし続けていただいた武田薬品工業株式会社社長・故六代目武田長兵衛氏とそのご一族ならびに同社経営陣におけるご理解の賜物である。

それならば何故、IFOがCCから研究助成へと事業転換をせざるを得ない事態に陥ったのか? 筆者なりの推察をしてみよう。

その遠因として、1995年に当財団が赤字を出し、その補填の為に武田薬品から寄附金の追加要請をしたことが考えられる。これを切っ掛けに、武田薬品側はIFOへの資金支援をする事への是非論が出てきたのではない。また、この頃から武田薬品は経営の中心を医薬品事

業に置き、しかもコストパフォーマンスを重視する施策をとり始め、目に見える経済的利益を生み出しにくい当財団は、リストラの対象部門の一つとして考えられたのではないだろうか。さらに、それを推し進めたのは、武田薬品の社長を始め経営上層部は、IFOを自社の研究所の1部門程度の認識しかなく、社会的貢献度は高いが直接的な経済効果を出さないIFOに対する評価は極めて低かったと考えられる。

もうひとつは、通産省が国の新BRCを設立しようと考え、その基盤となる保存機関として民間運営のIFOに目をつけたのではないかと考えられる。1994年および1997年に新BRC設立を推進した通産省基礎産業局生物化学産業課の職員と課長が、IFOの研究所を訪問している(IFO芳名録より)。武田薬品の思惑と通産省の思惑が相俟って、両者でIFOの研究資源を新BRCへ移す算段をしたのではないかと推察される。

これらに加えて、IFOは運営資金の大半を1カ所からのみの寄附金に頼っていたことにも遠因があったのではないだろうか。当財団が設立された経緯から考えると、IFOの運営が武田薬品からのみの寄附金に委ねられたことは致し方ないことと考える一方、運営資金の調達に關してもう一工夫があれば事業転換をせざるを得なくなるというリスクから多少なりとも逃れられたかもしれない。例えば、財団の事業に賛同する多方面の団体や人々から寄附金の公募などをして運営資金の獲得を試みる必要もあった。このことは今の公益財団法人発酵研究所の運営にも考慮すべきことで、常にそのことを念頭に入れて運営していく必要があるだろう。

最後に一言書き加えておきたいことは、会社が財団法人などに寄附をするという行為は会社の経済活動ではなく会社の社会貢献の一つであり、それをする事によって会社は社会的敬意を受けるということ、会社幹部が十分に認識していなかったことである。特にIFOの微生物株保存事業は学術界、発酵工業界などへの貢献度が高く、武田薬品がIFOの運営に対して資金援助をして多大な社会貢献をしていると、社会から高い敬意を受けてきていた。これを忘れ、単なる経済性だけでIFOの事業を判断している愚かしさを認識していなかったことは誠に残念である。ただ、皮肉なことに、IFOの研究資源をNBRCに移管した後、武田薬品は株の配当金額を上げ始めたため、今日、その恩恵に浴しIFOは潤沢な資金を得ることができ、研究助成事業を順調に進めることができた。この事業は、国内の微生物関係の研究者から大いに評価され感謝されている。これも、武田薬品が株の配当金額を高く維持してくれているお陰と感謝している。

この発酵研究所の歴史(5)は、筆者が手に入れた諸文

## 波多野 和 徳

書や見聞きした事の下敷きにして書かれている。別の立場の人から見ると納得できない部分もあるであろう。また、筆者の判断で、契約書、要望書、他部門が作成した議事録は、一部を除いてそのまま全文を掲載することを控えた。了解願いたい。

### 参考資料

- 1) 長谷川武治. 「微生物保存事業と IFO」1995. IFO Research Communications. 17: 9-18.
- 2) 飯島貞二. A History of Institute for Fermentation, Osaka. 2001. IFO Research Communications. 20:15-33.
- 3) 長谷川徹. 発酵研究所の歴史. 2014. IFO Research Communications. 28:1-10.
- 4) 竹内昌男. 発酵研究所の活動 - 発酵研究所を継いだ人たち (1995.4 ~ 2001.3) -. 2016. IFO Research Communications. 30: 1-16
- 5) 森田桂. 「IFO 関連面談要旨」. 2001年2月8日.
- 6) 武田薬品からの要望. 「貴財団に対する当社の要望につい

て」2001年3月9日

- 7) 「会談メモ」. 2001年8月22日
- 8) 波多野和徳. 文部科学省との会談メモ. 2001年8月24日
- 9) 波多野和徳, 吉田正憲. 第114回理事会・評議員会議事録. 2002年3月8日.
- 10) 波多野和徳 (文責者) 平成14年度臨時理事会・評議員会議事録. 2002年11月7日.

### 略 歴

波多野和徳

1941年生まれ

1964年4月：武田薬品工業株式会社入社，研究所配属

1993年10月：武田薬品から財団法人発酵研究所へ出向

2001年から2003年：IFO 所長／常務理事

2010年から2017年：IFO 理事長

2017年6月理事長退任

## 第11回助成研究報告会の開催

平成29年6月9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11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件の研究成果のポスターによる発表が行われた。参加者は、大学、国公立研究所、企業の研究者、大学院生など総数232名であった（このうち大学院生は29名）。

報告会に先立ち、中濱一雄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「不完全さび菌および内生型さび菌の系統分類学的所属の決定ならびに生活環進化の解明のための情報基盤構築」（山岡裕一）の1題は徳増征二 元筑波大学教授の座長のもとに、「レブリン酸を基幹化合物とする新規バイオ生産技術の開発～化学触媒変換とバイオコンバージョンの融合による木質バイオマスの高効率転換～」(羽部 浩)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、「有害化合物汚染土壌の微生物集団による分解・浄化に向けた基盤研究：分解菌と共存する非分解菌の役割の解明」(津田雅孝) および「窒素循環研究のパラダイムシフトを目指した未培養性硝化細菌の網羅的・高速ハンティング」(常田 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「BioCenturyを先導する次世代酵母リソース中核拠点の形成」(金子嘉信)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。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爽やかな発表となった。発表の内容は全文が本報告集に収録されている。なお、寄付講座助成の報告は総論1報と各論4報に分けて報告されている。

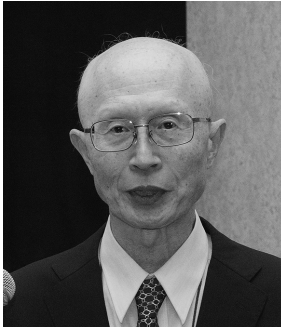
引き続き一般研究助成31件はポスター展示による発表がなされた。各ポスターの前で参加者と熱心な質疑が交わされた。さらにこの後行われた懇親会の時間にもお酒を片手にポスターの前で討論する姿が見られて、ポスター発表内容について十分に議論されたようであった。一般助成研究の研究結果は本報告集ではページ数の関係で要約のみを掲載した。

懇親会には報告会参加者のほとんどが参加した。まずは下田 親 評議員（大阪市立大学名誉教授）の挨拶があり、次いで土屋英子 評議員（広島大学名誉教授）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、また本年3月で設置期間が終了した大阪大学寄付講座の教員および本年10月に開設する筑波大学寄付講座の教員からの挨拶などもあって、異なる分野の研究者の間で賑やかな交換が見られた。今回の報告会および懇親会にも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ます。参加研究者の間で共同研究の話がまとまった、などの声も聞かれました。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12回助成研究報告会は平成30年6月8日(金)に同じ会場で開催致します。以下に報告会、ポスター展示、懇親会の模様の一部を写真で紹介する。

(文) 横田 明

RESEARCH COMMUNICATIONS



開会挨拶  
中濱 一雄 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



山岡 裕一 氏



羽部 浩 氏



津田 雅孝 氏



常田 聡 氏



金子 嘉信 氏

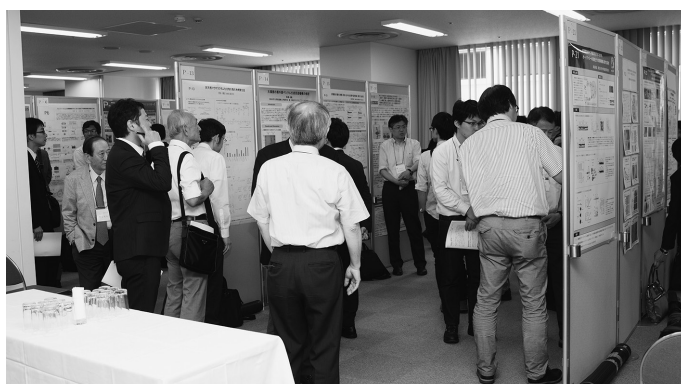
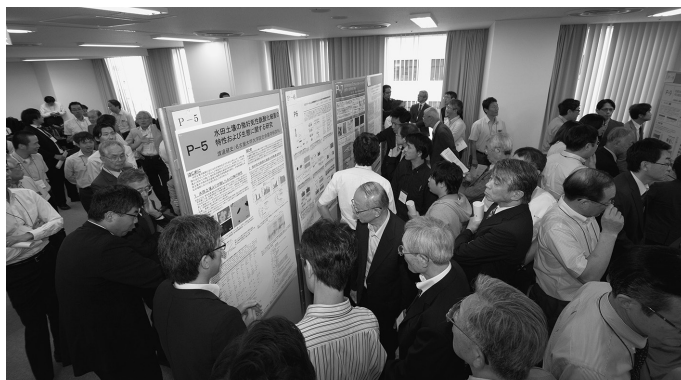


司会  
樽井 直樹 常務理事



講演会

RESEARCH COMMUNICATIONS



ポスター発表



挨拶 下田 親 評議員



乾杯 土屋 英子 評議員



懇親会





# 平成27年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成27年 4 月～平成29年 3 月



# 不完全サビキンおよび内生型サビキンの系統分類学的所属の決定 ならびに生活環進化の解明のための情報基盤構築

山 岡 裕 一

筑波大学生命環境系

〒305-8572 つくば市天王台1-1-1

## Taxonomic Determination of Anamorphic and Endocyclic Species of Rust Fungi and Construction of Foundations for Solving the Evolution of Life Cycles

Yuichi Yamaoka

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8572, Japan

Molecular phylogenetic analysis of the nuclear small subunit (SSU), the nuclear large subunit (LSU) and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of rDNA were conducted to determine the taxonomic treatments of anamorphic species and endocyclic species of rust fungi (Pucciniales). Furthermore, these molecular data were catalogued for future studies on life cycles and evolution of rust fungi. Among the anamorphic and endocyclic species, twelve species of *Aecidium*, four species of *Uredo* and two species of *Endophyllum* were included in Pucciniaceae s.l. These species may need to be transferred to *Puccinia* or other related genera. *Caecoma tsukubaense*, *Uredo daphnicola* and *U. fagarae* were contained in the same clade as *Chrysomyxa*, *Melampsora* and *Coleosporium*, respectively. On the other hand, three species of *Aecidium*, four species of *Uredo* and *Monosporidium machili* were included neither in Pucciniaceae s.l. nor in the same clades with a particular genus. Within Pucciniaceae s.l., macrocyclic heteroecious rust species parasitizing Cyperaceae as uredinial and telial hosts created a well-supported clade, while the ones parasitizing Poaceae were included in other clades. This is useful information to explore alternate host plants of rust fungi with unknown or incomplete life cycles. Two species of *Endophyllum* examined in the present study appear to be related to the different macrocyclic species of *Puccinia*. Species of *Endophyllum* appear to be derived from *Puccinia* or allied genera.

Key words: *Aecidium*, *Endophyllum*, molecular phylogeny, Pucciniales, *Uredo*

### 緒 言

サビキンは担子菌類サビキン目 (Pucciniales) に属する植物の絶対寄生菌で、世界で14科166属約7,798種が存在するとされている (Kirk *et al.*, 2008)。シダ類 (ヒ

カゲノカズラ植物・シダ植物)、裸子植物、被子植物に寄生し、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、ナシ、リンゴ、キク、マツ、ユーカリなどの作物や樹木に寄生し経済的に深刻な被害を引起すものもある。

サビキンは、1種が最大で4つの形態的、機能的に異なる胞子世代と5種類の胞子 (精子、さび胞子、夏胞子、冬胞子、担子胞子) を形成する多型性の菌類である。また生活環を全うするのに系統的に関係の遠い2種類の植物 (精子・さび胞子世代宿主と夏胞子・冬胞子世代宿主) を必要とする異種寄生種と1種の植物で全うできる同種寄生種が存在するなど、その生活環は複雑で生活環が不明な種も多数存在する。

サビキンは有性生殖形態 (テレオモルフ) の冬胞子世代の形態に重点を置いて分類されているが、精子・さび胞子世代、あるいは夏胞子世代しか発見されていない種

E-mail: yamaoka.yuichi.gp@u.tsukuba.ac.jp

共同研究者: 岡根 泉 (筑波大学生命環境系),  
小野 義隆 (茨城大学教育学部),  
細矢 剛 (国立科学博物館),  
升屋 勇人 (森林総合研究所東北支所),  
安藤 裕萌 (筑波大学生命環境科学研究科,  
現 森林総合研究所東北支所),  
藤森 祥平 (筑波大学生命環境科学研究科),  
鈴木 浩之 (筑波大学生命環境科学研究科),  
糸澤 千尋 (筑波大学生命環境科学研究科)

は無性生殖形態（アナモルフ）種の不完全サビキンとして扱われている。Cummins & Hiratsuka (2003) は、胞子堆構造と胞子形態で特徴付けられるアナモルフ属として 13 属をあげている。例えば、*Aecidium* 属は、護膜が発達したカップ型の胞子堆を形成し、疣状突起で覆われた胞子を介在細胞とともに鎖生する。一方、*Caecoma* 属は、胞子堆の境界部に護膜等の構造を持たず、疣状突起で覆われた胞子を介在細胞とともに鎖生する。*Uredo* 属は、胞子堆の境界部に護膜等の構造を持たず（胞子堆内に糸状体を伴うことはある）、刺状の突起で覆われた胞子を柄生する。ただし、機能的には夏胞子世代であるために、胞子の機能を重視する観点から、形態的には *Caecoma* 型の胞子堆を形成する種が *Uredo* 属菌として記載されていることもある。

これらの不完全サビキンは、異種寄生性のテレオモルフ種の精子・さび胞子世代であることが多く、それが証明されると適切なテレオモルフ種の名前が与えられてきた。例えば、*Aecidium* 属菌は、*Puccinia* 属と *Uromyces* 属の精子・さび胞子世代であることが多いが、*Ochropora* 属や *Tranzschelia* 属であることもある。一方、不完全サビキンの中には、有性生殖を放棄してさび胞子世代あるいは夏胞子世代のみで生活していると考えられる種も存在する。この様に、サビキンの複雑で多様な生活環と異なる胞子世代の生活環上の連続を証明することの難しさから、同一サビキン種を胞子世代ごとに命名するという複数命名法が長年にわたり正当な方法として行われてきた。しかし、同一種が同時に複数の正式名を持つという問題が指摘され、2011 年にメルボルンで開催された国際植物会議において“一菌種一名 (One fungus, one name)” の考え方に基づいて新たな国際藻類・菌類・植物命名規約が導入された (岡田, 2011)。この命名規約に従うと、アナモルフ種の系統関係を明らかにし、正式な所属を決定することが必要になる。一方、不完全サビキン属は系統的に多様な集団であることは明白であり、形態的特徴と分子系統情報に基づいてそれぞれの不完全サビキン属に分類されている種を系統分類学的に整理することが喫緊の課題である。

精子・さび胞子世代のみで命名された不完全サビキンのほとんどは、異種寄生種の精子・さび胞子世代であることが予想される。そのため、異種寄生性生活環を証明し冬胞子世代を見つけ出すために、野外観察と実験的接種試験が行われてきた (例えば、Ono, 1983; Okane *et al.*, 2013)。異なる胞子世代の生活環上の連続性は従前の研究成果に基づいて推定し、異なる 2 種類の植物上に形成されたさび胞子と冬胞子から生じた担子胞子を交差接種して確かめることになる (被接種植物や接種胞子の状態によっては一方の接種で済ませなければならないこともある)。一方、それまで研究がなされていなかっ

たサビキンや植物が対象になる場合には、継続的な野外観察を通して不完全サビキンが生じていた植物の周辺を探索し、夏胞子・冬胞子世代だけを形成している植物を見出し、その健全な植物にさび胞子を接種することになる。あるいは逆に、夏胞子・冬胞子世代だけを形成していた植物から得た冬胞子を発芽させて (多くの場合越冬後) 得た担子胞子を精子・さび胞子世代を形成していた健全植物に接種することになる。それぞれの実験的接種試験で、被接種植物に胞子堆が形成されれば異種寄生性が証明されたことになる。異種寄生性解明のための宿主探しは、専門家の経験と根気に頼る必要があるが、それでも候補が見つからない場合も多い。

しかし、近年、分子系統解析法をサビキン研究に容易、迅速かつ安価に適用できるようになった。そのため、不完全サビキンのみならず精子・さび胞子世代が不明なテレオモルフ・サビキン種の DNA 塩基配列情報をデータベース化し比較研究に提供することによって、多くのサビキンのテレオモルフ-アナモルフ関係を推定できるようになった。この分子系統研究による推定に基づくことによって、実験的交差接種試験による異種寄生性生活環の実証が効率的かつ正確に実行できることが期待される。

生活環を短縮し、冬胞子世代のみを有する短世代型サビキンのうち、冬胞子世代の胞子形態が長世代種のさび胞子と同様の種を内生型サビキン(内生種)と呼ぶ。内生種は、形態的特徴や宿主植物、病徴などから、その種の由来となった祖先テレオモルフ種が推定されていた。しかし、2011 年のメルボルン規約制定以前は、系統関係の有無にかかわらずテレオモルフの形態に重点を置いて分類していたため、これまでは別の属に、例えば、*Puccinia* 種由来のさび胞子様冬胞子を形成するサビキンは *Endophyllum* に分類され、*Cronartium* 種由来のさび胞子様冬胞子を形成するサビキンは *Endocronartium* に分類されることが普通であった (Cummins & Hiratsuka, 2003)。“一菌種一名 (One fungus, one name)” は必然的に生活環の類縁性だけではなく系統的類縁性をも考慮に入れることを要請するので、内生種の分類も系統関係から研究する必要がある。

サビキンの分子系統解析に関しては、Maier *et al.* (2003), Wingfield *et al.* (2004), Aime (2006), McTaggart *et al.* (2015), Beenken (2017) 等により、18S および 28S rDNA, ITS 領域,  $\beta$ -チューブリン遺伝子などを用いた研究が行われ、サビキンの科や属・種の系統的関係が次第に明らかになってきた。例えば、Aime (2006) は、18S および 28S rDNA を用い、広範囲にわたるサビキン属の分子系統解析を行った。その結果、Cummins & Hiratsuka (2003) が “Illustrated genera of rust fungi” 第 3 版の中で示した 13 科のうち 8 科は系統群として支持されたものの、残りの科についてはそれまで考えられていた系統

関係とは異なることを明らかにした。その後、Aime はデータを追加して解析を進め (<https://www.plantmanagementnetwork.org/infocenter/topic/soybeanrust/2009/presentations/Aime.pdf>, 2017年5月26日現在), Pucciniaceae, Phakopsoraceae, Raveneliaceae, Pileolariaceae, Phragmidiaceae, Coleosporiaceae, Cronartiaceae, Melampsoraceae, Mikronegeriaceae の9科を認めている。また、*Gymnosporangium*, *Phakopsora* のようにこれまで所属していた科から大きく離れた属や、分割された属などの存在も明らかにされた。Beenken(2017)は、同様に18Sおよび28S rDNAを用いた解析を行い、PucciniaceaeからSphaerophragmiaceaeを分けることを提案した。この様にサビキン目の系統関係について、次々に新たな知見が加えられているが、未だ系統関係が不明確な菌群も残されており、さらにデータを収集し解析を進める必要がある。

日本では約800種のサビキンが報告されているが、そのうち、不完全サビキンが約120種、生活環が不明な種が約200種存在する(Hiratsuka *et al.*, 1992)。この様に日本国内だけでも対応すべき種が多く存在する。そこで本研究は、日本産の不完全サビキンおよび内生型サビキンを中心に分子系統解析を行い、その系統分類学的所属を決定することを目的とした。また、これらの分子情報をカタログ化し、今後の異種寄生種の生活環解明、生活環の進化に関する研究の情報ソースを構築することも目的として研究を進めた。

## 実験方法

### 供試材料

筑波大学植物寄生菌学研究室、茨城大学教育学部、国立科学博物館等が所蔵するサビキンの標本、ならびに採集調査で得た標本の中から、不完全サビキン (*Aecidium*, *Caecoma*, *Uredo* 属菌) および内生型サビキン (*Endophyllum*, *Endocronartium*, *Monosporidium* 属菌), サビキン目の各科を代表する菌群、ならびにPucciniaceaeを中心に精子・さび胞子世代が不明な種や異種寄生種に加え、様々な生活環を有する種の標本、計925標本を供試した。

### DNA抽出, PCR増幅およびシーケンシング

標本上の胞子堆を火炎滅菌したメスを用いて掻き取り、50 $\mu$ lのDNA extraction buffer [10mM Tris-HCl pH. 8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate, 0.01% Proteinase K] (Uzuhashi *et al.*, 2008) に懸濁した。懸濁した胞子堆は、ホモジナイザーペッスルで磨り潰し、37°Cで1時間、95°Cで10分間インキュベートし、高速遠心分離 (15,000 $\times$ gで2分間) を行った後、上清を回収することでDNA抽出物を得た。

18S rDNA (SSU), ITS領域, ITS2-D1/D2, および28S rDNA (LSU) の部分塩基配列を既存のプライマーおよび本研究で新たに設計したサビキン特異的プライマー (Table 1) を用いて polymerase chain reaction (PCR) によって増幅させた。PCR反応は、初期熱変性を95°Cで5分行い、94°Cで30秒、各プライマーセットの最適アニリング温度 (Table 1) で30秒、72°Cで60秒を40サイクル繰り返し、最終伸長反応を72°Cで8分行った。PCR産物は、エチジウムブロマイドを含めた1%アガロースゲル電気泳動によって増幅を確認し、illustra ExoProStar (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) をマニュアルに従って使用してPCR産物の精製を行った。シーケンシングは、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems) をマニュアルに従って使用し、ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって塩基配列を解読した。得られた塩基配列データは、BioEdit ver.7.1.9 (Hall, 1999) でアセンブルを行った。

### 分子系統解析

塩基配列が決定できた不完全サビキン3属35種の標本に加え、Cummins & Hiratsuka (2003) の提唱する13科のうち12科30属118種の標本から得られたシーケンスデータを分子系統解析に供試した (Table 2)。また、GenBankに登録されている塩基配列を取得し (Table 3), 合わせて各データセットを作成した。各データセットは、

Table 1 Primers and optimised annealing temperature for each primer set

Region	Primer name	5' - 3'	Annealing temperature	Reference
18S rDNA	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	53 °C for NS1 / NS3.5rust-R	White <i>et al.</i> (1990)
	NS3.5rust-R	AGTTTACTGTTAAGACTACAACGG		This study
	NS3.5rust-F	TCAGTTGGGGGCATTTGTATTAC	52 °C for NS3.5rust-F / Rust18S-R	This study
ITS	Rust18S-R	ACCTTGTACGACTTTACTTC	54 °C for RustITS-F / RustITS-R	Aime (2006)
	RustITS-F	GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT		This study
ITS2-D1/D2	RustITS-R	TCCCACCTGATTTGAGGTCT	53 °C for Rust2inv / NL4	This study
	Rust2inv	GATGAAGAACACAGTGAAA		Aime (2006)
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell (1993)	
LSU	Rust28S-F	AGACCTCAAATCAGGTGGGA	54 °C for Rust28S-F / Rust28S-R	This study
	Rust28S-R	GCCCACGTTCAATTAAGAAACA		This study





Table 2 continued

Continued.

Rust Family	Rust Species	Specimen No.	Spore State	Host Plant	Locality of collection	DNA			
						SSU	LSU	ITS	ITS2-D1/D2
	<i>Puccinia majanthemi</i> Dietel	TSH-R25619	III	<i>Maianthemum dilatatum</i> (A.W.Wood) A.Nelson & J.F.Macbr.	Kamiina, Nagano		⊙	⊙	
	<i>Puccinia malvacearum</i> Bertero ex Mont.	TSH-R25623	III	<i>Althaea rosea</i> (L.) Cav.	Sapporo, Hokkaido		⊙	⊙	
	<i>Puccinia microspora</i> Dietel	TSH-R25594	II, III	<i>Phacelus latifolius</i> (Steud.) Ohwi	Miura, Kanagawa	○	⊙	⊙	
	<i>Puccinia miscanthi</i> Miura	TSH-R25586	I	<i>Plantago asiatica</i> L.	Bando, Ibaraki		⊙	⊙	
		TSH-R25583	I	<i>P. asiatica</i>	Jyoso, Ibaraki		○	○	
		TSH-R25571	II	<i>Miscanthus sacchariflorus</i> (Maxim.) Benth.	Toride, Ibaraki				○
	<i>Puccinia okutamaensis</i> S. Ito	TSH-R25584	I	<i>Clematis terniflora</i> DC.	Jyoso, Ibaraki		○	○	
		TSH-R25585	I	<i>C. terniflora</i>	Shimotsuma, Ibaraki		○	○	
		TSH-R11676	III	<i>P. australis</i>	Tsuchiura, Ibaraki		⊙	⊙	
	<i>Puccinia phaeospora</i> Kakish. & Y. Ono	TSH-R11825	II	<i>Carex aphanolepis</i> Franch. & Sav.	Toride, Ibaraki		⊙	⊙	⊙
		TSH-R10811	II, III	<i>Carex japonica</i> Thunb.	Bando, Ibaraki		⊙	⊙	⊙
	<i>Puccinia phragmitis</i> (Schumach.) Tul.	TSH-R27006	0, 1	<i>R. acetosa</i>	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
		TSH-R25478	0, 1	<i>R. acetosa</i>	Inashiki, Ibaraki	○	○	○	○
		TSH-R25587	II	<i>P. australis</i>	Bando, Ibaraki		○	○	○
	<i>Puccinia polygoni-amphibii</i> Pers.	TSH-R25507	I	<i>Geranium thunbergii</i> Siebold ex Lindl. & Paxton	Kitabaraki, Ibaraki				⊙
	<i>Puccinia recondita</i> Roberge ex Desm.	TSH-R25480	0, 1	<i>C. terniflora</i>	Chikusei, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
		TSH-R25482	0, 1	<i>C. terniflora</i>	Jyoso, Ibaraki	○	○	○	
		TSH-R25572	II, III	<i>Elymus tsukushiensis</i> Honda var. <i>transiens</i> (Hack.) Osada	Toride, Ibaraki				⊙
	<i>Puccinia seihoensis</i> Hirats. f. & S. Sato	TSH-R6838	0, 1	<i>Pertya scandens</i> (Thunb.) Sch.Bip.	Hitachinaka, Ibaraki				⊙
	<i>Puccinia suzutate</i> Kakish. & S. Sato	TSH-R25510	0, 1	<i>Hydrangea hirta</i> (Thunb.) Siebold & Zucc.	Kitabaraki, Ibaraki		⊙	⊙	
		IBA-10956	0, 1	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser. f. <i>macrophylla</i>	Hirono, Futaba, Fukushima	○	○	○	○
	<i>Puccinia cf. suzutate</i> Kakish. & S. Sato	IBA-10955	II, III	<i>Sasa borealis</i> (Hack.) Makino & Shibata	Hirono, Futaba, Fukushima	○	○	○	⊙
	<i>Puccinia tanacetii</i> DC. var. <i>tanacetii</i>	TSH-R25577	III	<i>C. morfolium</i>	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Puccinia triticina</i> Erikss.	TSH-R25575	II, III	<i>Triticum aestivum</i> L.	Ushiku, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Puccinia velutina</i> (Schumach.) S. Sato	TSH-R11612	I	<i>Elaeagnus glabra</i> Thunb.	Kashima, Ibaraki				⊙
	<i>Puccinia violae</i> (Schumach.) DC	TSH-R25568	0, 1	<i>Viola grypoceras</i> A.Gray var. <i>grypoceras</i>	Bando, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Puccinia xanthii</i> Schwein.	TSH-R25588	III	<i>Xanthium occidentale</i> Bertol.	Bando, Ibaraki		⊙	⊙	
	<i>Puccinia zoyisae</i> Dietel	TSH-R6905	II, III	<i>Zoysia japonica</i> Steud.	Hitachinaka, Ibaraki		⊙	⊙	
	<i>Puccinia</i> sp. 1 (= <i>P. dioicae</i> var. <i>micropuncta</i> ?)	TSH-R11893	III	<i>C. maackii</i>	Bando, Ibaraki		○	○	
	<i>Puccinia</i> sp. 2 (= <i>P. dioicae</i> var. <i>micropuncta</i> ?)	TSH-R25570	III	<i>C. maackii</i>	Toride, Ibaraki		○	○	
		TSH-R7990	0, 1	<i>A. indica</i> var. <i>maximoviczii</i>	Tsukuba, Ibaraki		⊙	⊙	
		TSH-R9957	II, III	<i>Carex arenicola</i> F.Schmidt	Hitachinaka, Ibaraki				○
		TSH-R7996	II, III	<i>Carex lithophila</i> Turcz.	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	○	
		TSH-R7997	0, 1	<i>A. indica</i> var. <i>maximoviczii</i>	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Puccinia</i> sp. 3	TSH-R11936	II, III	<i>Carex candolleana</i> H.Lév. & Vaniot	Tsukuba, Ibaraki				○
		TSH-R11946	II, III	<i>C. candolleana</i>	Ushiku, Ibaraki				○
	<i>Puccinia</i> sp. 4	TSH-R11218	II, III	<i>Carex</i> sp.	Bando, Ibaraki		○	○	⊙
	<i>Puccinia</i> sp. 5	TSH-R25514	II, III	<i>Carex fernaldiana</i> H.Lév. & Vaniot	Kitabaraki, Ibaraki		○	○	⊙
	<i>Puccinia</i> sp. 6	TSH-R25516	II	<i>Cirsium oligophyllum</i> (Franch. & Sav.) Matsum.?	Kitabaraki, Ibaraki		○	○	⊙
	<i>Puccinia caricis-fediae</i> Y. Harada	TSH-R25626	0, 1	<i>Lysimachia japonica</i> Thunb.	Kawakami, Minamisaku, Nagano		○	○	⊙
	<i>Puccinia kuehnii</i> (W. Krüger) E.J. Butler	Th04	II	<i>Saccharum arundinaceum</i> Retz.	International Project Research Station, Thailand	⊙	⊙	⊙	⊙
	<i>Stereostromum corticioides</i> (Berk. & Broome) H. Magn.	TSH-R9960	II, III	<i>Pleioblastus simonii</i> (Carrière) Nakai	Hitachinaka, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Uromyces commelinae</i> Cooke	TSH-R7863	II	<i>Commelina communis</i> L.	Kasama, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Uromyces coronatus</i> Dietel	TSH-R25589	II	<i>Zizania latifolia</i> (Griseb.) Turcz. ex Stapf	Bando, Ibaraki		⊙	⊙	
	<i>Uromyces euphorbiae</i> Cooke & Peck	TSH-R6895	II	<i>Chamaesyce maculata</i> (L.) Small	Hitachinaka, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Uromyces juncei</i> Tul.	TSH-R25578	III	<i>Juncus tenuis</i> Willd.	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	⊙
	<i>Uromyces urdebeckiae</i> Arthur & Holw.	TSH-R25601	III	<i>Solidago virgaurea</i> L. subsp. <i>asiatica</i> (Nakai ex H.Hara) Kitam. ex H.Hara	Kawakami, Minamisaku, Nagano		⊙	⊙	
Raveneliaceae	<i>Kernkampella breyniae</i> (Syd. & P. Syd.) Rajendren	IBA-10655	II	<i>Breynia vitis-idaea</i> (Burm.f.) C.E.C.Fisch.	Taketomi, Yacyama, Okinawa	⊙	⊙		
	<i>Nyssospora cedrelae</i> (Hori) Tranzschel	TSH-R11239	II, III	<i>Toona sinensis</i> (A.Juss.) M.Roem.	Tsukuba, Ibaraki	⊙	⊙	⊙	
	<i>Ravenelia japonica</i> Dietel & P. Syd.	TSH-R7841	II, III	<i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	Kasama, Ibaraki	⊙	⊙	○	
Uropyxidaceae	<i>Leucotelium pruni-persicae</i> (Hori) Tranzschel	TSH-R25593	II	<i>Armeniaca mume</i> (Siebold & Zucc.) de Vriese	Odawara, Kanagawa	⊙	⊙	○	
	<i>Tranzschelia discolor</i> (Fuckel) Tranzschel & M.A. Litv.	TSH-R25592	II	<i>Amygdalus persica</i> L.	Kure, Hiroshima	⊙	⊙	○	
	<i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> (Pers.) Dietel	TSH-R11440	III	<i>Padus buergeriana</i> (Miq.) T.T.Yü & T.C.Ku	Ushiku, Ibaraki	⊙	⊙	○	
Platyglloeaceae (Platyglloeales)	<i>Herpobasidium filicinum</i> (Rostr.) Lind.	IBA-10957		<i>Demstaedtia wilfordii</i> (T.Moore) H.Christ ex C.Chr.	Minamitsuru, Yamanashi	⊙	⊙		

⊙ : DNA sequence data were used for phylogenetic analyses.

○ : DNA sequence data were obtained but not included in the phylogenetic analyses shown in the Figures 1 and 2.

? : Unconfirmed identification

オンライン上の MAFFT 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Katoh & Standly, 2013) で Q-INS-i オプションによってアライメントを行った。アライメント後のデータセットは、BioEdit ver. 7.1.9 (Hall, 1999) で 5' 末端と 3' 末端を揃え、ギャップを含むサイトを削除したデータセットを作成し、分子系統解析に用いた。

系統解析は、アライメントデータからギャップ挿入サイトを除いたデータセットについて、raxmlGUI ver.1.2 (Silvestro & Michalak, 2012 ; RAxML ver.8 を実装) を用

いて最尤法 [塩基置換モデルとして General Time Reversible model+Gamma distribution+Proportion of invariable sites (GTR+G+I) を設定] により行い、各系統枝の再現性はブートストラップ法 (1,000 回反復) により評価した。Outgroup として、Pucciniomycetes の Pucciniales 以外の目に属する *Eocronartium muscicola* (Pers.) Fitzp. (Platyglloeales), *Herpobasidium filicinum* (Rostr.) Lind. (Platyglloeales), *Helicobasidium purpureum* (Tul.) Pat. (Helicobasidiales) を用いた。



Table 3 Sequence data obtained from GenBank used in this study

Family	Species	Specimen No.	GenBank accession no.		
			SSU	LSU	ITS
Anamorph	<i>Aecidium kalanchoe</i> J.R. Hern.	BPI 843633	DQ354524	AY463163*	
	<i>Caeoma torreyae</i> Bonar		AY123284*	AF522183*	
Chaconiaceae	<i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Broome	BPI 843642	DQ354565	DQ354566	
Coleosporiaceae	<i>Chrysomyxa arctostaphyli</i> Dietel	DV29.1	AY123285	AF522163	
	<i>Coleosporium asterum</i> (Dietel) Syd. & P. Syd.	BPI 863448	DQ354558	DQ354559	
Cronartiaceae	<i>Cronartium ribicola</i> J.C. Fisch.	BPI 871660	M94338*	DQ354560	
	<i>Endocronartium harknessii</i> (J.P. Moore) Y. Hirats.	CFB22250	AY665785	AY700193	
Melampsoraceae	<i>Melampsora euphorbiae</i> (Ficinus & C. Schub.) Castagne	BPI 871135	AY123294*	DQ351722	
Mikronegeriaceae	<i>Mikronegeria fuchsiae</i> P.E. Crane & R.S. Peterson	PDD 101517	KJ746826	KJ716350	
	<i>Phakopsora asterum</i> (Dietel) Syd. & P. Syd.	BPI 863563	DQ354538	DQ354539	
Phakopsoraceae	<i>Phakopsora annoniae-sylvaticae</i> Beenken	PUR 87311	KF528038	KF528008	
	<i>Phakopsora cherimoliae</i> (Lagerh.) Cummins	RB 3096 in ZT	KF528040	KF528011	
Phragmidiaceae	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> Syd. & P. Syd.	BPI 871755	DQ354536	DQ354537	
	<i>Frommeella mexicana</i> (Mains) J.W. McCain & J.F. Hennen	BPI 843392	DQ354552	DQ354553	
Pileolariaceae	<i>Phragmidium violaceum</i> (Schultz) G. Winter	PDD 99246	KJ746822	KJ716351	
	<i>Trachyspora intrusa</i> (Grev.) Arthur	BPI 843828	DQ354549	DQ354550	
Pileolariaceae	<i>Endoraecium acaciae</i> Hodges & D.E. Gardner	BPI 871098	DQ323917	DQ323916	
	<i>Endoraecium koae</i> (Arthur) M. Scholler & Aime	BPI 871071	DQ323919	DQ323918	
Pucciniaceae	<i>Pileolaria toxicodendri</i> (Berk. & Ravenel) Arthur	AFTOL-ID 988	DQ092921	AY745698	
	<i>Uromycladium futsiporum</i> (Cooke & Massee) Savile	BRIP 27608	DQ354548	DQ323921	
Pucciniaceae	<i>Uromycladium tepperianum</i> (Sacc.) McAlpine	BPI871523	DQ323923	DQ323922	
	<i>Naohidemycus vaccinii</i> (Jorst.) S. Sato, Katsuya & Y. Hirats.	BPI 871754	DQ354562	DQ354563	
Pucciniaceae	<i>Pucciniastrum epilobii</i> (Pers.) G.H. Oth	ECS352 & ECS353	AY123303	AF522178	
	<i>Pucciniastrum goeppertianum</i> (J.G. Kühn) Kleb.	TDB1497	AY123305	AF522180	
Pucciniaceae	<i>Pucciniastrum pustulatum</i> Dietel	PDD 101572	KJ746816	KJ698631	
	<i>Cumminsia mirabilissima</i> (Peck) Nannf.	BPI 871101	DQ354530	DQ354531	
Pucciniaceae	<i>Gymnosporangium clavipes</i> Cooke & Peck	BPI 871102	DQ354546	DQ354545	
	<i>Puccinia artemisiae-keiskeanae</i> Miura	TSH-R4184 (IBA3256)		AB190894	AB188132
Pucciniaceae	<i>Puccinia caricis</i> J. Schröt.	BPI 871515	DQ354515	DQ354514	
	<i>Puccinia caricis-stipatae</i> Y. Harada	HHUF10451*		AB190887	AB188137
Pucciniaceae	<i>Puccinia convolvuli</i> (Pers.) Castagne	BPI 871465	DQ354511	DQ354512	
	<i>Puccinia coronata</i> Corda	BPI 84300	DQ354525	DQ354526	
Pucciniaceae	<i>Puccinia dioicae</i> Magnus var. <i>micropuncta</i> Y. Ono	TSH-R16537 (IBA2404)		AB190890	AB188130
	<i>Puccinia ferruginosa</i> P. Syd. & Syd.	TSH-R3092		AB190898	AB188127
Pucciniaceae	<i>Puccinia hemerocallidis</i> Thüm.	BPI 843967	DQ354518	DQ354519	
	<i>Puccinia physalidis</i> Peck	BPI 844306	DQ354523	DQ354522	
Pucciniaceae	<i>Puccinia podophylli</i> Schwein.	BPI 842277	DQ354544	DQ354543	
	<i>Puccinia smilacis</i> Schwein.	BPI 871784	DQ354532	DQ354533	
Pucciniaceae	<i>Puccinia violae</i> (Schumach.) DC.	BPI 842321	DQ354508	DQ354509	
	<i>Uromyces appendiculatus</i> (Pers.) Link	SBML & VL	DQ354510	AF522182*	
Raveneliaceae	<i>Uromyces ari-triphylli</i> (Schwein.) Seeler	BPI 871111	DQ354528	DQ354529	
	<i>Uromyces viciae-fabae</i> (Pers.) J. Schröt.	PDD 101522	KJ746821	KJ716343	
Raveneliaceae	<i>Diorchidium woodii</i> Kalchr. & Cooke	ZT Myc 582	KM217370	KM217352	
	<i>Sphenospora kevorkianii</i> Linder	BPI 863558	DQ354520	DQ354521	
Sphaerophragmiaceae	<i>Sphenospora smilacina</i> Syd.	ZT Myc 44038	KM217371	KM217354	
	<i>Dasyospora ferruginea</i> Beenken	ZT Myc 3404	JF263499	JF263467	
Sphaerophragmiaceae	<i>Dasyospora gregaria</i> (Kunze) Henn.	ZT Myc 3397	JF263502	JF263477	
	<i>Dasyospora segregaria</i> Beenken	PMA MP4941	JF263507	JF263488	
Sphaerophragmiaceae	<i>Puccorchidium polyalthiae</i> (Petch) Beenken	RB-251 (in ZT)	JF263509	JF263493	
	<i>Puccorchidium popowiae</i> (Cooke) Beenken & A.R.Wood	ZT Myc 1976	JF263511	JF263495	
Uropyxidaceae	<i>Sphenorchidium deightonii</i> (Syd.) Beenken	PC 0096724	KM217369	KM217351	
	<i>Macropyxis fraxini</i> (Kom.) Azbukina	ZT Myc 56551	KP858144	KP858145	
Uropyxidaceae	<i>Porotenus biporus</i> J.F. Hennen & Sotão	ZT Myc 3414	JF263510	JF263490	
	<i>Eocronartium muscicola</i> (Pers.) Fitzp.		DQ241438	AF014825	
Eocronartiaceae (Platyglouales)	<i>Helicobasidium purpureum</i> (Tul.) Pat.	TUB 011542	D85648	AY254180	

## 結果および考察

## 18S (SSU) および 28S rDNA (LSU) 解析結果

供試したサビキン 12 科 30 属 118 種および不完全サビキン 3 属 35 種の標本のうち、SSU および LSU の配列解析に成功したサビキン 123 標本と Outgroup として *H. filicinum* (IBA-10957) に由来するシーケンスデータ、および Genbank より取得した Outgroup の 2 データを含む 51 シーケンスデータ、合計 174 シーケンスデータをアライメントし、ギャップ挿入サイトを除いて得られた

2,248 サイト (SSU: 1470; LSU: 778) について最尤法で系統解析した。その結果に基づき構築した系統樹を Fig. 1 に示す。

本解析では、Aime (2006) や Beenken (2017) が使用した SSU および LSU を用いた。これまでに確認されていた Mikronegeriaceae, Cronartiaceae, Coleosporiaceae, Melampsoraceae, Phragmidiaceae, Pucciniaceae s.l., Sphaerophragmiaceae は、明確なクレードを形成した。従来、Phakopsoraceae, Chaconiaceae, Uropyxidaceae, Pileolariaceae, Raveneliaceae に含まれていた菌群はそれぞれ複数のグループに分かれ、系統的に異なる集団が

Pucciniaceae s.l. (Beenken 2017)

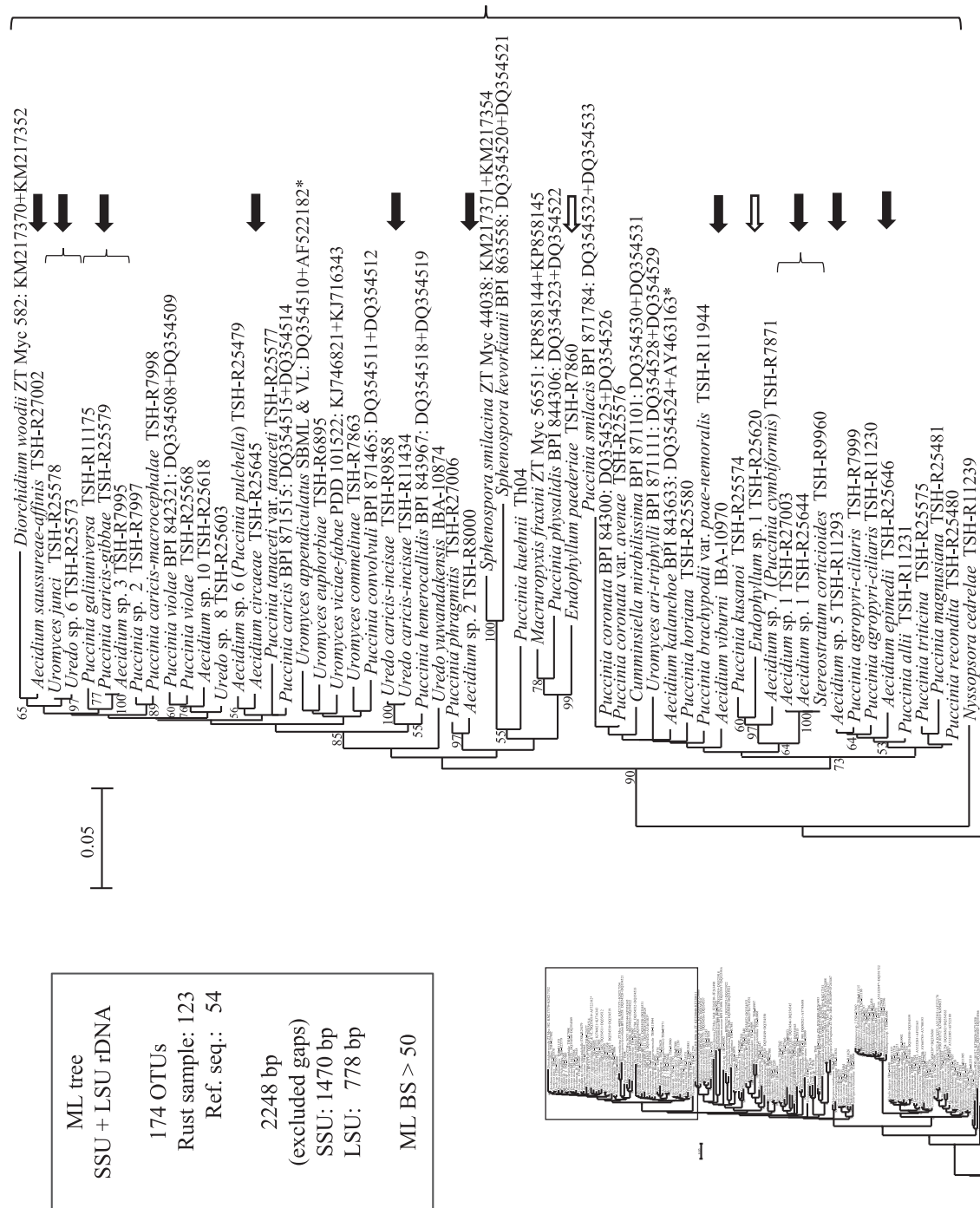


Fig. 1 Maximum likelihood tree based on SSU and LSU rDNA of rust fungi.

Maximum likelihood bootstrap (ML BS) more than 50% were shown as the support values for nodes. Upper (a), middle (b) and lower part (c) of the tree. Black and white arrows indicated anamorphic and endocyclic species, respectively, mentioned in the text.

Continued on the next page.

不完全サビキンおよび内生型サビキンの系統分類学的所属

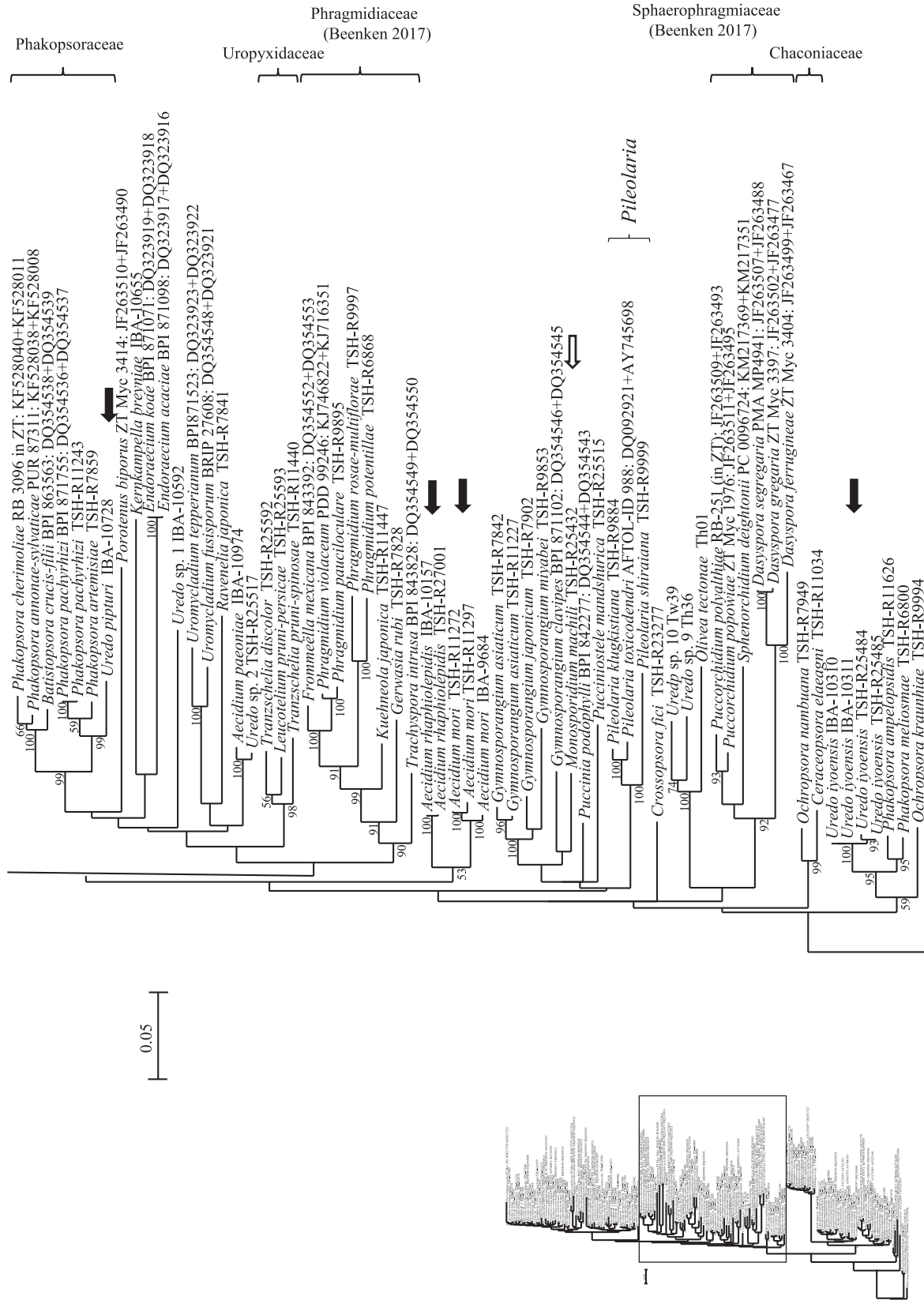


Fig. 1 continued

Continued on the next page.

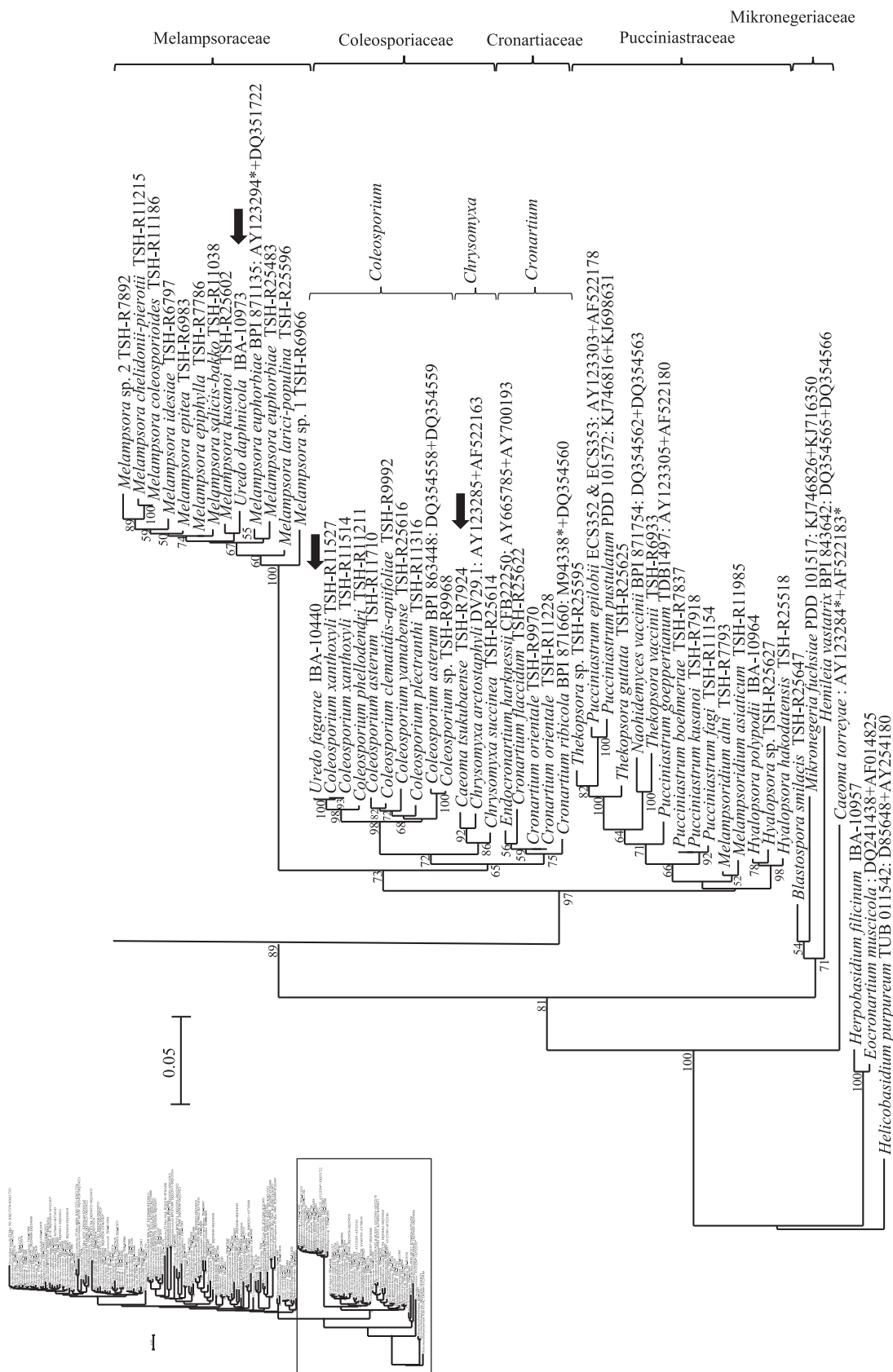


Fig. 1 continued

含まれていたことが分かった。また、Phakopsoraceae, Uropyxidaceae, Chaconiaceae の一部の菌群については、それぞれ高いブートストラップ値で支持されたクレードを形成した。Pucciniastraceae については、クレードは形成されたが、ブートストラップ値は低かった (35%)。系統的な位置づけが不明確な菌群については、今後さらに試料を加え、また異なる遺伝子による解析を行い、検討する必要がある。

#### 特定のクレードに含まれた不完全サビキン

今回 SSU と LSU を用いて解析することができた不完全サビキン *Aecidium* 14 種, *Caeoma* 1 種, *Uredo* 12 種, および内生型サビキン *Endophyllum* 2 種, *Monosporidium* 1 種のうち, *Aecidium epimedii* Henn. & Shirai 他 *Aecidium* 属 11 種, *Uredo caricis-incisae* (Syd. & P. Syd.) S. Ito 他 *Uredo* 属菌 3 種, および *Endophyllum* 2 種は, Pucciniaceae s.l. クレードに含まれた (Fig. 1a)。これらの *Aecidium* 属菌は、同種寄生種の可能性もあるが、*Puccinia*, *Uromyces* または近縁属に属する異種寄生種の精子・さび胞子世代である可能性が高いと考えられる。

一方、SSU と LSU の解析結果より、*Caeoma tsukubaense* P.E. Crane *et al.*, *Uredo daphnicola* Dietel, および *Uredo fagarae* Syd. & P. Syd. は、それぞれ、高いブートストラップ値で支持された *Chrysomyxa* 属, *Melampsora* 属, *Coleosporium* 属のクレードに含まれた (Fig. 1c)。

*Caeoma tsukubaense* は、Crane *et al.* (2005) により筑波山のヤマツツジ上で発見され記載された種である。胞子堆に護膜がなく、表面に疣状突起を有し鎖生する胞子を形成することから *Caeoma* 属に分類された。この形態的特徴と宿主植物がツツジ科であること、ならびに D1/D2 領域による解析結果から、本菌は *Chrysomyxa* 属に属すると予測されていたが (Crane *et al.* 2005)、これまで冬胞子世代は確認されていない。本研究の成果でも本菌は *Chrysomyxa* 属に属することが確認できた。

*Uredo daphnicola* は、ジンチョウゲ科のオニシバリ (*Daphne pseudomezereum* A. Grey) に寄生し、表面が刺状突起で覆われた胞子を柄生し、多数の頭状の糸状体を混在する胞子堆を形成する。この特徴は *Melampsora* 属菌の夏胞子堆に見られる特徴であり、*Melampsora daphnicola* (Dietel) Jørst. とされていたこともあるが、これまで冬胞子世代が発見されていなかったため、*Uredo* 属菌として扱われてきた。本研究の解析結果では、本菌が *Melampsora* 属に属することが確認できた。

*Uredo fagarae* はテリハザンショウ (*Zanthoxylum nitidum* Bunge) に寄生し、胞子堆に護膜がなく、表面に疣状突起を有し鎖生する胞子を形成する *Caeoma* 型の胞子堆を形成するが、夏胞子世代であることから *Uredo* 属

に分類されていた。*Zanthoxylum* 属のサンショウ、カラスザンショウには *Coleosporium xanthoxyli* Dietel & P. Syd. が寄生し、この夏胞子世代と形態的に類似することから、本菌も *Coleosporium* 属菌の夏胞子世代であると予測されていた。本研究の SSU と LSU を用いた系統解析の結果、本菌が *Coleosporium* に属し、*C. xanthoxyli* と極めて近縁であることが示された。

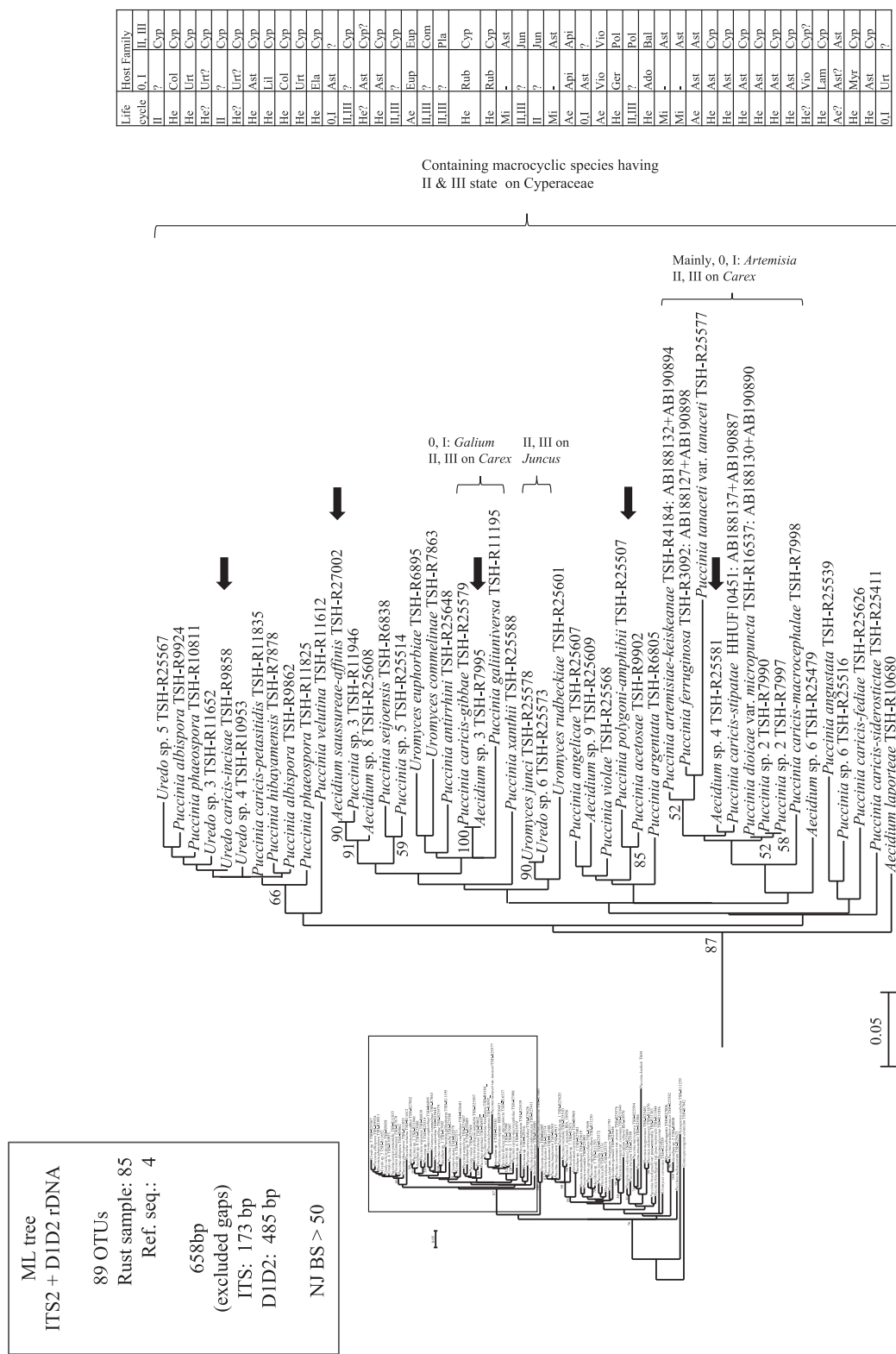
上記 3 種については、それぞれ適切な属に転属する必要があると考える

#### Pucciniaceae s.l. クレードに含まれた不完全サビキン

Pucciniaceae s.l. クレードに含まれることがわかった *Aecidium* 属菌, *Uredo* 属菌については、さらに *Puccinia*, *Uromyces*, *Stereostromatum*, *Endophyllum* の既知種とともに rDNA の ITS2 領域, LSU の D1/D2 領域を用いた分子系統解析を行い、夏胞子・冬胞子世代の探索ならびに系統関係の解析を行った。なお、*Endophyllum* 属菌は、進化の過程で、近縁の長世代種から分化したと考えられているので、近縁と考えられる種との系統関係を明らかにするため、本分子系統解析に加えた。本解析では、85 標本に由来するシーケンスデータ [outgroup として *Nyssospora cedrelae* (TSH-R11239), *Gymnosporangium asiaticum* (TSH-R7842)], および GenBank より取得した 4 シーケンスデータ、合計 89 シーケンスデータをアライメントし、ギャップ挿入サイトを除いて得られた 658 サイト (ITS: 173; D1D2: 485) について最尤法で系統解析した。その結果に基づき構築した系統樹を Fig. 2 に示す。

解析の結果、チャンチンモドキ (*Choerospondias axillaris* (Roxb.) B.L.Burt & A.W.Hill) に寄生する *Aecidium* sp. 1, ヨツバムグラ (*Galium trachyspermum* A.Gray) に寄生する *Aecidium* sp. 3, ヨモギ (*Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* (Nakai) H.Hara) に寄生する *Aecidium* sp. 4, キツネアザミ (*Hemistepta lyrata* Bunge) に寄生する *Aecidium saussureae-affinis* Dietel については、塩基配列がほぼ一致する夏胞子・冬胞子世代を見つけることができた。

Van Der Merwe *et al.* (2007, 2008) は、TEF-1 $\alpha$  遺伝子,  $\beta$ -チューブリン遺伝子を用いて *Puccinia*, *Uromyces* 属菌の系統解析を行った結果、*Puccinia*, *Uromyces* 属は大きく二つのサブクレードに分かれることを報告した。すなわち、イネ科に寄生する異種寄生種とスゲ類などカヤツリグサ科に寄生する異種寄生種は、それぞれ異なるクレードに含まれた。その傾向は、本研究の SSU+LSU, ITS2-D1/D2 領域を用いた系統解析の結果でも確認することができ、特に、カヤツリグサ科に寄生する異種寄生種を含むクレードは、他の集団と明確に分かれることが分かった (Fig. 2a)。



**Fig. 2a** Maximum likelihood tree based on ITS2 and D1/D2 regions of rDNA of Pucciniaceae s.l.

Maximum likelihood bootstrap (ML BS) more than 50% were shown as the support values for nodes. Upper (a) and lower (b) part of the tree.

Life cycle: Ae, Autoecious; He, Heteroecious; Mi, Microcyclic; 0, I, Uredinal and aecial states only; II, III, Uredinal and telial states only; II, Uredinal state only.  
 Host Families: Ado, Adoxaceae; Api, Apiaceae; Ast, Asteraceae; Bal, Balsaminaceae; Ber, Berberidaceae; Col, Colchicaceae; Com, Commelinaceae; Cyp, Cyperaceae; Eup, Euphorbiaceae; Ger, Geraniaceae; Hyd, Hydrangeaceae; Jun, Juncaceae; Lam, Lamiaceae; Lar, Lardizabalaceae; Lil, Liliaceae; Mal, Malvaceae; Myr, Myrsinaceae; Pla, Plantaginaceae; Poa, Poaceae; Pua, Poaceae; Ran, Ranunculaceae; Rub, Rubiaceae; Rus, Rusaceae; Urt, Urticaceae; Vio, Violaceae.

供試した標本のうち、タニタデ (*Circaea erubescens* Franch. & Sav.) に寄生する *A. circaeae* Ces., ムカゴイラクサ (*Laportea bulbifera* (Siebold & Zucc.) Wedd.) に寄生する *A. laporteeae* Henn., クロトウヒレン (*Saussurea sessiliflora* (Koidz.) Kadota) に寄生する *Aecidium* sp. 9, スミレ類 (*Viola* sp.) に寄生する *Aecidium* sp. 6 (*P. pulchella* Y. Ono & Kakish. の精子・さび胞子世代と推測される), ヤハズヒゴタイ (*Saussurea triptera* Maxim.) に寄生する *Aecidium* sp. 8 (*P. ohsawaensis* Kakish. の精子・さび胞子世代と推測される), はカヤツリグサ科のクレードに含まれた (Fig. 2a). イカリソウ (*Epimedium grandiflorum* C. Morren) に寄生する *A. epimedii*, ゴマキ (*Viburnum sieboldii* Miq.) に寄生する *A. viburni* Henn. & Shirai, サクラタデ (*Persicaria macrantha* (Meisn.) Haraldson subsp. *conspicua* (Nakai) Yonek.) に寄生する *Aecidium* sp. 2, ボタンヅル (*Clematis apiifolia* DC.) に寄生する *Aecidium* sp. 5, ミツバアケビ (*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.) に寄生する *Aecidium* sp. 7 (*Puccinia cymbiformis* F. He & Kakish. または *P. nigroconoidea* I. Hino & Katum. の精子・さび胞子世代と推測される) は, イネ科植物に異種寄生する種とともにその他のクレードに入った (Fig. 2b). これらのサビキンの夏胞子・冬胞子世代を特定することはできなかったが, 今後, 異種寄生の相手を, イネ科かカヤツリグサ科に絞り込んで探索することができる。

イネ科またはカヤツリグサ科植物に寄生するテレオモルフ・サビキン種のほとんどは *Puccinia* または *Uromyces* に属することが知られている。カワラスゲ (*Carex incisa* Boott) に寄生する *Uredo caricis-incisae* (Syd. & P. Syd.) S. Ito は, これまで冬胞子世代が発見されておらず, 不完全サビキンとして扱われてきた。本研究の分子系統解析の結果, Pucciniaceae s.l. のカヤツリグサ科を宿主とする集団内に含まれた (Fig. 2a)。ウマスゲ (*Carex idzuroei* Franch. & Sav.) およびアオコウガイゼキショウ (*Juncus papillosus* Franch. & Sav.) に寄生するサビキンの報告はこれまでにない。夏胞子世代しか発見されていないが, これらも Pucciniaceae s.l. のカヤツリグサ科を宿主とする集団内に含まれた (Fig. 2a)。これらの種は冬胞子世代を有する可能性は十分あり, 今後探索する必要がある。

Pucciniaceae s.l. の中では, 系統解析の結果近縁と考えられる種は, 系統的に近縁の宿主植物を利用している傾向が見られた。例えば, ヨモギ属 (*Artemisia*) 植物に寄生する種は, 近縁であることが示唆された (Fig. 2a)。ヨモギ属植物を精子・さび胞子世代宿主とする種として, 日本では夏胞子・冬胞子世代宿主をオオカワズスゲ (*Carex stipata* Muhlenb.) とする *Puccinia cari-*

*cis-stipatae* Y. Harada (Harada, 1986), ハマアオスゲ (*C. breviculmis* R. Br. subsp. *fibrillosa* (Franch. & Savat.) T. Koyama) とする *P. dioicae* Magnus var. *micropuncta* Y. Ono (Ono, 1983), コウボウムギ (*C. kobomugi* Ohwi), コウボウシバ (*C. pumila* Thunb.) とする *P. caricis-macrocephalae* Dietel (Hiratsuka, 1936) が知られている。著者と共同研究者は, 茨城県内のサビキン菌類相調査を実施する中で, ヤガミスゲ (*C. maackii* Maxim.), アサマスゲ (*C. lithophila* Turcz.) およびクロカワズスゲ (*C. arenicola* F.Schmidt) 上にヨモギを精子・さび胞子世代宿主とする *Puccinia* 属菌が存在することを明らかにした (未発表)。ITS2 と D1/D2 を用いた系統解析結果により, これらのヨモギ属とスゲ属を異種寄生する菌群は互いに近縁であることが示された (Fig. 2a)。ヨモギ上の *Aecidium* sp. 4 もこのクレード内に含まれたが, 分類学的位置づけは今後検討が必要と考えられた。また, これらの集団とキクやヨモギに同種寄生する長世代種 *Puccinia tanacetii* DC. var. *tanacetii*, 短世代種の *P. artemisiae-keiskeanae* Miura と *P. ferruginosa* P. Syd. & Syd. (TSH-R3092) (*Puccinia cnici-oleracei* Pers. のシノニムとする意見もある) も近縁であることが示された (Fig. 2a)。一方, キクに寄生する短世代種の *P. horiana* Henn. とヨモギに寄生する *P. cnici-oleracei* (TSH-R25604) はカヤツリグサ科を夏胞子・冬胞子世代とする集団から大きく外れ, イネ科を夏胞子・冬胞子世代とする集団内に含まれた (Fig. 2b)。これらの情報は, 今後生活環の進化を考察する上で重要な情報となると考える。また, *P. ferruginosa* と同定されていたヨモギ上に寄生する短世代種は多系統であることが, Engkhaninun *et al.* (2005) によっても報告されており, 分類学的な再検討が必要である。

ボタンヅル (*Clematis apiifolia* DC.) に寄生する *Aecidium* sp. 5 は, *Puccinia agropyri-ciliaris* F.L. Tai & C.T. Wei と近縁であることが示された (Fig. 2b)。本種は, カモジグサ (TSH-R7999) やミゾイチゴツナギ (TSH-R11230) 上に夏胞子・冬胞子世代を形成し, 冬胞子は越冬せずに発芽するが, 精子・さび胞子世代宿主は不明である。このクレードの周辺にはボタンヅルと同じキンポウゲ科植物を精子・さび胞子世代宿主とする *P. recondita* Roberge ex Desm. や *P. triticina* Erikss. が位置しており, キンポウゲ科とイネ科植物を異種寄生する集団が近縁である可能性が示唆された。*Aecidium* sp. 5 や *P. agropyri-ciliaris* 異種寄生の相手を探索する上で参考となる情報と考える。また, この集団とは別にヨシを夏胞子・冬胞子世代, キンポウゲ科植物を精子・さび胞子世代とする2種の *Puccinia magnusiana* Körn. と *Puccinia okatamaensis* S. Ito が姉妹群を形成することも確認できた (Fig. 2b)。

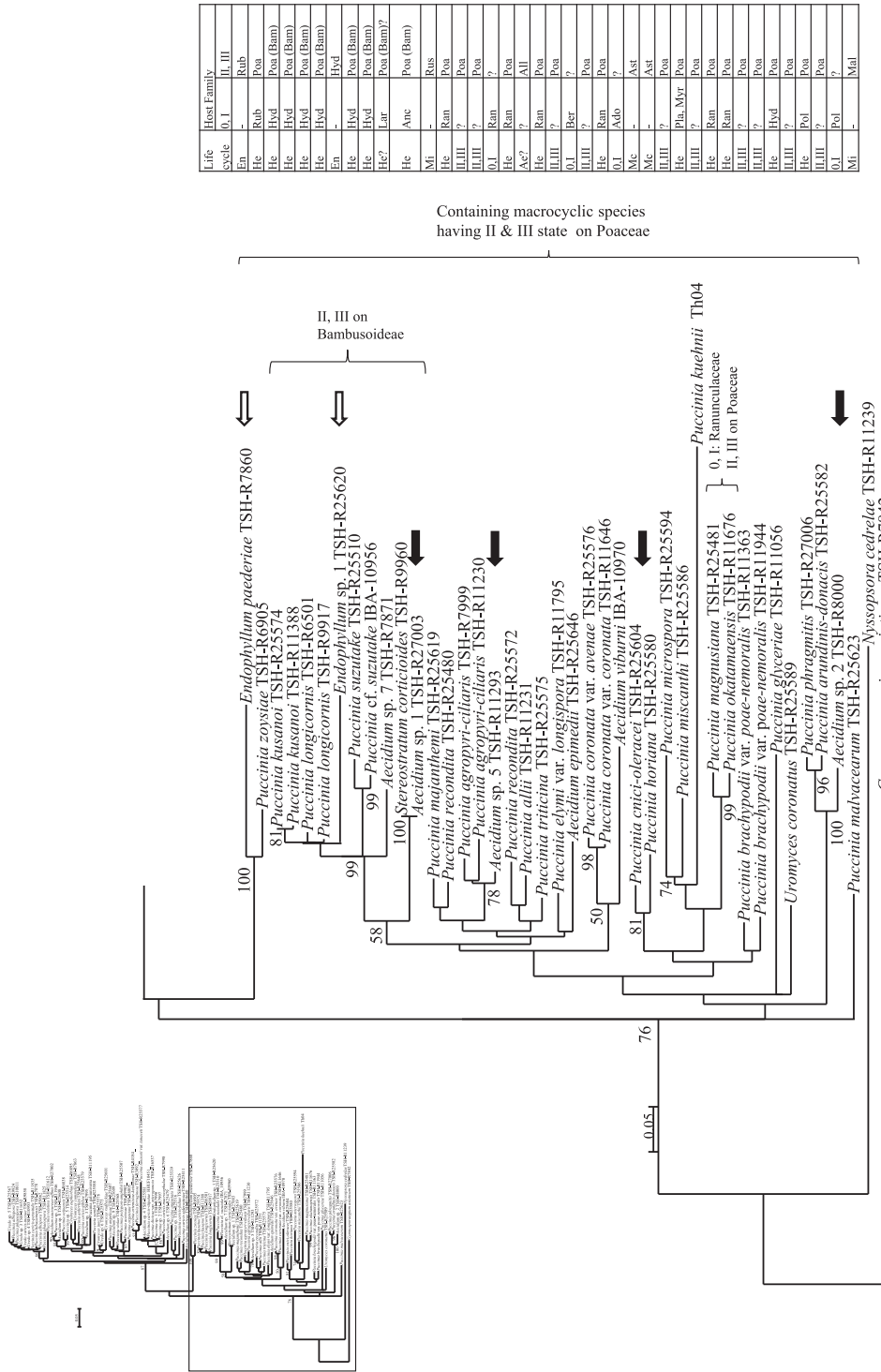


Fig. 2b



今回初めて発見されたサクラタデに寄生する *Aecidium* sp. 2 は、タデ科植物を精子・さび胞子世代宿主、夏胞子・冬胞子世代をヨシに寄生する異種寄生種の *Puccinia phragmitis* (Schumach.) Tul. と同一のクレードに含まれた (Fig. 2b). また、そのクレード内にはダンチク (*Arundo donax* L.) を夏胞子・冬胞子世代宿主とする *Puccinia arundinis-donacis* T. Hirats. が含まれた。今後、*Aecidium* sp. 2 および *P. arundinis-donacis* の異種寄生の相手を探索する上で参考となる情報と考える。一方、タデ科植物を夏胞子・冬胞子世代宿主とする *Puccinia polygoni-amphibii* Pers. と *Puccinia acetosae* (Schumach.) Körn. は姉妹群を形成することが示された (Fig. 2a).

これらの情報は、異種寄生種であることが予想される不完全サビキンやテレオモルフ・サビキンの生活環解明のために、接種試験の対象とする宿主植物やサビキン種の候補を絞り込むことに活用できるとともに、サビキンの種分化、生活環の進化を考察する上で有益な情報となる。小野 (2008) は、生活環・宿主特異性研究の成果に基づきサビキンの種分化の過程について仮説を提唱している。今回得られた情報を精査し、不足している情報を追加して解析を進めることにより、この仮説を検証していくことができると考える。

今回の解析で夏胞子・冬胞子世代宿主の候補が見つかったのは4種 (*Aecidium* sp.1, *Aecidium* sp.3, *Aecidium* sp.4, *A. saussureae-affinis*) であり、そのうち、接種試験により異種寄生性が確認できた2種について以下に解説する。

#### 【チャンチンモドキに寄生する *Aecidium* sp. 1】

チャンチンモドキは、ウルシ科の落葉広葉樹で、中国西・南部、東南アジア北部、ヒマラヤに分布するが、日本では、鹿児島と熊本に限られた地域に自生するのみで (山崎, 1989), 絶滅危惧IB類 (EN) に分類されている (環境省絶滅危惧種検索 [https://ikilog.biodic.go.jp/rdbdata/files/envpdf/植物I\\_248.pdf](https://ikilog.biodic.go.jp/rdbdata/files/envpdf/植物I_248.pdf)). 2014年に鹿児島県にて、チャンチンモドキの苗を育苗中に、さび病が発生した。小葉上あるいは部分的に肥大した若い茎や葉柄上に *Aecidium* 型のさび胞子堆が形成された。チャンチンモドキのさび病は、2001年に福岡県で報告があるが (小河, 2001), 分類学的検討はされていなかった。今回のDNA (SSUとLSU, ITS2-D1/D2) 解析の結果、*Aecidium* sp. 1 (TSH-R27003, TSH-R25644) は、メダケ上の *Stereostromum corticioides* (Berk. & Broome) H. Magn. (TSH-R9960) と一致することが分かった (Fig. 2b)。本菌は、タケ・ササ類上で夏胞子・冬胞子世代を経過し、赤衣病を引き起こすことが知られている (日本植物病理学会, 2000)。この種のタケ・ササ類上での生活環については、何ら (1990) に

より報告されていたが、その他の世代については不明であった。

そこで、つくば市で採取したメダケ上の *S. corticioides* 冬胞子を接種源とし、発芽させて得た担子胞子をチャンチンモドキ苗に接種した結果、接種6~7日後には精子器が形成され、その後約1ヶ月後にはさび胞子堆が形成された。以上の結果から、チャンチンモドキ上の *Aecidium* sp. 1 は、*S. corticioides* の精子・さび胞子世代であることが確認され、本菌が、タケ類とチャンチンモドキに異種寄生することが明らかになった。

*Stereostromum* 属は、本種のみからなる属で、Magnus (1899) により、大型で革質状の冬胞子堆を形成し、冬胞子の1細胞につき3個の発芽孔が存在するなどの特徴から新属として設立された。SSUとLSU, ITS2-D1/D2による解析の結果 *Pucciniaceae* s.l. のタケ亜科 (Bambusoideae) を夏胞子・冬胞子世代宿主とする *Puccinia* 属菌と同じクレードに含まれた (Figs. 1a, 2b)。本菌の冬胞子は、2細胞で柄を有する点で *Puccinia* 属の冬胞子の形態的特徴とも一致する。また、チャンチンモドキ上で形成された精子器の形態もタイプ4であったことも、本菌が、*Puccinia-Uromyces* 属と同系統であることを支持する。従って本属は、*Puccinia* 属のシノニムとする必要があると考える。

#### 【ヨツバムグラに寄生する *Aecidium* sp. 3】

今回の調査中に、ヨツバムグラに全身感染する *Aecidium* sp. 3 を発見した。感染はシュート単位で確認することができ、そのシュートでは輪生する葉のほぼすべてでさび胞子堆が形成される。SSUとLSU, ITS2-D1/D2の塩基配列比較の結果、本菌はマスクサに寄生する *Puccinia caricis-gibbae* Dietel (TSH-R) と一致することが明らかになった (Figs. 1a, 2b)。ヨツバムグラと同属のヤエムグラ (*G. spurium* L. var. *echinospermon* (Wallr.) Hayek) には、ヤガミスゲ (*Carex maackii* Maxim.) 上に夏胞子・冬胞子世代を形成する *P. galiunivarsa* Okane & Yamaoka が全身感染し、*Aecidium* 型の精子・さび胞子世代を形成することが知られている (Okane *et al.*, 2013)。この2種の *Puccinia* 属菌の冬胞子は、どちらも越冬することなく発芽することができ、分子系統解析の結果でも、姉妹関係であることが示された。

そこで、*P. caricis-gibbae* がマスクサとヨツバムグラ間に異種寄生するか確認するため、マスクサ上で形成された *P. caricis-gibbae* の冬胞子を用いヨツバムグラ、ヒメヨツバムグラ (*Galium gracilens* (A.Gray) Makino)、ヤエムグラに対する接種試験を行った。接種方法は、Okane *et al.* (2013) に従った。その結果、接種1週間でヨツバムグラの葉が萎縮したりやや厚くなる等の奇形がシュエ

ト単位で生じた。接種1~2ヶ月後には、奇形になったシュートから新たに展開した葉の裏面にさび胞子堆が形成された。このさび胞子をマスクサに接種したところ、接種約1ヶ月後に夏胞子堆が形成され、本菌の異種寄生性を証明することができた。接種されたヤエムグラでも葉やシュートの奇形は生じたが、接種3ヶ月後でもさび胞子堆の形成には至っていない。

#### 所属が未確定な不完全サビキン類

*Aecidium mori* Barclay, *Aecidium raphiolepidis* Syd., *Aecidium paeoniae* Kom., *Uredo pipturi* (Syd.) Hirats. f. 他 *Uredo* 属3種は Pucciniaceae s.l. クレードには属さないことは明らかであるが (Fig. 1b), その所属を特定することはできなかった。

*Aecidium mori* と *A. raphiolepidis* は、護膜を有し、表面に疣状突起を有する胞子が鎖生することから *Aecidium* 型の胞子堆を形成するが、胞子は繰り返し宿主植物に感染し、無性的に増殖することができる (Hiura, 1931; Sato, 1975; Sato & Sato, 1981)。すなわち、機能的には夏胞子世代となる。*Aecidium mori* はクワ、ヤマグワ、シマグワなどの *Morus* 属植物に、*A. raphiolepidis* はシャリンバイ、ホソバシャリンバイなどの *Rhaphiolepis* 属植物に寄生する。系統解析の結果、両種は近縁であり、*Gymnosporangium* 属と比較的近縁であることが分かったが、明確な系統学的位置づけは不明であった。

*Uredo pipturi* はイラクサ科のヌノマオ (*Pipturus arborescens* C. B. Clarke) に寄生し、表面に刺状突起を有する胞子が柄生するが胞子堆周辺に護膜を有する Milesia 型の胞子堆を形成する。この形態的特徴から *Pucciniastrum* 属菌の夏胞子世代であると予測され、はじめ *Pucciniastrum pipturi* Syd. として記載・命名された (Sydow & Petrak, 1931)。しかし、本研究の分子系統解析の結果から *Phakopsora* 属またはその近縁な属であることが示された。*Phakopsora* 属菌は、胞子堆の周辺が内側に湾曲した厚壁の糸状体で囲まれた Calidion 型、胞子他の周辺を取り囲む糸状体の基部が融合した Malupa 型、または Milesia 型の胞子堆を有することが知られている (Cummins & Hiratsuka, 2003)。

*Phakopsora* 属菌は、SSU と LSU を用いた系統解析の結果、大きく2つに分かれることが報告されており (Aime, (<https://www.plantmanagementnetwork.org/info-center/topic/soybeanrust/2009/presentations/Aime.pdf>), 本研究でも確認することができた。*Uredo iyoensis* Hirats. f. & Yoshin. はスミレ属植物に寄生し、表面に微細な突起を有する夏胞子を柄生する。SSU と LSU を用いた系統解析の結果、本菌は、上記の *Phakopsora* 属菌とは別の *Phakopsora* 属菌集団 (*Phakopsora ampelopsidis*

Dietel & P. Sydow, *Phakopsora meliosmae* S. Kusano) と近縁であるとの結果になったが、明確な系統学的位置づけは不明であった。*Uredo iyoensis* は *Uredo alpestris* J. Schröt. とともに2形性夏胞子を有することが知られているが、形態の異なる夏胞子は、それぞれ異なる種のものではないかとの見解もあり (Ono, 1980), 分類学的再検討が求められている。

#### 内生種の系統と分類

5種類の胞子世代のうちさび胞子世代と夏胞子世代を失った短世代種のうち、冬胞子世代の形態が、その種と関連性があると考えられている長世代種のさび胞子世代と同様の種を内生種と呼ぶ。長世代種との関連性は、胞子世代の形態的特徴や宿主植物、病徴などから推定されていたが、冬胞子の形態が、起源と考えられる長世代種とは明らかに異なることから、内生種として別属として扱うか、起源と考えられる長世代種と同属とするか、不完全サビキンとして扱うか意見が分かれていた (e.g. Hiratsuka, 1969, 1975; Laundon, 1967; Buriticá & Hennings, 1980)。Scholler & Aime (2006) は、*Acacia* 属に寄生する *Endoraecium acacia* Hedges & D. E. Gardner (内生種, タイプ種), *E. hawaiiense* Hedges & D. E. Gardner (内生種) と *Racospermyces koae* (Arthur) J. Walker (長世代種) *Racospermyces digitatus* (G. Winter) J. Walker (長世代種, タイプ種) の分子系統解析を行い、これらが同属に属することを明らかにした。そして、生活環の違いで属を分ける必要は無いという立場から、両属菌を *Endoraecium* 属に統一した。この関係性は、参照データを利用した今回の解析結果でも確認することができた (Fig. 1b)。また、マツ類のこぶ病を引き起こす内生種の *Endocronartium* 属菌は、さび胞子世代が同様の特徴を有する *Cronartium* 属菌と関連性を有すると考えられていた (Hiratsuka *et al.*, 1966)。今回の rDNA の SSU と LSU を用いた分子系統解析で、参照データとして使用した内生種の *Endocronartium harknessii* (J.P. Moore) Y. Hirats. CFB22250: (AY665785+AY700193) は、他の *Cronartium* 属 (長世代種) と同一のクレードに入ることが確認できた (Fig. 1c)。この結果から *Endocronartium* 属は *Cronartium* 属に統合することが妥当と考える。

*Monosporidium machili* (Henni.) T. Sato は、タブノキ (*Machilus thunbergii* Siebold & Zucc.) に寄生し、形態的には *Aecidium* 型の胞子堆を形成するが、胞子は発芽すると担子器様の発芽管を形成する内生種である。はじめ Hennings (1902) により、*Aecidium machili* Henn. として記載されたが、Stevens (1932) は、胞子発芽様式の観察結果より、本菌の胞子はさび胞子ではなく冬胞子であると結論し、*Endophyllum* に移された (*E. machili*

(Henn.) F. Stevens). その後日本産の系統に関しても、Hiratsuka & Kaneko (1977) が、発芽に伴う核の行動を明らかにし、本菌のさび胞子様の胞子が冬胞子であることを確認した。Endophyllum 属は Aecidium 型の胞子堆を形成する内生種であり、その形態的特徴から Puccinia 属や Uromyces 属と関係性があると推測されていた (Laundon, 1967; Buriticá & Hennn, 1980). しかし、佐藤 (1992) は、本種の精子器の形態がタイプ 5 であることから、精子器のタイプ 4 を有する Puccinia や Uromyces 属とは異なる長世代種と系統関係を有すると考え、本種を Monosporidium 属に移した。精子器の形態的特徴から Phakopsora 属に近縁と予想されていたが、本研究の SSU と LSU を用いた系統解析の結果では、本菌は Gymnosporangium 属と最も近縁であることが示され (Fig. 1b), 多くの Endophyllum 属菌を派生したと推定される Puccinia や Uromyces 属とは系統的に異なることが明らかになった。

前述の通り、Endophyllum 属は Aecidium 型の胞子堆を形成する内生種であり、その形態的特徴から Puccinia 属や Uromyces 属と関係性があると推測されていた (Laundon, 1967; Buriticá & Hennn, 1980). しかし、精子器が確認されていない種もあり、また Monosporidium は Endophyllum のシノニムとする考え方もあるため (Cummins & Hiratsuka, 2003), Endophyllum 属内には複数の異なる系統が混在している可能性がある。本研究では、2 種の Endophyllum 属菌を供試した。rDNA の SSU と LSU を用いた分子系統解析結果では、ヘクソカズラ (Paederia scandens (Lour.) Merr.) に寄生する内生種の E. paederiae (Dietel) Stevens & Mendiola とアジサイに寄生する Endophyllum sp. はともに、Pucciniaceae s.l. クレード内に含まれた (Fig. 1a). そのため、ITS2 領域、LSU の D1/D2 領域を用いて、Pucciniaceae s.l. クレードに含まれるさらに多くの種を用いた分子系統解析を行った。

ヘクソカズラ (Paederia scandens (Lour.) Merr.) 上には内生種の E. paederiae (Dietel) F. Stevens & Mendiola が寄生すると同時に、シバ類 (Zoysia 属) で夏胞子・冬胞子世代を形成する異種寄生種の Puccinia zoysiae Dietel が精子・さび胞子世代を形成することが知られている (Hiratsuka et al., 1966). ヘクソカズラ上の両種の胞子世代の形態は極めて類似しており系統的な関連性があると予測されていたが、今回の系統解析の結果でも両者が近縁であることが示された (Fig. 2b).

今回解析に供試したアジサイ上の Endophyllum sp. は、2016 年 6 月に、岩手県一関市のアジサイ園において、ヒメアジサイ系統の新梢に発生が確認された (升屋 未発表データ). 葉上だけではなく茎やシュート全体に多

数の Aecidium 型の胞子堆が形成されていた。Hydrangea 属植物では、コアジサイ (Hydrangea hirta Sieb. & Zucc.), ナガバアジサイ (H. longifolia Hayata), アマチャ (H. macrophylla DC. var. thunbergii Mak.) に精子・さび胞子世代、スズタケ (Sasamorpha borealis (Hack.) Nakai var. borealis) 上で夏胞子・冬胞子世代を経過する Puccinia suzutake Kakishi. & S. Sato, およびノリウツギ (H. paniculata Sieb.) に精子・さび胞子世代、ミヤマドジョウツナギ (Glyceria alnasteretum Kom.), ドジョウツナギ (G. ischyronera Steud.), ヒロハノドジョウツナギ (G. leptolepis Ohwi) 上で夏胞子・冬胞子世代を経過する Puccinia glyceriae S. Ito が知られる。また、原田・藤田 (1998) は、青森県のエゾアジサイ (Hydrangea macrophylla var. megacarpa) の新梢で Aecidium sp. が発生したことを報告している。後に李 (2004) は、本菌の発芽管が担子器様構造になることを確認し本菌を内生型サビキン (Endophyllum sp.) であると結論した。今回岩手県で発生したサビキンは、発芽試験において担子器様の発芽管を形成することが確認され、この Endophyllum sp. と同一種であると同定した。本研究の DNA (SSU と LSU, ITS2-D1/D2) 解析の結果、本菌は、タケ、ササ類に寄生する Puccinia 属菌のクレードに含まれ (Figs. 1a, 2b), 本菌は、P. suzutake またはその近縁種 (精子・さび胞子世代宿主をアジサイ科植物とする) との系統的関連性があることが示唆された。

今回供試した Endophyllum 属菌 2 種は、ともにイネ科植物を夏胞子・冬胞子世代宿主とする Puccinia 属の長世代種と近縁であることが分かった。また、これら 2 種は進化の過程でそれぞれ異なる長世代種から分化したと推測された。南アフリカのキク科植物に寄生する Endophyllum 属菌 3 種のように、系統的に近縁な内生種が存在する例もあるが (Wood & Crous, 2005), Endophyllum 属を独立した系統群と扱うことは困難であると考えられる。今後より多くの種について解析が必要ではあるが、系統関係を重要視するならばこれら 2 種は Puccinia 属等の適切な属に転属させる必要があると考える。

本研究で分子系統解析に使用した DNA 抽出物および DNA シークエンス情報は、原著論文の投稿作業に伴い、それぞれ国立科学博物館分子生物多様性研究資料センターや GenBank を通じて、標本データは地球規模生物多様性情報機構 (GBIF) を通じて公開する予定である。

## 要 約

本研究では、日本産の不完全サビキンおよび内生型サビキンの系統分類学的所属を決定するとともに、今後の異種寄生種の生活環解明、生活環の進化に関する研究の

情報ソースを構築することを目的とし、不完全サビキン、内生型サビキンおよび関連するテレオモルフ・サビキン種の18S rDNA (SSU), 28S rDNA (LSU) およびITS領域を用いた分子系統解析を行った。SSUとLSUを使用した分子系統解析の結果、*Aecidium* 属12種、*Uredo* 属4種および*Endophyllum* 属2種は、Pucciniaceae s.l. クレードに含まれた。これらの菌群については、*Puccinia* 属またはより適した属に転属する必要がある。一方、*Aecidium* 属3種、*Caecoma tsukubaense*、*Uredo* 属8種、*Monosporidium machili* はPucciniaceae s.l. 以外のクレードに属した。このうち、*C. tsukubaense*、*U. daphnicola*、*U. fagarae* は既存の属内に含まれ、それぞれ転属の必要があると考えた。しかし、その他の種は既存の属内には含まれず、今後より広範囲の属を含めた系統解析を行い、所属を決定する必要がある。Pucciniaceae s.l. クレードに属した菌群については、さらにITS2領域とLSUのD1/D2領域を用いた解析を行った。その結果、*Aecidium* sp.1、*Aecidium* sp. 3、*Aecidium* sp. 4、*A. saussureae-affinis* の4種についてテレオモルフ・サビキン種の候補が見つかり、*Aecidium* sp.1と*Aecidium* sp. 3については、接種試験により異種寄生性を証明した。また、Pucciniaceae s.l. は、カヤツリグサ科に寄生する種を含むサブクレードとその他のクレード(イネ科に寄生する種を含む)に分かれた。その中で系統的に近縁なサビキンは近縁の宿主植物を利用している傾向が示された。これらの情報は、異種寄生種であることが予想される不完全サビキンやテレオモルフ・サビキンの生活環解明のために、接種試験を行う際、供試植物やサビキン種の候補を絞り込むことに活用できるとともに、サビキンの種分化、生活環の進化を考察する上で有益な情報となる。今回供試した*Endophyllum* 属菌2種は、ともにイネ科植物を夏胞子・冬胞子世代宿主とする*Puccinia* 属のそれぞれ異なる長世代種から分化したと推測された。従って、*Endophyllum* 属を独立した系統群と扱うことは困難であると考え。今後より多くの種について解析が必要ではあるが、系統関係を重要視するならばこれら2種は*Puccinia* 属等の適切な属に転属させる必要があると考える。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 栗田招子, 岡根 泉, 山岡裕一, 小野義隆. 2016. ヤマブドウに寄生するさび菌2種の発生生態について. (ポスター発表) 日本菌学会60周年記念大会(9月16-19日, 京都)
- 2) 岡根 泉, 安藤裕萌, 栗田招子, 山岡裕一, 小野義隆. 2016. 北アメリカ南部と南アメリカ北部に分布するブドウ葉さび病菌の分子系統学的検討. (ポスター発表) 日本菌学会60周年記念大会(9月16-19日, 京都)
- 3) 安藤裕萌, 岡根 泉, 久保慎也, 秋庭満輝, 山岡裕一. 2017. チャンチンモドキに寄生する*Aecidium*属さび菌の生活環. (ポスター発表) 第128回日本森林学会大会(3月26-29日, 鹿児島)
- 4) 山岡裕一, 岡根 泉, 小野義隆, 升屋勇人, 細矢 剛, 安藤裕萌, 藤森祥平, 鈴木浩之, 糸澤千尋. 2017. 内生型生活環を有するさび菌3種の系統分類学的所属の検討. (ポスター発表) 第2回環境微生物系学会合同大会2017(8月29-31日, 仙台)
- 5) 糸澤千尋, 加藤 彩, 山岡裕一. 2017. スゲ属およびヨモギ属を宿主とするさび菌の分類学的検討. (ポスター発表) 第2回環境微生物系学会合同大会2017(8月29-31日, 仙台)

## 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いたします。また、試料の採取にご協力いただいた森林総合研究所の秋庭満輝氏、鹿児島県森林技術総合センターの久保慎也氏と新原修一氏、大阪市立大学理学部附属植物園、ミュージアムパーク茨城県自然博物館、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園、標本をお貸し頂いた弘前大学農学生命科学部の田中和明氏、神奈川県立生命の星・地球博物館に対し、心からお礼申し上げます。

## 文 献

- Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* **47**: 112-122.
- Beenken, L. 2017. *Austropuccinia*: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). *Phytotaxon* **297**: 53-61.
- Buritic, P. & Hennen, J. F. 1980. *Pucciniosireae* (Uredinales, Pucciniaceae). *Flora Neotropica Monograph* **24**: 1-50
- Crane, P. E., Yamaoka, Y., Engkhaninun, J. & Kakishima, M. 2005. *Caecoma tsukubaense* n. sp., a rhododendron rust fungus of Japan and southern Asia, and its relationship to *Chrysomyxa rhododendri*. *Mycoscience* **46**: 143-147.
- Cummins, G. B. & Hiratsuka, Y. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*, third edition. APS Press, St. Paul.
- Engkhaninun, J., Ono, Y. & Kakishima, M. 2005. Phylogenetic relationships of four *Puccinia* species parasitic on *Artemisia* in Japan. *Mycoscience* **46**: 61-65.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Harada, Y. 1986. Four new species of heteroecious *Puccinia* (Uredinales) on *Carex* from Japan. *Tran. Mycol. Soc. Japan.* **27**: 357-370.
- 原田幸雄, 藤田美夏 1998. エゾアジサイ新梢さび病(新称)およびエンレイソウ春さび病(新称)について. *日植病報* **64**: 611.
- 何 方, 柿島 真, 佐藤昭二 1990. 筑波地域における赤衣病

- 菌, *Stereostratum corticioides* のメダケ上での周年変化. 菌草研報 **28**: 243-249.
- Hennings, P. 1902. Einige neue japanische Uredineen III. Hedwigia **41**: 18-21.
- Hiratsuka, N. 1936. Inoculation experiments with heteroecious species of the Japanese rust fungi. III. Bot. Mag., Tokyo **50**: 213-216, 239.
- Hiratsuka, N. & Kaneko, S. 1977. Life cycles of three rust species. Rept. Tottori Mycol. Inst. **15**: 6-12.
- Hiratsuka, N., Kaneko, S. & Kudo, A. 1966. Two species of Uredinales from Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan **7**: 33-35.
- Hiratsuka, N., Sato, S., Katsuya, K., Kakishima, M., Hiratsuka, Y., Kaneko, S., Ono, Y., Sato, T., Harada, Y., Hiratsuka, T. & Nakayama, K. 1992. The Rust Flora of Japan. Tsukuba Shuppankai, Tsukuba.
- Hiratsuka, Y. 1969. *Endocronartium*, a new genus for autoecious pine stem rusts. Can. J. Bot. **47**: 1493-1495.
- Hiratsuka, Y. 1975. Recent controversies on the terminology of rust fungi. Rept. Tottori Mycol. Inst. **12**: 99-104.
- Hiura, M. 1931. Observations and experiments on the mulberry rust caused by *Aecidium mori* Barclay. Jap. J. Bot. **5**: 252-272.
- Katoh, K. & Standly, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. **30**: 772-780.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, tenth edition. CAB International, Wallingford.
- 小河誠司 2001. チャンチンモドキのさび病. 森林防疫 **50**: 188.
- Laundon, G. F. 1967. Terminology in the rust fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. **50**: 189-194.
- 李 壯 2004. さび菌の生活環および分類学に関する研究. 岩手大学大学院連合農学研究科生物環境科学専攻 (弘前大学) 博士論文.
- Magnus, P. 1899. Ueber die bei verwandten Arten auftretenden Modificationen der Charaktere von Uredineen-Gattungen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **17**: 178-184.
- Maier, W., Begerow, D., Weiß, M. & Oberwinkler, F. 2003. Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences I. Can. J. Bot. **81**: 12-23.
- McTaggart, A. R., Shivas, R. G., van der Nest, M. A., Roux, J., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. 2016. Host jumps shaped the diversity of extant rust fungi (Pucciniales). New Phytol. **209**: 1149-1158.
- 日本植物病理学会(編) 2000. 日本植物病名目録. (社)日本植物防疫協会, 東京.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (eds), The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, p. 225-233, CABI, Wallingford.
- 岡田 元 2011. 第18回国際植物学会議(IBC2011, Melbourne)で採択されたアナモルフ菌類および多型の生活環をもつ菌類の統一命名法. 日菌報 **52**: 82-97.
- Okane, I., Yamaoka, Y., Kakishima, M., Abe, J. P. & Obata, K. 2013. *Puccinia galiuniversona*, a new caricicolous rust fungus systemically inhabiting *Galium aparine* in its spermatogoniae-aecial stage. Mycoscience **55**: 89-97.
- Ono, Y. 1980. Is *Uredo iyoensis* dimorphic? Mycologia **72**: 1195-1199.
- Ono, Y. 1983. Aecial stage of *Puccinia dioicae* var. *micropuncta*, var. nov. occurs on *Artemisia* in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan **24**: 1-6.
- 小野 義隆 2008. なぜ生活環研究なのか: サビキン分類学での意義. 日菌報 **49**: 1-28.
- Sato, S. 1975. Life cycle and spore appendage of a rust fungus, *Aecidium raphiolepidis* H. Sydow on *Raphiolepis umbellata* Makino. Trans. Mycol. Soc. Japan **16**: 86-89.
- 佐藤豊三 1992. *Monosporidium*. 小林享夫, 勝本 謙, 我孫子 和雄, 阿部恭久, 柿島 真(編) 植物病原菌類図説, p. 585-586, 全国農村教育協会, 東京.
- Sato, T. & Sato, S. 1981. *Aecidium raphiolepidis* and *A. pourthiaeeae*: two imperfect rust fungi with aecidioid uredinia. Trans. Mycol. Soc. Japan **22**: 173-179.
- Scholler, M. & Aime, M. C. 2006. On some rust fungi (Uredinales) collected in an *Acacia koa*-*Metrosideros polymorpha* woodland, Mauna Loa Road, Big Island, Hawaii. Mycoscience **47**: 159-165.
- Silvestro, D. & Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Org. Divers. Evol. **12**: 335-337.
- Stevens, F. L., 1932. Additional Philippine Uredineae. Univ. Philippines Nat. and Appl. Sci. Bull. **2**: 441-447.
- Sydow H. & Petrak, F. 1931. Micromycetes philippinenses. Series secunda. Ann. Mycol. **29**: 145-279.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kobayashi, S., Tokura, K. & Kakishima, M., 2008. First records of *Pythium aquatile* and *P. macrosporum* isolated from soils in Japan. Mycoscience **49**: 276-279.
- Van Der Merwe, M. M., Ericson, L., Walker, J., Thrall, P. J. & Burdon, J. J. 2007. Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. Mycol. Res. **111**: 163-175.
- Van Der Merwe, M. M., Walker, J., Ericson, L. & Burdon, J. J. 2008. Coevolution with higher taxonomic host groups within the *Puccinia/Uromyces* rust lineage obscured by host jumps. Mycol. Res. **112**: 1387-1408.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J. & White, T. J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications, p. 315-322, Academic Press, San Diego.
- Wingfield, B. D., Ericson, L., Szaro, T. & Burdon, J. J. 2004. Phylogenetic patterns in the Uredinales. Australas. Plant Pathol. **33**: 327-335.
- Wood, A.R. & Crous, P.W. 2005. Morphological and molecular characterization of *Endophyllum* species on perennial asteraceous plants in South Africa. Mycol. Res. **109**: 387-400.
- 山崎 敬 1989. ウルシ科 Anacardiaceae. 佐竹義輔, 原 寛, 亙理俊次, 富成忠夫(編), 日本の野生植物 木本 II, p. 4-6, 平凡社, 東京.



# レブリン酸を基幹化合物とする新規バイオ生産技術の開発 ～化学触媒変換とバイオコンバージョンの融合による木質バイオマスの高効率転換～

羽 部 浩

産業技術総合研究所機能化学研究部門, 現 環境管理研究部門

〒305-8569 つくば市小野川16-1

Development of a process for microbial production using levulinic acid as a substrate

Efficient conversion of woody biomass into chemicals  
with combination of chemical and biotechnological processes

Hiroshi Habe

Environmental Management Research Institute,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),  
16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japan

Levulinic acid is a platform chemical catalytically synthesized from lignocellulose, the most abundant and non-edible biomass resource, and the expansion of levulinic acid use as a feedstock is important for production of bio-based chemicals. Up to now, few reports have focused on the microbial conversion of levulinic acid into value-added chemicals, because such short-chain organic acids are reported to inhibit microbial growth at moderate concentrations. Here, we isolated and analyzed seventy levulinic acid-utilizing bacteria to develop a process for microbial production using levulinic acid as a substrate. Some bacteria belonging to the phyla of *Actinobacteria*, *Firmicutes*, or *Proteobacteria* possessed the ability to use high concentrations of levulinic acid (greater than 70 g/L) with the addition of organic nutrient into media, and *Brevibacterium epidermidis* LA39-2 utilized 100 g/L of levulinic acid. As for metabolites from levulinic acid, several organic acids and trehalose were detected. *Pseudomonas* sp. LA18T accumulated acetic acid, propionic acid and  $\alpha$ -ketoglutaric acid during the growth, and *Burkholderia stabilis* LA20W did trehalose. We also carried out comparative transcriptome analyses of levulinic acid-utilizing bacteria, *Rhodococcus equi* PS1b and *Pseudomonas* sp. LA18T, under growth on levulinic acid or pyruvic acid. It was revealed by RNA-seq that several genes were commonly up-regulated in the two species despite their phylogenetic difference. The enzymes including acyl-CoA ligase, phosphoglycerate mutase, acyl-CoA dehydrogenase were thought to participate in microbial levulinic acid metabolism.

Key words: biorefinery, woody biomass, microbial production, levulinic acid

## 緒 言

我が国独自の微生物工業として勃興したアミノ酸発酵以降、食品、医薬品、化粧品分野において微生物発酵工

業は非常に重要な役割を果たしてきた。一方近年では、化学品製造分野においても、発酵技術を組み入れた化学品製造プロセスの開発が行われている。現在、国内全石油消費量の約23%、CO<sub>2</sub>総排出量の約5%を化学品製造分野で占めていることから、原料を循環型資源であるバイオマス等へと転換し、石油消費量およびCO<sub>2</sub>排出量を削減していくことは重要な課題である。例えば、味の素株式会社と東レ株式会社との間では、植物原料から発酵技術により製造したリジンを原料とするバイオベースナイロンの事業化に向け、2012年から共同研究が開始されている。

E-mail: [hiroshi.habe@aist.go.jp](mailto:hiroshi.habe@aist.go.jp)

共同研究者：桐村光太郎（早稲田大学理工学術院先進理工学部）、  
小池 英明（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）、

菅野 学（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）、

佐藤 由也（産業技術総合研究所環境管理研究部門）

特にバイオマスからの化学品製造においては、賦存量が多く、かつ食糧と競合しない木質系バイオマスの主成分であるリグノセルロースを効率的に利用することが重要である。従来の利用法としては、リグノセルロースをセルラーゼにより酵素糖化した後、発酵によりエタノール、アミノ酸、あるいは有機酸を製造し、さらに化学触媒等により各種基礎化学品あるいは機能性化学品へと変換する。しかしながらセルラーゼによる酵素糖化には、未だ技術的な課題も多く、①セルロースが結晶構造をとるため適切な前処理技術の開発が必要、②セルラーゼが大量に必要であるが酵素自身のコストが高い、③リグニン等の夾雑物によりセルラーゼ活性が阻害される、④糖化液中の夾雑物により発酵が阻害される、⑤バイオマス原料から化学製品までの各工程間での最適化が必要、といった課題も多い (Olson *et al.*, 2011; Hasunuma *et al.*, 2013)。

近年、産業技術総合研究所・触媒化学融合研究センターにおいて、木質バイオマスをレブリン酸 (Fig. 1) へと1段階で変換可能な Lewis 酸と Brønsted 酸のハイブリッド酸触媒が開発された (Tominaga *et al.*, 2011)。この  $\text{In}(\text{OTf})_3$  と *p*-toluenesulfonic acid から成るハイブリッド酸触媒により、メタノールの存在下で、対セルロース収率 75% 以上でメチルレブリン酸を合成することに成功している。また実際のバイオマスを用い、杉木粉から3成分 (セルロース/ヘミセルロース/リグニン) を分離せずに直接レブリン酸を合成可能であることも示された (Nemoto *et al.*, 2014)。さらに  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{H}_3\text{PO}_4$  から成る水系でも利用可能なハイブリッド酸触媒を開発し、杉木粉から対セルロース収率 86% でレブリン酸を合成

可能とした (Nemoto *et al.*, 2015)。このように木質系バイオマスから基幹化学品であるレブリン酸を一段階で効率よく合成することは化学触媒反応でのみ成しうる技術である。この産総研方式以外にも、他の酸系触媒を使った方法 (Pileidis & Titirici, 2016) や、マイクロ波とイオン液体を使ってセルロースからレブリン酸を製造する技術も報告され (Ren *et al.*, 2013)、基幹化学品としてのレブリン酸は注目されている。その結果、化学触媒反応でレブリン酸から芳香族化合物や C4 化合物といった基礎化学品、さらには機能性化学品を製造する研究も報告されている (Pileidis & Titirici, 2016)。実際バイオマス由来のレブリン酸は、GFBiochemicals 社により商用スケールで生産され、2017年までにイタリアで年産 10,000 トン規模までスケールアップされている。

リグノセルロース由来基幹物質としての糖とレブリン酸を比較すると、糖は蒸留で精製できないがレブリン酸は可能であるため、バイオマス由来の夾雑物を除去することも容易である。発酵で C6 糖 (グルコース) をエタノールまで変換した場合、C6 糖 1 モルから 2 モルの  $\text{CO}_2$  が発生することになるため、炭素の利用効率が悪い上、 $\text{CO}_2$  排出にも繋がる。一方、C6 糖を C5 のレブリン酸に変換した場合は炭素利用効率が良く、かつ残りの C1 もギ酸であるため、こちらも化学品原料として利用可能である。

今後レブリン酸の価格が下がり、大量に提供できる可能性が示されれば、糖以外のリグノセルロース由来基幹物質として、レブリン酸も注目されるであろう。もしレブリン酸を基質としたバイオ変換により、従来の糖プラットフォームやレブリン酸の化学触媒反応では製造が難しい化学品が製造可能となれば、リグノセルロース利

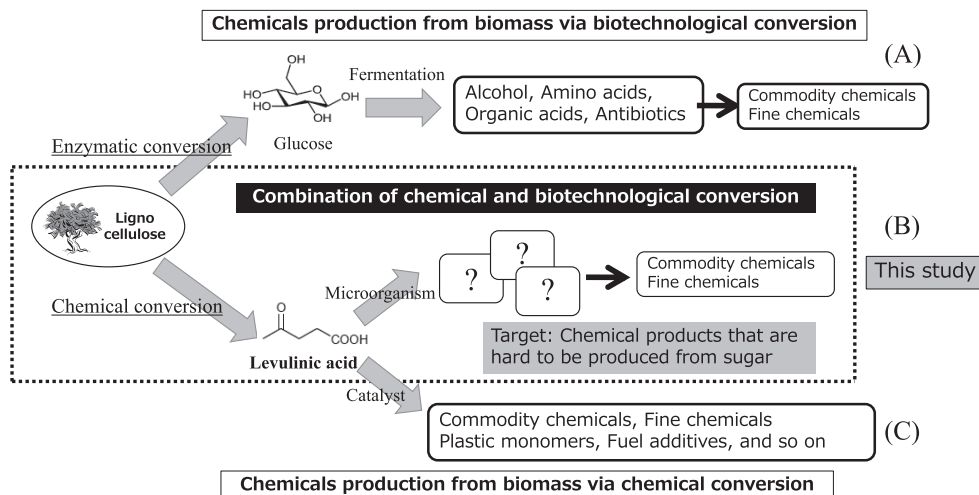


Fig. 1 Summarized concept of lignocellulosic biomass utilization. (A) Sugar platform biorefinery; (B) Levulinic acid platform biorefinery by a combination of chemical and biotechnological conversion; (C) Levulinic acid platform biorefinery by catalytic conversion.



用法の多様性が拡充され、バイオマスをより効率的に利用することが可能となる (Fig. 1). このようにバイオマス由来化学品の製造においては、化学技術とバイオテクノロジーの融合が今後ますます重要となる。

レブリン酸のバイオ変換に関する研究報告は少ないものの、その歴史は古い。レブリン酸の酵素変換については、1925年にカルボキシラーゼによるレブリン酸の酵素分解に関する報告がある (黒野ら, 1925). 一方、1969年から1970年にかけて当時のキッコーマン醤油関西工場の研究者らによって、レブリン酸の微生物分解に関する研究が行われている (原田ら, 1969). 各種調味料の製造において、炭水化物を含む原料を酸によって加水分解して得られる酸分解液を使用する際に、炭水化物の過分解によって分解液中に多量のレブリン酸とギ酸等が生成し、酵母の発酵を阻害するとともに香味に悪影響を与えるという問題があった。そこで調味料の品質改良を目的とし、酸分解液からレブリン酸を除去するため、レブリン酸の微生物分解を検討している。このようにレブリン酸をはじめ、フルフラール類やギ酸など糖の過分解物は、一般に微生物の発酵阻害を引き起こすことが知られていることから、微生物を用いた物質生産においてレブリン酸を原料に用いる研究例は非常に少ない。これまでは濃度が高くても20g/L程度のレブリン酸を資化する微生物しか知られていなかったことに加え、レブリン酸を資化した際にどのような代謝中間体が培地中に蓄積するかなどについては、ほとんど知見がなかった (相田ら, 1970; 奥山ら, 1995). 近年では、生分解性ポリマーであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 生産の基質としてレブリン酸を利用する研究も行われている (Jaremko & Jian, 2011).

本研究では、将来的なバイオプロセスによるレブリン酸からの物質生産を見据え、100g/L程度の高濃度レブリン酸を利用可能な微生物の取得を試みた。またレブリン酸のバイオ変換で製造可能な化学品に関する情報を得るため、レブリン酸資化菌の代謝産物を調べるとともに、ゲノム情報に基づいた代謝系の解析から、今後の化学品への展開において有用な代謝中間体が存在しないか調べることとした。

## 実験方法

### 微生物菌株の探索, 単離, 同定

レブリン酸を唯一の炭素源として生育可能な微生物をスクリーニングする際は、主に3種類の培地 (A, B, C培地と呼ぶ) に、レブリン酸が終濃度20g/Lから50g/Lとなるよう加えた培地 (NaOHにてpHを7.0に調整) を用いた。レブリン酸を除くA培地の組成は、 $K_2HPO_4$

2g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g/L, B培地の組成は、 $NaNO_3$  1.5g/L,  $NH_4Cl$  1g/L, Basal salt solution 5mL/L, Phosphate solution 5mL/L, Vitamin solution 1mL/L, C培地の組成は、 $K_2HPO_4$  0.5g/L,  $KH_2PO_4$  2.5g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1g/L,  $NaNO_3$  1g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g/L, Metal solution 2mL/L, Vitamin solution 1mL/Lである。Vitamin solutionの組成は、Calcium pantothenate 0.5g/L, Inositol 2g/L, Niacin 0.5g/L, Pyridoxine hydrochloride 0.5g/L, *p*-Aminobenzoic acid 0.5g/L, Cyanocobalamin 0.02g/L, Thiamine 1g/L, Biotin 0.2g/L, Metal solutionの組成は、 $FeCl_3 \cdot 4H_2O$  1.5g/L,  $CoCl_3 \cdot 6H_2O$  0.19g/L,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.1g/L,  $ZnCl_2$  0.07g/L,  $H_3BO_3$  0.062g/L,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.036g/L,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.024g/L,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  0.017g/Lである。Basal salt solutionおよびPhosphate solutionの組成は、既報 (Hanada *et al.*, 1997) に従い調製した。スクリーニングは、産総研つくばセンター内の土壤を中心とした200箇所以上の環境サンプルを分離源とした。上記A, B, C培地のいずれか5mLが入った試験管を用いて好氣的に30℃で一週間程度培養を行った後、これを試験管で複数回継代することで集積し、寒天培地にて単離を行った。単離した菌株は、再度スクリーニング用の培地を用いて、レブリン酸資化能を確認した。

有機栄養源の存在下でレブリン酸を利用可能な微生物をスクリーニングする際は、主に2種類の培地 (D, E培地と呼ぶ) に、レブリン酸が終濃度20g/Lから100g/Lとなるよう加えた培地 (NaOHにてpHを7.0に調整) を用いた。レブリン酸を除くD培地の組成は、ポリペプトン (日本製薬) 5g/L, 酵母エキス (Difco) 5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g/L, E培地の組成は、 $K_2HPO_4$  2g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25g/L, 酵母エキス (Difco) 5g/Lである。スクリーニングは、産総研つくばセンター内の土壤を中心とした200箇所以上の環境サンプルを分離源とした。上記D, E培地のいずれか5mLが入った試験管を用いて好氣的に30℃で一週間程度培養を行った後、これを試験管で複数回継代することで集積し、寒天培地にて単離を行った。単離した菌株は、再度スクリーニング用の培地を用いて培養した後、液体クロマトグラフ (HPLC) にて培地中のレブリン酸濃度の減少を確認した。

単離した細菌株の同定は定法に従い、16S rRNA 遺伝子配列の全領域 (一部の菌株については、16S rRNA 遺伝子の上流領域約500bp) の塩基配列を決定、もしくはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) によりリボゾームタンパク質のマスマスペクトルを取得し、データベースと照合することで細菌種を同定した。

電気透析によるバイオマス由来レブリン酸からの夾雑物の除去

実バイオマス（杉木粉）由来レブリン酸溶液は、産総研・触媒化学融合研究センターにて既報（Nemoto *et al.*, 2015）に従い調製した。杉木粉由来レブリン酸は、pH 2であるため、NaOHにてpH 6に調整した。レブリン酸溶液からの夾雑物除去は、陰イオン回収用の膜カートリッジ AC-122-10（有効膜面積 10cm<sup>2</sup>, サンアクティス）を装着した電気透析装置マイクロアシライザー S1（アストム）を用いた。電極液には、0.5M NaNO<sub>3</sub> 溶液を用いた。電気透析開始時は 4.7V の定電圧で運転し、電流値が 0.4A より低くなった時点で 4.6V の定電圧に切り替わる。同様に電流値が 0.1A より低くなった時点で 4.2V、さらに 0.04A より低くなった時点で 3.6V に切り替わるよう自動運転を行った（電極電圧は 3.5V）。溶液の電気伝導度が 500 $\mu$ S/cm（約 1g/L のレブリン酸イオンに相当）になった時点で運転が自動的に止まるように設定した。

電気透析にて濃縮した 0.5M のレブリン酸溶液 1mL に、飽和塩化カルシウム溶液（6.7M）を 1mL から 2mL 加えて混合し、10mL のエタノールを添加することでレブリン酸カルシウムを晶析した。エタノールを濾別して結晶を乾燥させたのち、水に再溶解して HPLC で純度を確認した。

レブリン酸およびレブリン酸代謝物の分析法

レブリン酸を含む培地で培養した菌体を遠心分離により除去した後、上清液を HPLC にて解析し、標品化合物と保持時間およびピーク面積を比較することで濃度を測定した。レブリン酸およびその代謝物である酢酸、プロピオン酸、2-オキシグルタル酸等は、Aminex<sup>®</sup> HPX-87H カラム（300x7.8mm, BIO-RAD）を装着した HPLC システムを用い、移動相は 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、流速は 1mL/分、カラム温度は 60℃ として示差屈折計（RI 検出器）で解析を行った。また同様に、異なるカラムと検出器を用いても HPLC 解析を行った。TSK-GEL ODS-100V カラム（150x4.6mm, TOSO）を装着した HPLC システムを用い、移動相は 74mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、流速は 1mL/分、カラム温度は 30℃ として紫外検出器（UV 検出器）で解析を行った。さらに必要に応じてクロマトグラフィーに供した。

トレハロースは、培養液上清を陰イオン交換樹脂 Dowex に通すことで残存するレブリン酸イオンを除去し精製した。分子量は、Synergy<sup>®</sup> 4- $\mu$ m Fusion RP カラム（150x2mm, 島津製作所）を装着した液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）システム（LC/MS 2020, 島津製作所）を用い、移動相は 0.1% ギ酸/アセトニトリル（95:5）、流速は 0.2mL/分、カラム温度は 40℃ として測定を行った。同定はサンプルをトリメチ

ルシリル化剤にて誘導体化した後、キャピラリーカラム HP-5MS を装着したガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）システム（Agilent Technologies）で解析を行った。カラムは 50℃ で 5 分間保持した後、毎分 3℃ ずつ昇温して 250℃ とし、10 分間温度を保持した。

レブリン酸誘導性遺伝子の発現解析

微生物におけるレブリン酸代謝系を解明するため、レブリン酸生育時に高発現する遺伝子の特定を試みた。最初に各菌株の遺伝情報を取得するため、ドラフトゲノム解析を行った。定法に従い菌株から total DNA を抽出し、キットを用いてペアエンド法およびメイトペア法にて DNA ライブラリーを調製した後、MiSeq あるいは HiSeq（イルミナ）を用いてシーケンズを行った。ALLPATHS-LG ver.46449 等を用いてゲノムシーケンズのアッセンブルを、Glimmer 3.02 等を用いてタンパク質をコードする遺伝子を予測し、NCBI-BLAST-2.2.29(BLASTP) 等を用いてアノテーションを行った。これらゲノム情報に基づき、RNA-seq 法による比較トランスクリプトーム解析を行った。各菌株をレブリン酸およびピルビン酸を基質とした培地で培養し、対数増殖中期の菌体からフェノール/クロロホルム法等により RNA を抽出した後、DNase（RQ1 RNase-Free DNase, Promega）により残存 DNA を除去し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて RNA を精製した。続いて、キット（NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit, New England Biolabs）を用い cDNA ライブラリーを調製した後、MiSeq あるいは HiSeq（イルミナ）を用いてシーケンズを行った。発現量の解析は、低クオリティのシーケンズを Trimmomatic v0.30 等によって除去した後、各細菌のドラフトゲノム配列を対象に Bowtie2 によってマッピングし、BEDTools 等により発現強度を正規化することで行った。

結果および考察

レブリン酸を唯一の炭素源として生育する微生物の探索

レブリン酸を唯一の炭素源とする A, B または C 培地を用いて、微生物の生育を指標としたスクリーニングを行った結果、30 株の細菌の単離に成功した。これら 30 菌株を同定した結果、*Bacillus* 属など *Firmicutes* に属する菌が 21 株、*Rhodococcus* 属など *Actinobacteria* に属する菌が 4 株、*Pseudomonas* 属など *Gamma*proteobacteria に属する菌が 3 株、その他は、*Beta*proteobacteria と *Alphaproteobacteria* が 1 株ずつであった（Fig. 2）。

例えば *Rhodococcus* sp. WU-1501 株は、20g/L のレブリン酸を含む C 培地で良好に生育し、120 時間で OD 値

が20程度まで増殖した。一方、炭素源をレブリン酸からグルコースに変更すると、グルコースはほとんど消費されなかった。同じ *Rhodococcus* 属細菌である *R. equi* PS1b 株を、3g/Lから20g/Lのレブリン酸を含むB培地で生育させたところ、10g/Lまでのレブリン酸であれば24時間後に菌の増殖が始まり、48時間でOD値が3程度まで増殖した。レブリン酸濃度が15g/Lになると、72時間後に菌が増殖し始め、120時間後ではOD値が4に達する。一方、レブリン酸濃度が20g/Lになると、菌の生育は確認されなかった。

このように単離した多くの菌が、レブリン酸濃度20g/L前後を境に生育が悪くなり、現在までに、液体培養で40g/L以上のレブリン酸を唯一の炭素源として生育可能な微生物は取得できていない。20g/Lのレブリン酸を用いて物質生産を行ったとしても、生産量はせいぜい20g/L程度である。バイオプロセスを工業化する目安の一つと言われる、1バッチ当たり100g/Lの生産量を目指すためには、100g/L程度のレブリン酸を変換可能な微生物の取得が望まれた。

#### 有機栄養源存在下でレブリン酸を利用可能な微生物の探索

高濃度レブリン酸を利用可能な微生物を取得するため、レブリン酸を唯一の炭素源としたスクリーニング方法を変えることとした。40g/Lから100g/Lのレブリン酸を含むD培地で集積して得られた単離菌株を用いて、培養液上清のレブリン酸濃度の減少を確認することでスクリーニングを行った。その結果、40株の細菌の単離に成功した。これら40菌株を同定した結果、*Rhodococ-*

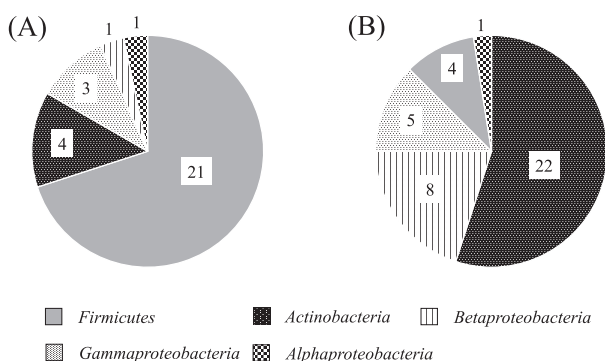
*cus* 属など *Actinobacteria* に属する菌が22株、*Burkholderia* 属など *Betaproteobacteria* に属する菌が8株、*Pseudomonas* 属など *Gammaproteobacteria* に属する菌が5株、*Bacillus* 属など *Firmicutes* に属する菌が4株、その他は、*Alphaproteobacteria* が1株であった (Table 1)。これら40菌株の門/綱レベルでの分類を、レブリン酸を唯一の炭素源として単離した30菌株の分類と比較したところ、割合は異なるものの類似の細菌が単離されており、いずれも門レベルでは *Actinobacteria* か *Firmicutes*、もしくは *Proteobacteria* に属していた (Fig. 2)。

#### 高濃度レブリン酸の代謝試験

有機栄養源の存在下でレブリン酸を利用可能な細菌40株について、実際に80g/L以上の高濃度レブリン酸を代謝可能であるか検証した。20g/Lのレブリン酸を含むD培地100mLで菌株を2日間30°Cで培養し、生育した菌体を集菌して上清を除去した後、80g/Lのレブリン酸を含むD培地20mLに再懸濁し (OD値は約20)、30°Cで10日間培養した。その結果、*Cellulosimicrobium cellulans* LA14-2株、*Brevibacterium epidermidis* LA39-2株、

**Table 1** Identification of levulinic acid-utilizing bacteria isolated from the environment using the media containing organic nutrients besides levulinic acid

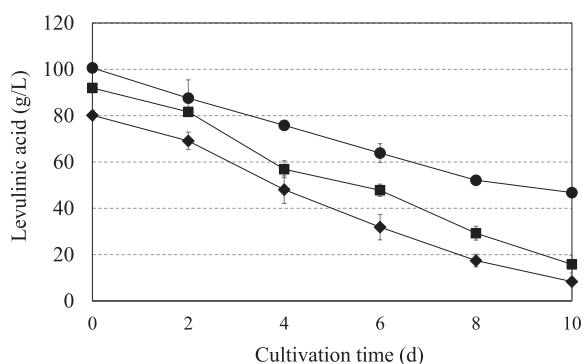
Phylum or class	Genus and species	Strains
<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.	LA80, LA86-1
	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	LA39-2, LA44, LA46-1, LA77-2
	<i>Brevibacterium linens</i>	LA40
	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	LA14-2, LA67-2, LA110-2
	<i>Leucobacter</i> sp.	LA69-1
	<i>Rhodococcus equi</i>	LA8, LA14-1, LA15-1, LA60, LA73-2, LA74-2, LA84-2, LA86-2, LA110-1
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	LA73-1
	<i>Rhodococcus hoagie</i>	LA6W
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	LA58
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> sp.
<i>Alcaligenes faecalis</i>		LA45-2, LA46-2, LA46-3
<i>Burkholderia stabilis</i>		LA20W
<i>Burkholderia</i> sp.		LA1S
<i>Bacillus pumilus</i>		LA103
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	LA79
	<i>Granulicatella adiacens</i>	LA36-2
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	LA74-1
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	LA67-1
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	LA15-2
	<i>Pseudomonas</i> sp.	LA18T
	<i>Pseudomonas putida</i>	LA22B
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	LA24Y



**Fig. 2** The phylum/class-level phylogenetic classification of levulinic acid-utilizing bacteria isolated based on screening methods using the media containing levulinic acid as a sole carbon source (A) and the media containing organic nutrients besides levulinic acid (B). The numbers on the graphs represent the number of isolated bacterial strains.

*Rhodococcus erythropolis* LA73-1 株の3株において、80 g/L レブリン酸の経時的な減少が確認された。LA14-1 株および LA73-1 株においては、4 日目以降レブリン酸濃度が50 g/Lとなったが、それ以降レブリン酸濃度は変わらなかった。一方、*B. epidermidis* LA39-2 株においては、4 日目以降もレブリン酸濃度は経時的に減少し、10 日間で約90%のレブリン酸が代謝された (Fig. 3)。LA39-2 株については、さらにレブリン酸初発濃度を上げ、90 g/L および 100 g/L のレブリン酸を含む D 培地に菌体を懸濁し (OD 値は約 20)、30°C で 10 日間培養した。その結果、初発濃度 90 g/L では 10 日間で約 80%、100 g/L においても 10 日間で約 50% のレブリン酸が代謝されることが明らかとなった (Fig. 3)。

このように高濃度レブリン酸の存在下でも耐性を示し、基質として利用可能な微生物が単離されたことから、例えば *B. epidermidis* LA39-2 株を宿主とした組換え体を創製することにより、高濃度レブリン酸を効率的に変換して化学品を生産することも可能となる。これまでにレブリン酸の酵素変換に関する研究も報告されており、*Clostridium acetobutylicum* 由来のアセト酢酸脱炭酸酵素は、レブリン酸をメチルエチルケトンへと変換する (Min *et al.*, 2013)。また、*Alcaligenes faecalis* 由来の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素をベースとした改変酵素が、レブリン酸を4-ヒドロキシ吉草酸へと変換可能であることも報告されている (Yeon *et al.*, 2013)。精製酵素を利用するとコストが高くなるが、これらの酵素をコードする遺伝子を *B. epidermidis* LA39-2 株などの宿主に導入することにより、メチルエチルケトンや4-ヒドロキシ吉草酸といった化学品も安定的に生産できるであろう。

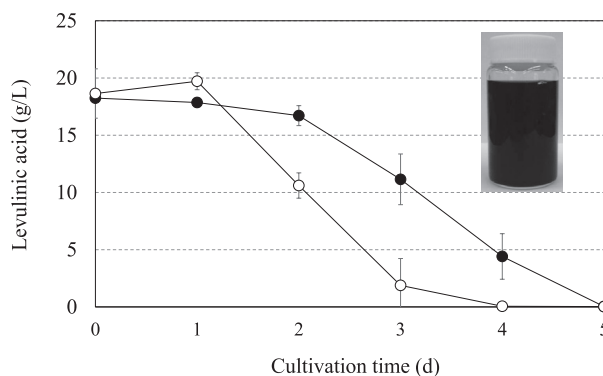


**Fig. 3** Time course of levulinic acid consumption by *Brevibacterium epidermidis* LA39-2. Symbols: diamonds, 80 g/L of initial levulinic acid concentration; squares, 90 g/L; circles, 100 g/L. Data represent the means of three independent experiments.

杉木粉由来レブリン酸に含まれる微生物阻害物質の除去

これまでレブリン酸化菌のスクリーニングおよびレブリン酸の代謝実験は、市販の試薬レブリン酸を用いた実験であったが、実際のバイオマス由来レブリン酸でも微生物が利用可能であることを示す必要がある。杉木粉由来レブリン酸は黒褐色であるが (Fig. 4, 写真), NMR 解析ではレブリン酸以外のスペクトルは確認されておらず、極めて微量な不純物により着色しているものと考えられている (Nemoto *et al.*, 2015)。そこで杉木粉由来レブリン酸が、微生物の生育およびレブリン酸の代謝に及ぼす影響について調べた (Fig. 4)。20 g/L の杉木粉由来および試薬のレブリン酸を含む D 培地で、*Pseudomonas* sp. LA18T 株を 5 日間 30°C で培養した結果、試薬レブリン酸を用いた場合は 2 日目に約 50%、3 日目に約 90% のレブリン酸が代謝された。一方、杉木粉由来レブリン酸を用いた場合は、2 日目ではまだほとんど代謝されておらず、4 日目で約 80% のレブリン酸が代謝されるなど、杉木粉由来レブリン酸は利用可能ではあるものの、試薬レブリン酸に比べ微生物利用の速度が遅いことが示された (Fig. 4)。

そこで、この阻害を引き起こす微量夾雑物を、電気透析装置を用いて除去することとした。予備検討として、各種濃度および pH 範囲でのレブリン酸溶液を調製し、電気透析装置を用いたレブリン酸の濃縮が可能であることを確認した後、初発濃度 80 g/L から 90 g/L の杉木粉由来レブリン酸を用いて夾雑物の除去を試みた。電気透析により、杉木粉由来レブリン酸は 115 g/L から 125 g/L



**Fig. 4** Effect of cedar-derived levulinic acid on growth as well as levulinic acid consumption of *Pseudomonas* sp. LA18T. Symbols: white circle, reagent levulinic acid; black circle, cedar-derived levulinic acid. The vertical bar shows the standard deviation of the mean of three independent experiments. The picture represents the catalytically synthesized levulinic acid solution from cedar powder (cedar-derived levulinic acid).

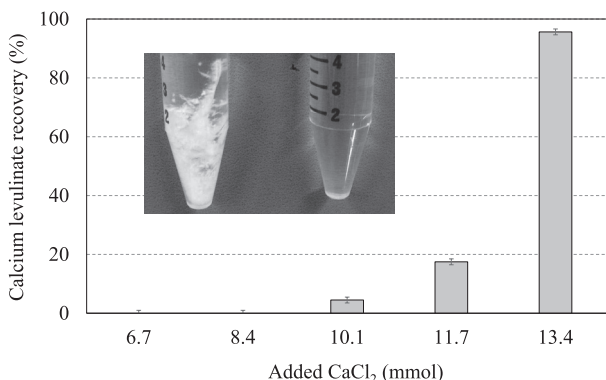
の範囲で濃縮され、若干色は残っているものの、陰イオン交換膜により着色物質が除去された。電気透析で濃縮した杉木粉由来レブリン酸 (20g/L) が、レブリン酸の代謝に及ぼす影響について調べたところ、試薬レブリン酸を使用した場合と同等の速度でレブリン酸が消費された。

また電気透析により得られた杉木粉由来レブリン酸溶液を、長期間安定的に保存するため、レブリン酸カルシウムとして回収する方法を検討した。0.5Mレブリン酸溶液と、飽和した塩化カルシウム溶液を混合後、適量のエタノールを添加した。その結果、白色のレブリン酸カルシウムが析出し (Fig. 5, 写真左)、十分量の塩化カルシウムを添加することで、95%以上のレブリン酸がカルシウム塩として回収可能であることが示された (Fig. 5)。このように電気透析による杉木粉由来レブリン酸溶液の精製と濃縮が可能になったこと、またカルシウム塩として長期間安定に保存できるようになったことから、ラボにおいて杉木粉由来レブリン酸を用いた各種実験を行うことが可能となった。

#### レブリン酸代謝産物の解析

高濃度レブリン酸を利用可能な微生物が単離され、バイオマス由来レブリン酸も利用可能となったことから、次に微生物がレブリン酸の代謝産物としてどのような化合物を培養液中に蓄積するのか調べることにした。

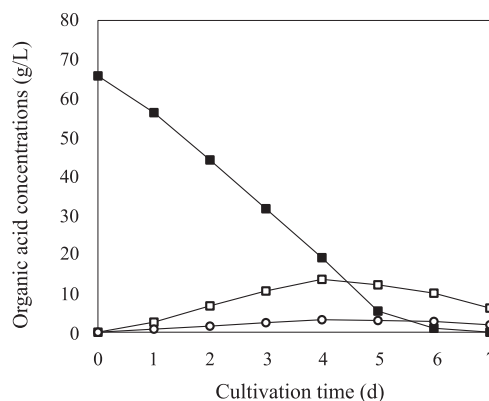
*Pseudomonas* sp. LA18T株を、20g/Lのレブリン酸を含むD培地 100mLで2日間30℃で培養し、生育した菌体を集菌して上清を除去した後、70g/Lのレブリン酸を含むD培地 20mLに再懸濁し (OD値は約25)、30℃で7日間培養した。その結果、レブリン酸の経時的な消費



**Fig. 5** Effect of calcium chloride addition on crystallization of levulinic acid calcium salt dihydrate. The initial concentration of levulinate solution is 58g/L. The vertical bar shows the standard deviation of the mean of three independent experiments.

に伴い、酢酸およびプロピオン酸が培養液中に蓄積され、4日目でそれぞれ最大13.2g/Lおよび3.2g/Lの蓄積が確認された (Fig. 6)。この結果から、C5のレブリン酸がC2のアセチル CoA と C3のプロピオニル CoA に分かれて代謝されることが示唆された。また、5日目からの酢酸濃度の減少に伴い、2-オキソグルタル酸が検出されたことから、酢酸がアセチル CoA として TCA 回路に入ること、2-オキソグルタル酸が生成したと考えられる。同様に、レブリン酸の消費に伴う酢酸とプロピオン酸の生成は、*Rhodococcus hoagie* LA6W 株においても確認された。一方少量ではあるが、他の有機酸を培養液中に蓄積する菌株も存在し、例えば *Ochrobactrum* WU-1502 株においては、7日間の培養で0.63g/Lの2-オキソグルタル酸に加え、0.1g/Lのシュウ酸も検出されている。

*Burkholderia stabilis* LA20W 株を、40g/Lのレブリン酸を含むD培地で培養し、HPLCにて培養液中の代謝物を解析したところ、これまで検出された有機酸とは異なる保持時間に未知のピークが検出された。培養液上清から残存レブリン酸を除去し、LC-MSで分析したところ、分子量が342g/molとなり二糖類であることが示唆された。サンプルをトリメチルシリル化剤にて誘導体化した後、GC-MSにて各種二糖類の標品と比較したところ、トレハロースと保持時間 (74.8分) およびマススペクトル (主要なフラグメントイオン:  $m/z$  361, 271, 191, 147, 73) が完全に一致した。レブリン酸の代わりにグルコースを用いたD培地では、トレハロースは検出されず、レブリン酸誘導的に生産されていることが示され



**Fig. 6** Time course of levulinic acid consumption and metabolic intermediate accumulation by *Pseudomonas* sp. LA18T. Symbols: black squares, levulinic acid concentration (initial 70g/L); white squares, acetic acid concentration; white circles, propionic acid concentration. Representative results out of at least two independent experiments are shown.

た。トレハロースは微生物細胞内に蓄積され、細胞外にはトレハロースリピッドのような形で排出されることが多い。現在までに本菌株におけるトレハロース蓄積のメカニズムは不明であるが、LA20W株の培養条件では、菌の生育に伴って培養液のpHが上昇しアルカリ性になるため、このことが何かしらの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

上記菌株以外にも、バイオ界面活性剤等を生産している菌が検出されているが、いずれも生産量は数g/L程度と少なく、現在までにレブリン酸から量産可能な化合物は見つかっていない。引き続き、嫌気条件下など多様な条件でレブリン酸産生菌の探索を継続し、代謝物の分析を行っていく必要がある。

#### レブリン酸代謝系の解析

レブリン酸の代謝経路を解明し、その中間体に化学品へと展開可能な有用物質があれば、各種遺伝子工学的な手法により、レブリン酸からその化合物を蓄積するような菌株を創製することも可能となる。そこでこれまでほとんど知見のない、微生物におけるレブリン酸の代謝系を解析することとした。

最初にレブリン酸を利用可能な各タイプの菌株について遺伝情報を得るため、ドラフトゲノム解析を行った。レブリン酸を唯一炭素源として利用可能なグラム陽性細菌 *Rhodococcus equi* PS1b 株、有機栄養源の存在下でレブリン酸を利用可能なグラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. LA18T 株、培地中にトレハロースを生産するグラム陰性細菌

*Burkholderia stabilis* LA20W 株の3菌株を対象とした (Table 2)。このうち *B. stabilis* LA20W 株のドラフトゲノム配列については、DDBJ/EMBL/GenBank に登録を行った (コンティグ: BDCP01000001–BDCP01000023; スキャホールド: DF978417–DF978420)。残りの2菌株について、得られたゲノム情報に基づき、RNA-seq法を用いた比較トランスクリプトーム解析を行った。

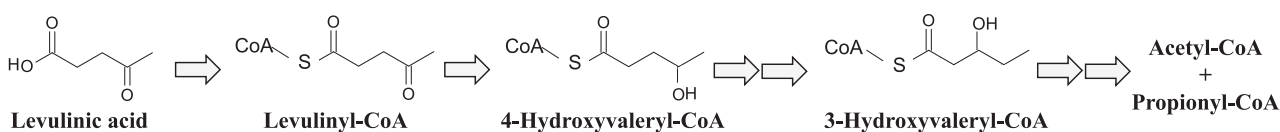
*R. equi* PS1b 株において、ピルビン酸生育時と比較し、レブリン酸生育時に発現量が100倍以上になる遺伝子を含む2つのゲノム領域が取得された。1つのゲノム領域には、輸送タンパクとアシル CoA リガーゼと相同性のある遺伝子がクラスターを成して存在しており、それぞれ71倍、289倍の発現量増加 (対ピルビン酸生育時) を示した。もう一方のゲノム領域には、ホスホグリセリン酸ムターゼ、短鎖型脱水素酵素、アシル CoA 脱水素酵素等と相同性のある遺伝子がクラスターを成して存在しており、120から370倍の発現量増加 (対ピルビン酸生育時) を示した。

*Pseudomonas* sp. LA18T 株においては、ピルビン酸生育時と比較し、レブリン酸生育時に発現量が5倍以上になる遺伝子を含むゲノム領域が取得された。このゲノム領域にも PS1b 株と同様、輸送タンパクとアシル CoA リガーゼと相同性のある遺伝子がクラスターを成して存在しており、それぞれ5倍、7倍の発現量増加 (対ピルビン酸生育時) を示した。さらに、ホスホグリセリン酸ムターゼ、短鎖型脱水素酵素、アシル CoA 脱水素酵素等と相同性のある遺伝子群もクラスターを成して存在しており、5から10倍の発現量増加 (対ピルビン酸生育時) を示した。

このように系統学的位置と培養方法も異なる2種類の細菌において、類似の遺伝子群が高発現していたことから、レブリン酸代謝系の酵素遺伝子である可能性が高いと考えられる。得られた酵素遺伝子から推定されるレブリン酸の代謝経路としては、レブリン酸もしくはレブリン酸の4位のケト基が還元され4-ヒドロキシ吉草酸になった後、補酵素Aがカルボキシル基末端に付加して代謝が進む経路である (Fig. 7)。代謝物解析の結果から最終的にアセチル CoA とプロピオニル CoA に分かれることを考えると、4-ヒドロキシバレルル CoA が3-ヒドロキシバレルル CoA へと変換される必要があり (Fig. 7)。

**Table 2** Summary of draft genomes of three levulinic acid-utilizing bacteria isolated in this study

	<i>Rhodococcus equi</i> PS1b	<i>Pseudomonas</i> sp. LA18T	<i>Burkholderia stabilis</i> LA20W
Nucleotide sequence (Mb)	5.55	7.12	7.97
Contigs	171	26	23
Protein-coding genes	5286	5938	7548
tRNA genes	52	60	56
rRNA genes	3	12	10



**Fig. 7** Proposed metabolic pathway of levulinic acid in *Rhodococcus* spp. and *Pseudomonas* spp.

現在これら代謝経路の解析に取り組んでいる。

レブリン酸を基質としたバイオ変換において、従来の糖プラットフォームやレブリン酸の化学触媒反応では生産が難しい化学品をターゲットにするという観点に立てば、化学品展開の可能性のある代謝中間体として、4-ヒドロキシ吉草酸や3-ヒドロキシ吉草酸といったC5の光学活性ヒドロキシカルボン酸が有望であろう。光学活性化合物は医薬品原料として利用可能であり、またC5のヒドロキシカルボン酸は新たな樹脂のモノマー原料としての利用可能性もある。今後はより詳細なレブリン酸代謝系の解析だけでなく、C5ヒドロキシカルボン酸の用途開拓も重要な研究課題となる。

## 要 約

木質バイオマス利用法の多様性を拡充するため、リグノセルロースの直接化学変換により得られる基幹化合物「レブリン酸」を原料としたバイオ生産技術開発を目標とし、各種基盤研究を行った。具体的には、1)微生物発酵の阻害物質としても知られるレブリン酸を化学品製造の原料とするため、100g/L程度の高濃度レブリン酸を変換可能な微生物の探索を行った。2)微生物が実バイオマス由来レブリン酸を利用可能であるか検討した。3)ターゲットとする化学品に関する情報を得るため、レブリン酸の微生物代謝産物を分析するとともに、レブリン酸の代謝経路の解明を試みた。

その結果として、以下に示す成果が得られた。

- 1) レブリン酸を唯一の炭素源とした培養条件では、40g/L以上のレブリン酸で生育する微生物は取得できなかった。一方、有機栄養源存在下でレブリン酸を利用可能な微生物を探索したところ、*Brevibacterium epidermidis* など100g/Lのレブリン酸も代謝可能な細菌の取得に成功した。
- 2) 黒褐色の杉木粉由来レブリン酸を基質にすると、レブリン酸の利用速度が遅くなるが、電気透析で夾雑物を除去することにより、試薬レブリン酸と同程度の利用速度に向上した。
- 3) レブリン酸代謝物を解析した結果、酢酸、プロピオン酸、2-オキシグルタル酸等の有機酸やトレハロースが検出された。また *Rhodococcus* 属や *Pseudomonas* 属細菌を用いて比較トランスクリプトーム解析を行い、発現量の高い酵素遺伝子群から代謝経路を推定した。

## 本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Habe, H., Fukuoka, T., & Morita, T. Production of trehalose

from a cellulose-derived building-block, levulinic acid, by *Burkholderia stabilis*. The Society for Industrial Microbiology and Biotechnology (SIMB) Annual Meeting and Exhibition. July 24-28, 2016, New Orleans, Louisiana, USA.

原著論文

- 1) Habe, H., Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kirimura, K. & Kitamoto, D. 2015. Bacterial production of short-chain organic acids and trehalose from levulinic acid: a potential of cellulose-derived building block as a feedstock for microbial production. *Bioresour. Technol.* **177**: 381-386.
- 2) Habe, H., Sato, S., Morita, T., Fukuoka, T., Kirimura, K. & Kitamoto, D. 2015. Isolation and characterization of bacterial strains with the ability to utilize high concentrations of levulinic acid, a platform chemical from inedible biomass. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**: 1552-1555.
- 3) Sato, Y., Koike, H., Kondo, S., Hori, T., Kanno, M., Kimura, N., Morita, T., Kirimura, K. & Habe, H. 2016. Draft genome sequence of *Burkholderia stabilis* LA20W, a producer of trehalose that uses levulinic acid as a substrate. *Genome Announc.* **4**(4): e00795-16, doi:10.1128/genomeA.e00795-16.
- 4) Habe, H., Kondo, S., Sato, Y., Hori, T., Kanno, M., Kimura, N., Koike, H. & Kirimura, K. 2017. Electrodialytic separation of levulinic acid catalytically synthesized from woody biomass for use in microbial conversion. *Biotechnol. Prog.* **33**: 448-453.

## 保存機関に寄託した菌株

*Burkholderia stabilis* LA20W = NBRC 112421

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、助成を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。また、杉木粉由来のレブリン酸溶液を調製、供与いただきました富永健一博士と根本耕司博士（ともに産業技術総合研究所触媒化学融合研究センター）に深謝いたします。

## 文 献

- 相田徳二郎, 山口和夫. 1970. レブリン酸資化性酵母に関する研究 (第2報) 生菌懸濁液によるレブリン酸の代謝について. *農化.* **44**: 476-483.
- Hanada, S., Kawase, Y., Hiraiishi, A., Takaichi, S., Matsuura, K., Shimada, K. & Nagashima, K. V. P. 1997. *Porphyrobacter tepidarius* sp. nov., a moderately thermophilic aerobic photosynthetic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **47**: 408-413.
- 原田倫夫, 重田敏右, 上野喬宏. 1969. 微生物によるレブリン酸の代謝 (第1報) レブリン酸資化性細菌の検索. *農化.* **43**: 739-746.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J. & Kon-

- do, A. 2013. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour. Technol.* **135**: 513-522.
- 黒野勘六, 深井冬史, 館野正淳. 1925. 「カルボキシラーゼ」の作用に就て (第一報) (レビュリン酸の酵素的分解). *農化.* **1**: 281-291.
- Jaremko, M. & Jian, Y. 2011. The initial metabolic conversion of levulinic acid in *Cupriavidus necator*. *J. Biotechnol.* **155**: 293-298.
- Nemoto, K., Tominaga, K. & Sato, K. 2014. Straightforward synthesis of levulinic acid ester from lignocellulosic biomass resources. *Chem. Lett.* **43**: 1327-1329.
- Nemoto, K., Tominaga, K. & Sato, K. 2015. Facile and efficient transformation of lignocellulose into levulinic acid using an  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$  hybrid acid catalyst. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **88**: 1752-1754.
- Min, K., Kim, S., Yum, T., Kim, Y., Sang, B. -I. & Um, Y. 2013. Conversion of levulinic acid to 2-butanone by acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 5627-5634.
- 奥山潔, 篠山浩文, 藤井貴明. 1995. 紅色非硫黄細菌 *Rhodospseudomonas* sp. No.7 の休止細胞によるレブリン酸の分解. *千葉大園学報.* **49**: 29-35.
- Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. W. & Lynd, L. R. 2011. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 1-10.
- Pileidis, F. D. & Titirici, M. M. 2016. Levulinic acid biorefineries: New challenges for efficient utilization of biomass. *ChemSusChem.* **129**: 616-619.
- Ren, H., Zhou, Y. & Liu, L. 2013. Selective conversion of cellulose to levulinic acid via microwave-assisted synthesis in ionic liquids. *Bioresour. Technol.* **9**: 562-582.
- Tominaga, K., Mori, A., Fukushima, Y., Shimada, S. & Sato, K. 2011. Mixed-acid systems for the catalytic synthesis of methyl levulinate from cellulose. *Green Chem.* **13**: 810-812.
- Yeon, Y. J., Park, H. -Y. & Yoo, J. Y. 2013. Enzymatic reduction of levulinic acid by engineering the substrate specificity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Bioresour. Technol.* **134**: 377-380.



# 有害化合物汚染土壌の微生物集団による分解・浄化に向けた基盤研究： 分解菌と共存する非分解菌の役割の解明

津 田 雅 孝

東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Toward establishment of microbial community-based degradation and remediation of  
chemically polluted soil: enhancement of degrader growth by co-residing non-degraders

Masataka Tsuda

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

Using a phenanthrene (Phn)-degrading bacterial consortium (MixEPa4) that consisted of several genera, we have previously isolated two strains; one is *Mycobacterium* sp. EPa45 able to completely degrade three toxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Phn, naphthalene, and biphenyl, and the other is *Burkholderia* sp. Bcrs1W unable to degrade the three PAHs. We have further found that the growth of EPa45 is significantly inhibited in the presence of Phn and that such inhibition is suppressed by the co-cultivation with Bcrs1W. These two phenomena were designated growth inhibition (GI) and suppression of GI (SGI), respectively. In this study, we further analyzed these phenomena in more detail, and dissemination of such phenomena in microbial world was investigated. Addition of Phn to the culture medium led to the death of EPa45 cells, and such death might have been induced by reactive oxygen species (ROS) that were formed abundantly in the presence of Phn or its metabolite(s). The SGI effect of Bcrs1W to EPa45 was observed only when the viable Bcrs1W cells directly contacted the EPa45 cells, strongly suggesting no involvement of small and/or diffusible molecules in the SGI. Various and taxonomically divergent bacterial strains, including *Burkholderia multivorans* ATCC 17616, exhibited the SGI effect to EPa45, and strain-dependent difference in the intensities of the SGI effect was observed. Such difference among the strains was apparently correlated with their growth abilities on Phn-containing solid medium. Co-cultivation of EPa45 with ATCC 17616 in the presence of Phn specifically induced an EPa45 gene putatively involved in the removal of ROS, suggesting that such induction is mediated by ATCC 17616 with (an) unknown mechanism(s). The three PAHs exerted the GI effect to EPa45 and another mycobacterial strain, and such GI effect to the two strains were suppressed by Bcrs1W and ATCC 17616, suggesting wide dissemination of the two phenomena in various PAH-degrading mycobacterial strains.

Key words: microbial community, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, phenanthrene degradation, growth inhibition

## 緒 言

各種の有害化合物で汚染された土壌の浄化には、当該環境棲息微生物（特に細菌）が極めて重要な役割を果たし、有害化合物完全分解可能な数多くの細菌株の実験室系解析で学術的に重要で新規性のある数々の知見が提示されてきた (Nojiri *et al.*, 2015)。一方、複合生物系であ

る実汚染土壌では、実験室系で分解活性が低い細菌株や汚染土壌細菌叢で優占化しない「予想外の」細菌株や細菌集団の汚染化合物分解への関与や異種細菌株での協調的な分解が示唆されている (加藤ら, 2015; Nojiri *et al.*, 2015) が、これら現象の詳細な実体とそれらを司る機構は不明である。従って、細菌やその集団による汚染土壌の効率的浄化技術の確立をめざすためには、集団内での分解細菌の分解機能発現と共存する非分解細菌の汚染化合物分解への役割とその機構の根源的解明が必要である。

汚染土壌での汚染化合物の微生物分解に関する従来の

E-mail: mtsuda@ige.tohoku.ac.jp

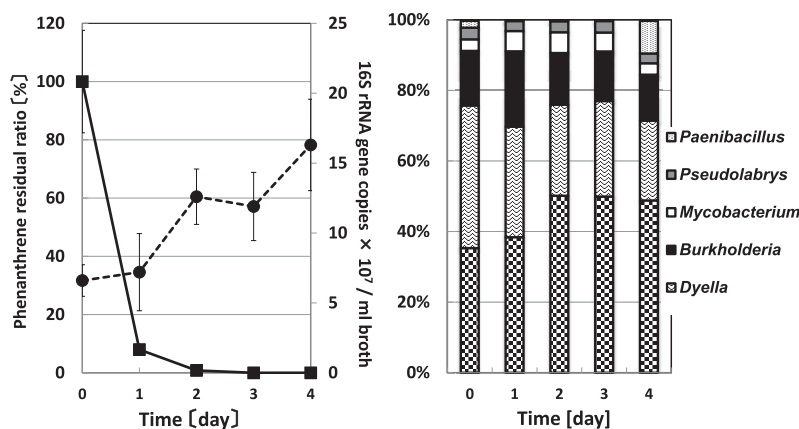
共同研究者：吉川博文（東京農業大学応用生物科学部）

研究は生物的・非生物的な多数環境因子が多面的かつ不確定的に大幅変動する開放系環境で実施されたため、再現性の高い研究成果取得が難しい。これに対して我々は、有害化合物汚染土壌棲息細菌集団の中で如何なる細菌(群)が如何に当該化合物の分解に関与するかを外的環境因子変動のない状態で解析してきた。特定農地土壌を物理的環境要因の制御が可能な閉鎖系にした後に代表的な環境汚染化合物で多環芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon; PAH) (本報独自の略号は **Table 1** にまとめた) であるフェナントレンを含む4種の芳香族系有害化合物を同時添加し、当該土壌の細菌叢 (16S rRNA 遺伝子配列を指標) と機能遺伝子プールの経時的変動に関する大規模メタゲノム解析を行った (Mori *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2015a)。その結果、当該土壌でのフェナントレン完全分解

には棲息細菌集団内で常時1%以下だった *Mycobacterium* 属細菌がとりわけ分解前半段階に関与するが、集団内で最大20%程度までに優占化した *Burkholderia* 属細菌が何らかの協調的な形で前者株によるフェナントレン分解を促進したと強く推定された。一方、本汚染土壌からフェナントレンを唯一炭素源とする最小寒天培地で生育可能なコロニーを多数取得した。多くのコロニーは各々が1種の細菌株で構成されず、フェナントレン完全分解菌株と数種の非分解菌株から構成されるフェナントレン分解コンソーシアムであった。そのうちのひとつ MixEPa4 ではフェナントレン完全分解 *Mycobacterium* 属菌株と *Burkholderia* 属菌株を含む数種の非分解菌株が共存していた。MixEPa4 の菌叢組成は最小液体培地でのフェナントレン分解過程でも安定で、*Mycobacterium* 属細菌は少数派のままで優占化せず (**Fig. 1**),

**Table 1** Abbreviations used in this study

Abbreviation	Description in English	Description in Japanese
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon	多環芳香族炭化水素
GI	Growth Inhibition	生育阻害
SGI	Suppression of Growth Inhibition	生育阻害緩和
ADN	Acceleration of Degradation by Non-degrader	非分解菌による分解促進
ROS	Reactive Oxygen Species	活性酸素種
Phn	Phenanthrene	フェナントレン



**Fig. 1.** Degradation of phenanthrene by consortium MixEPa4 and its changes in community compositions. **(A)** Degradation of phenanthrene (Phn) in M9 Phn minimal liquid medium (square) and cell proliferation (circle). Copy numbers of 16S rRNA genes in the culture were determined by quantitative PCR analysis according to the protocols by Kato *et al.* (2015a). **(B)** Change in community compositions during the Phn degradation in M9 Phn minimal liquid medium. 16S rRNA genes in the culture were PCR-amplified and sequenced using the Illumina MiSeq system according to the protocols by Mori *et al.* (2014). Boxes from the bottom are the following bacteria: family *Alcaligenaceae* (check) – genus *Dyella* (wave) – genus *Burkholderia* (black) – genus *Mycobacterium* (white) – genus *Pseudolabrys* (grey) – genus *Paenibacillus* (dot). Similar results were obtained in two independent experiments, and panel B shows one representative result.

MixEPa4 での効率的フェナントレン分解には *Mycobacterium* 属株と非分解菌株との共存が重要と示唆された(加藤ら, 2015). そこで, 上記メタゲノム解析での示唆も踏まえ, MixEPa4 からフェナントレン完全分解 *Mycobacterium* 属 EPa45 株 (Kato *et al.*, 2015b) と非分解 *Burkholderia* 属 Bcrs1W 株 (Ohtsubo *et al.*, 2016) を単離した. 各株の単独並びに共培養系を用いた解析の結果, (1) EPa45 株はフェナントレン存在時に生育阻害を受ける Growth Inhibition (GI) 現象[フェナントレン最小寒天培地でのコロニー形成単位 (cfu) が栄養寒天培地の場合に比べて  $10^3$  倍減少]を示すが, 共存 Bcrs1W 株が本 GI 現象を緩和する Suppression of Growth Inhibition (SGI) 現象[EPa45 株のフェナントレン含有最小寒天培地での cfu は EPa45 株単独時に比べて Bcrs1W 株共存時に  $10^3$  倍増加] (Fig. 2), そして, (2) EPa45 株のフェナントレン分解能が Bcrs1W 株共存時に増強される Acceleration of Degradation by Non-degrader (ADN) 現象[フェナントレン最小液体培地での EPa45 株によるフェナントレン消失は EPa45 株単独時に比べて Bcrs1W 共存時に早い] (Fig. 3), を見出した(加藤ら, 2015). また, 米国土壌由来で我々が様々な研究に用いてきた *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株 (Kishida *et al.*, 2017; Nagata

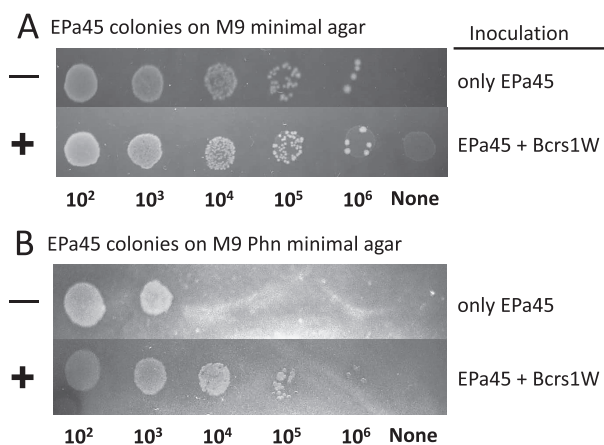
*et al.*, 2014; Nishiyama *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2017) が EPa45 株に対して, Bcrs1W 株と同様の SGI 効果を示すが, ADN 現象は示さないという予備的成果を得ていた.

本研究では, 上記のメタゲノム解析の成果と EPa45 株の GI 現象と Bcrs1W 株による SGI 現象の知見をもとに, 両現象の更なる解析, そして, 両現象に関して, ゲノムレベルの遺伝子発現の観点からの検討と細菌界における広範な存在性の検討を実施した.

## 実験方法

### 使用菌株と培養条件

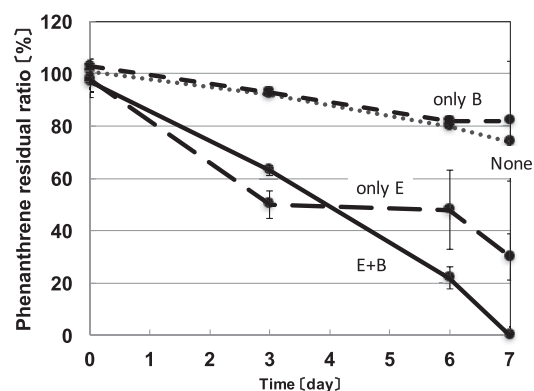
本研究で使用したほとんどの細菌株は研究室保存菌株である. 大腸菌は K12 株由来の野生型 BW25113 株並びにその誘導體である (Baba *et al.*, 2006). 菌株は 30°C の好気条件で培養した. 完全液体培地としては 1/3LB 培地 (Nagata *et al.*, 2014) を用い, 最小液体培地としては M9 培地 (Komatsu *et al.*, 2003) で炭素・エネルギー源としてフェナントレン, ナフタレン, ビフェニル, またはカルバゾールを 2.5 mM の濃度で用いた. なおフェナントレンは溶解度がたいへん低いのでジメチルスルホキシドを溶媒に用いて溶かした. 液体培地に最終濃度 1.5% になるように精製寒天末 (ナカライ) を加えることで固体培地を調製した.



**Fig. 2.** Colony formation of *Mycobacterium* EPa45 with and without *Burkholderia* Bcrs1W on Phn-containing and non-containing M9 minimal agar plates. **(A)** Colony formation on M9 minimal agar plates. **(B)** Colony formation on M9 Phn minimal agar plates. Dilution rates of the EPa45 cell suspension are shown below each panel. “None” means no inoculation of EPa45 cells. “+” at the left of each panel indicates the co-cultivation with Bcrs1W cells. See Materials and Methods for details. The photographs were taken using transmitted light, and only the EPa45 colonies were visible. Note that very minute colonies of Bcrs1W were visible and invisible on the photographs when the reflected and transmitted light conditions, respectively, were used.

### 培養液でのフェナントレン量測定

フェナントレンを添加した細菌培養液に当量の酢酸エチルを添加し, ボルテックスで良く攪拌後に遠心し, 回収した酢酸エチル画分を GC/MS 装置 (GP2010, Shimadzu)



**Fig. 3.** Enhanced degradation of Phn by *Mycobacterium* EPa45 in the presence of *Burkholderia* Bcrs1W. Degradation of Phn was monitored using GC-MS. only E, cultivation of EPa45; only B, cultivation of Bcrs1W; E+B, co-cultivation of both strains; and none, no inoculation of bacterial strains. Three independent experiments were performed.

で分析した (Nagayama *et al.*, 2015).

DNAとRNAの調製,ならびに定量的逆転写PCR (qRT-PCR)

これらは常法に従った (Kato *et al.*, 2015a; Sato *et al.*, 2017).

ゲノム配列の決定と RNA-seq 解析

配列決定にはイルミナ社の MiSeq あるいはロシユ社の 454 GS FLX Titanium との併用により実施した. ゲノム DNA から mate-pair と paired-end のライブラリーを構築後に塩基配列を解読し, GenoFinisher と AceFileViewer の両ソフトウェア (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>) を用いてフィニッシングをした. アノテーションは NCBI Microbial Genome Annotation Pipeline ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)) を用いて行った. また, 液体または固体培地で培養した菌株から調製した RNA を用い, 東京農業大学生物資源ゲノム解析センターにおいてイルミナ社 HiSeq 2500 による paired-end シーケンシングで RNA-seq 解析を行った.

GI 現象と SGI 現象の検討

PAH 完全分解 *Mycobacterium* 属細菌株の GI 現象検出に際しては, 1/3LB 寒天培地全面で培養した菌株を M9 培地で 2 回洗浄後, OD<sub>660</sub> 値を 1.0 に調整した細胞懸濁液を得た. 本懸濁液を 10 倍ずつ希釈した系列を作製し, 各 5 $\mu$ L をそれぞれ PAH 添加ならびに非添加の M9 寒天培地に接種後, 10 日培養した後のコロニー形成能を観察した. 前者培地でのコロニー形成能が後者培地に比べて著しく減少した場合に GI 現象が認められたとした. 一方, GI 現象発現株に対する共存異種細菌株による SGI 現象の検討は, M9 培地で OD<sub>660</sub> 値を 1.0 に調整した後者株懸濁液を 10<sup>3</sup> 倍希釈した後に *Mycobacterium* 属細菌懸濁液と混合した. そして, 混合液と *Mycobacterium* 属細菌のみの懸濁液の各 5 $\mu$ L をそれぞれ PAH 添加 M9 寒天培地に接種後 10 日培養した. *Mycobacterium* 属細菌のコロニー形成能がその単独培養時に比べて混合培養時に著しく回復した場合に SGI 現象が認められたとした.

SGI 効果消失変異株の探索

OD<sub>660</sub> 値を 1.0 に調整した EPa45 株細胞懸濁液と SGI 効果検証株細胞懸濁液をそれぞれ 10<sup>4</sup> 倍と 10<sup>3</sup> 倍希釈した. 各希釈液を混合後, 5 $\mu$ L をフェナントレン添加 M9 寒天培地に接種し, 10 日後の培地での EPa45 株のコロニー形成能を検討した. このような条件でコロニー形成能を EPa45 株に賦与しない変異株を SGI 効果消失変異株とした.

非分解菌の生育能強度と SGI 効果強度の検討

本研究における非分解菌株の「生育能強度 (Growth Index)」は, OD<sub>660</sub> 値を 1.0 に調整した当該株の 10 倍毎の希釈液 5 $\mu$ L をフェナントレン添加 M9 寒天培地の接種し, 10 日後の培養時に微小コロニー形成可能な最大希釈率として定義した. 一方, SGI 効果は生育能強度算出に用いた非分解菌株の 10 倍毎の希釈液と OD<sub>660</sub> 値を 1.0 に調整した EPa45 株細胞懸濁液の 10<sup>4</sup> 倍希釈液とを混合後に 5 $\mu$ L をフェナントレン添加 M9 寒天培地の接種し, 10 日後の培養時に EPa45 株のコロニー形成能を検討した. そして, 本コロニー形成能を賦与可能な非分解菌株の最大希釈倍率を SGI 効果強度 (SGI Index) と定義した. 両強度はそれぞれ 3 回の独立した実験で検討した. なお, 寒天培地上でのコロニー形成能のデジタル画像化には, 分解菌株に関しては反射光を, 非分解菌株に関しては透過光を用いて実施した.

結果および考察

*Mycobacterium* 属 EPa45 株と *Burkholderia* 属 Bcrs1W 株のゲノム情報

EPa45 株は 6.2 Mb の環状染色体を有し, 約 5,600 のタンパク質をコードすると推定され, また, 16S rRNA 遺伝子の配列解析では *M. gilvum* に分類された (Kato *et al.*, 2015b). そして, 本株はフェナントレンを 7 つの酵素で *o*-フタル酸に, 続いて 2 つの酵素によりプロトカテク酸, そして多数酵素により  $\beta$ -ケトアジピン酸経路で TCA 回路にまで代謝すると推定された. また, 本株ではゲノムサイズが似ている他細菌に比べると毒性が強烈な活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 除去に関連すると想定される酵素遺伝子の数が数個のみという特徴があった. 一方, ゲノムサイズが 9.3 Mb であった Bcrs1W 株は他の多くの *Burkholderia* 属株に見られるように 3 本の環状染色体から構成されていた (Ohtsubo *et al.*, 2016). 16S rRNA 遺伝子の配列解析では *B. caribensis* に分類され, 約 8,000 のタンパク質をコードすると推定され, フェナントレン分解の初期段階に必要な酵素遺伝子は見いだせなかった.

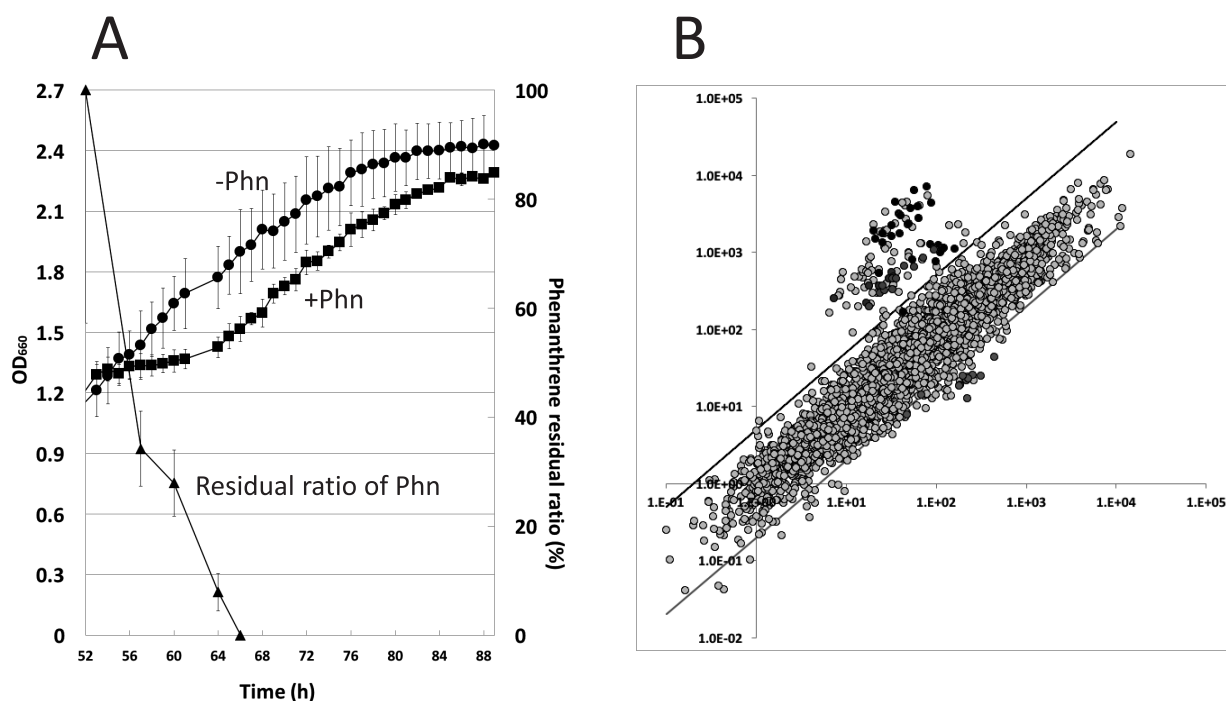
EPa45 株のフェナントレンによる GI 現象とゲノム情報発現

対数増殖期まで増殖させた EPa45 株の液体培養液にフェナントレンを添加すると, フェナントレンが消失するまでの 12 時間では OD<sub>660</sub> 値の増加が認められず, その後 OD<sub>660</sub> 値が上昇した (Fig. 4A). 培養液細胞の LIVE/DEAD 染色 (タカラバイオ) では, フェナントレン添加後 5 時間めで死細胞の割合が上昇し, 8 時間めではその割合が約 80% に達し, 12 時間めには死細胞の割

合が急激に減少していた。従って、フェナントレンそのものか、その分解過程で生じた中間産物或いは副産物が細胞毒性を示したと唆された。ビフェニル分解細菌株ではビフェニル分解過程でROSが生成されること (Ponce *et al.*, 2011) から、EPa45株でもフェナントレン分解に伴いROSが生成され、その結果として細胞死に至った可能性があった。この可能性は本株でROS除去関連酵素遺伝子が少ないことと整合性がある。EPa45株のフェナントレンによるGI現象へのROSの関与を検討するために、フェナントレン添加培養液に過酸化水素除去に関わるカタラーゼや強力な還元能のあるアスコルビン酸を加えたが、両者ともGI現象を緩和しなかった。ただ、これらの予備的結果では、ROSでも最も細胞毒性が強いヒドロキシラジカルの関与は否定できない。

上記EPa45株液体培養でフェナントレン添加後の8時間目でのRNA-seq解析を行い、フェナントレン非添加のコントロールの当該解析と比較した (Fig. 4B)。その結果、フェナントレン添加で5倍以上の転写が増大・減少した遺伝子をそれぞれ123と66見出した。増大した

遺伝子の約2割はフェナントレン分解に直接関与する酵素遺伝子群で50-100倍ほどの増大率であり、このような増大はqRT-PCR解析でも確認できた。一般に様々なPAH分解細菌株において、PAH存在時にのみ分解酵素遺伝子群が転写される (Nojiri *et al.*, 2015) が、このような機構はEPa45株にも該当した。また、細胞外に放出されて $\text{Fe}^{3+}$ イオンを捕捉するシデロフォアの合成酵素遺伝子や $\text{Fe}^{3+}$ -シデロフォア複合体の細胞内取り込み系、そして鉄硫黄クラスター合成系などの鉄代謝遺伝子の転写も10-44倍ほど増大しており、さらには、ROS分解に関与する酵素系の一部遺伝子の転写も増大していた。ダイオキシン代替化合物として微生物分解研究に使用されるカルバゾールの好気分解が可能な*Pseudomonas*属細菌CA10株では、そのトランスクリプトーム解析でカルバゾール分解時に上記のような鉄の獲得・取り込み系遺伝子の転写増大がおきる (Shintani *et al.*, 2010)。カルバゾール分解を司る多くの酵素は鉄硫黄タンパク質であり、当該酵素の大量発現と機能発揮に際して細胞内の鉄イオンが酵素に捕捉される結果として細胞内の鉄が減少



**Fig. 4.** Transcriptionally up- and down-regulated genes of *Mycobacterium* EPa45 in the presence of Phn. Three independent experiments were performed. **(A)** Phn degradation and growth of EPa45 in 1/3LB medium after the addition of Phn at time point 52 h. Square and circle: OD<sub>660</sub> values with and without the addition of Phn, respectively. Triangle: residual ratio of Phn. Note that cultivation of EPa45 in 1/3LB started at time point 0 h. **(B)** RNA-seq analysis-based scattered plots of genes affected by the presence of Phn. This analysis was carried out using the cells that were recovered at time point 60 h. The genes whose transcription were up- and down-regulated by more than 5-fold in the presence of Phn are positioned over the upper slash mark and below the lower one, respectively.

し、このため細胞が鉄を外部環境から取り入れる機能が高まったと考えられている。EPa45株の転写が増大したフェナントレン分解酵素遺伝子群もその産物が鉄硫黄タンパク質と示唆され、EPa45株でもフェナントレン分解に伴い細胞内の鉄濃度が著しく低下したのであろう。一方、好気呼吸の酸化的リン酸化に関与するNADHデヒドロゲナーゼ遺伝子群の顕著な転写量減少が認められたが、この転写量減少はフェナントレンによる細胞死との関連性が高いと示唆された。

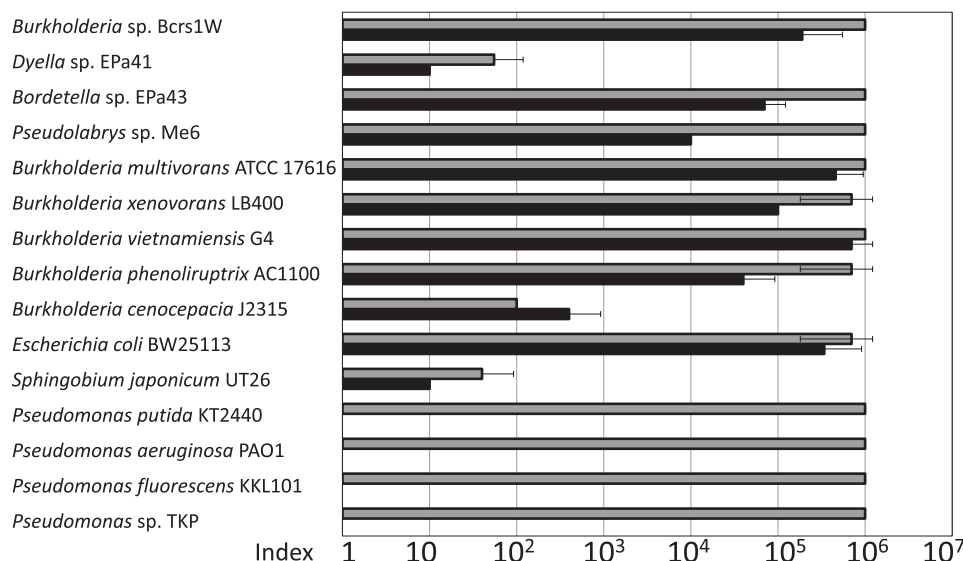
#### SGI現象発揮に必要な条件

上述のように、*Mycobacterium*属EPa45株はフェナントレン含有培地でGI現象を示し、*Burkholderia*属Bcrs1W株共存により緩和されるSGI現象が認められたが、本SGI現象発現に必要なBcrs1W株由来画分等を検討した。その結果、本株の培養液上清や粗細胞抽出液、オートクレーブ処理した死細胞はSGI効果を発揮しなかった。また、固体培地上で両株を物理的に離して接種した場合にはSGI現象が認められなかった。以上のことから、Bcrs1W株のSGI現象発揮にはその生細胞とEPa45株との直接的接触が必要と判明した。ホモセリンラクトンやフェロモン等の固体培地でも物理的拡散が可能な低分子性化合物による異種細菌細胞間での情報伝達

系や協調代謝系がよく知られているが、このような類の拡散性化合物の異種細菌間交換によるSGI現象発揮の可能性は低いと強く示唆された。

#### SGI現象を示す細菌株の探索

MixEPa4の構成細菌株でフェナントレン分解能を有さない3株(*Dyella*属EPa41株と*Pseudolabrys*属Me6株、アルカリゲネス科の*Bordetella*属EPa43株)について、各株のEPa45株に対するSGI現象発揮を検討したところ、効果強度は違うものの、いずれもSGI現象を示した(Fig. 5)。MixEPa4構成4株中で*Burkholderia*属のBcrs1W株が最も大きなSGI効果強度を示したため、MixEPa4非由来のフェナントレン非分解*Burkholderia*属5株を用いて検討した結果、いずれもSGI効果を示した。一方、フェナントレン非分解の*Pseudomonas*属細菌4株はいずれもSGI効果を示さなかった。これら*Pseudomonas*株の共存でEPa45株コロニーが小型化したことから、*Pseudomonas*属細菌株がM9固体培地の寒天末にわずかに含まれた炭素源をEPa45株との競争で奪い取ったと示唆された。また、大腸菌K-12株由来BW25113株(Baba *et al.*, 2006)も強力なSGI効果を生じた(Fig. 5)。



**Fig. 5.** SGI index of non-Phn-degrader and its growth index using M9 Phn minimal agar plate. Definition of SGI and growth indices (black and grey bars, respectively) is described in Materials and Methods; the larger indices indicate stronger SGI effect and growth ability, respectively, on M9 Phn minimal agar plate. Three independent experiments were carried out for each strain to obtain the average value with its standard deviation. The first four strains were the members in MixEPa4. *E. coli* and *B. cenocepacia* J2315 were derived from humans, and the other strains from various soils.

### *Mycobacterium* 属細菌の PAH による GI 現象と共存細菌株による SGI 現象

本研究過程で EPa45 株が、フェナントレンのみならずナフタレンやビフェニルの完全分解能を有するが、カルバゾールの分解能はないことを見出した。ナフタレンとビフェニルは EPa45 株に GI 現象を發揮し、本 GI 現象は Bcrs1W 株や ATCC 17616 株の共存下で緩和された。一方、カルバゾールは GI 現象を示さなかった。

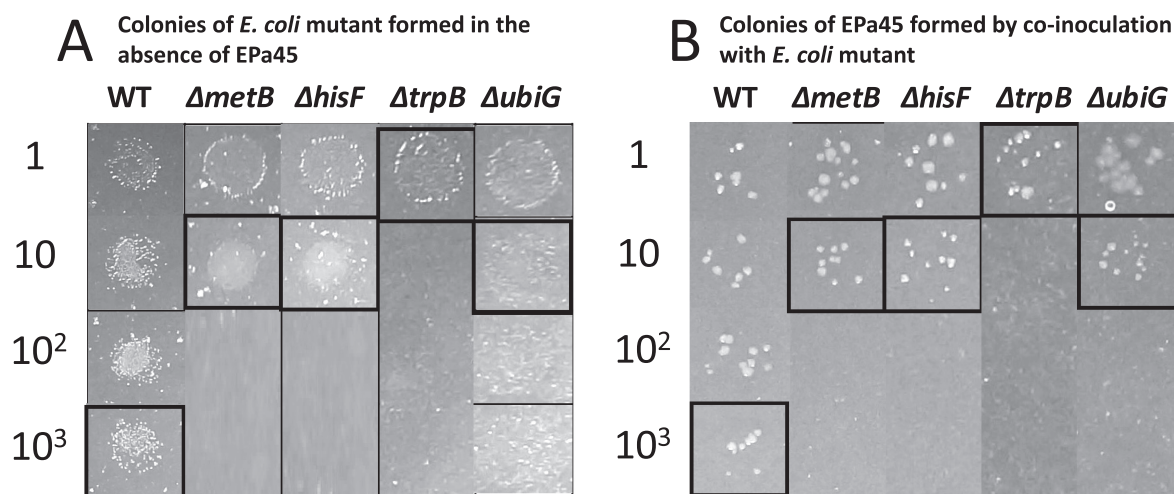
EPa45 株の PAH による GI 現象と共存異種細菌株による SGI 現象が他の *Mycobacterium* 属細菌株でも該当するかを、フェナントレンとナフタレン、ビフェニルの完全分解能を有する米国土壤由来 *M. vanbaalenii* PYR-1 株 (Kim *et al.*, 2008) を用いて検討した。その結果、PYR-1 株は 3 種 PAH に GI 現象を示すとともに、Bcrs1W 株や ATCC 17616 株が PYR-1 株に対して SGI 現象を示した。

以上の結果から、少なくとも PAH 完全分解能を有する上記 *Mycobacterium* 属 2 株では、(1) 毒性のある PAH 自体やその分解産物によって PAH 含有培地でのコロニー形成能が大きく低下するとともに、(2) これら *Mycobacterium* 株のコロニー形成能は共存 *Burkholderia* 属細菌株によって大幅に緩和される、というおそらく普遍性のある微生物現象の存在が強く示唆できた。なお前述の人工的汚染化土壌からフェナントレン完全分解能のある *Burkholderia* HB-1 株 (Ohtsubo *et al.*, 2015) を単離していたが、本株はフェナントレンによる GI 現象を示さなかった。

### SGI 現象消失突然変異体の選抜と解析

大腸菌では野生型 BW25113 株を親株として破壊可能な遺伝子を各々欠失させて 3,884 株からなる Keio collection が得られている (Baba *et al.*, 2006)。そこで本 collection を用いて、EPa45 株で見られた GI 現象に対して SGI 現象を示さない大腸菌変異株のスクリーニングを行い、SGI 効果消失変異株を 100 程取得した。その 9 割弱はアミノ酸・核酸塩基・ビタミンなどの生合成系遺伝子の欠失、そして、その発現制御に関与する遺伝子の欠失、残りは金属イオン取り込み系や DNA の複製・組換え・修復系の遺伝子の欠失であり、いずれも SGI 現象發揮に特異的に関わると容易に想定できる遺伝子の変異は見いだせなかった。ただ、Keio collection には大腸菌の生育に必須な遺伝子の欠失変異体は存在せず、このような必須遺伝子群に SGI 効果を發揮するものが含まれている可能性がある。また、大腸菌ゲノムには同じ機能を支配する遺伝子が 2 つ以上存在する場合もあり、SGI 効果發揮に関与する 1 つの遺伝子を欠失させても別遺伝子の機能により SGI 効果が發揮された可能性もあった。

野生型大腸菌株はフェナントレン含有 M9 寒天培地で微小コロニーを形成したが、SGI 効果消失変異株の微小コロニー形成能は様々な割合で著しく減少していた (Fig. 6A)。そして、変異株での微小コロニー形成能の度合い (生育能強度) は EPa45 株に対する SGI 効果發揮の度合い (SGI 効果強度) と正の相関を示した (Fig. 6B)。このような大腸菌で観察された現象は、*B. multi-*



**Fig. 6.** Colony formation of SGI-defective mutants of *E. coli* on M9 Phn minimal agar plate and SGI effect of the *E. coli* mutants on the colony-forming ability of *Mycobacterium* EPa45. (A) Inoculation of only *E. coli* mutant. (B) Co-inoculation of EPa45 with *E. coli* mutant. Dilution rates of *E. coli* cell suspension are depicted to the left of each panel. Box indicates the place where the *E. coli* mutant or EPa45 colonies were formed at the highest dilution rate of *E. coli* suspension. The photographs were taken under the reflected and transmitted light conditions so as to observe the minute colonies of *E. coli* (in panel A) and only the EPa45 colonies (in panel B), respectively.

*vorans* ATCC 17616 株とその栄養要求性突然変異株 (Komatsu *et al.*, 2003) を用いた場合でも認められた (Fig. 7). さらに, 他の SGI 効果を示した広範な前述細菌株においても, フェナントレン添加 M9 寒天培地での生育能強度と SGI 効果強度の間に正の相関があった (Fig. 5). フェナントレン含有 M9 寒天培地を用いて検討した各種細菌株の SGI 効果発揮には EPa45 株との直接的接触が必要であったが, 各種細菌株の細胞表層にフェナントレンが吸着されることが SGI 現象に繋がっているのかもしれない. この可能性の妥当性を各種細菌株表層へのフェナントレン吸着の定量化で検討するとともに, 該当時には吸着に関与する細胞機能を明らかにしていきたい. ただ, 自然環境には栄養要求性細菌がほとんど存在しないことを踏まえると, 生育能と SGI 効果の強度間での相関性提示はたぶん実験室系に限定されたものであり, 自然界での現象にそのまま該当させるには隔たりが大きいといえよう. 従って, 細胞表層へのフェナントレン吸着以外の機構による SGI 効果発揮を念頭においた別の視点からの解析が必要である.

#### 固体培地での共培養時におけるゲノム情報発現

EPa45 株のフェナントレンによる GI 現象に対する ATCC 17616 株の SGI 現象に関して, 両株のゲノムレベルでの遺伝子転写変動を検討した. このために, フェナントレン添加と非添加の M9 寒天培地で各株単独または両株共存で培養したときの RNA-seq 解析をおこなった. そのデータの初歩的解析で以下の点が判明した.

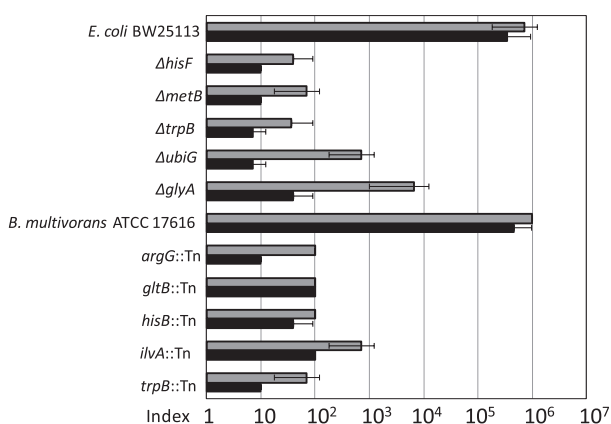


Fig. 7. SGI index of SGI-defective non-Phn-degrader and its growth index using M9 Phn minimal agar plate. SGI and growth indices are depicted as black and grey bars, respectively. See Komatsu *et al.* (2003) for the transposon-inserted auxotrophic mutants of *B. multivorans* ATCC 17616.

(1) EPa45 株単独の場合には, 上記液体培地で取得した場合と同様の結果を得た.

(2) ATCC 17616 株単独の場合には, フェナントレン添加により転写が5倍以上増大した遺伝子は20に満たなかったが, この中には複数抗生物質の細胞外排出に関与する薬剤排出トランスポーターを支配する遺伝子群が存在した. 複数抗生物質の細胞外排出に関わる当該トランスポーターの存在が *Burkholderia* 属で知られている (Schweizer, 2012) が, このような系が PAH 排出にも関与する可能性を本研究で初めて示した. 数種の抗生物質が PAH と化学構造に類似性を示すことを踏まえると, この可能性は妥当といえるかもしれない.

(3) 単独株時にフェナントレン存在下で認められ各株の転写増大遺伝子の転写は, 両株共存時でフェナントレン存在条件においても増大していた.

(4) 両株共存でフェナントレン存在時に特異的に転写増大していた遺伝子が見出された. EPa45 株では, ログドナーゼスーパーファミリーに属するタンパク質 RdhA の遺伝子が該当した. 本スーパーファミリータンパク質は細胞の酸素ストレスに耐性を賦与する (Cereda *et al.*, 2007) とされ, 共存していた ATCC 17616 株が何らかの未知機構で EPa45 株の ROS による酸素ストレスを誘導した可能性が推定された. 一方, ATCC 17616 株では, フタル酸をプロトカテク酸経路で分解するための遺伝子群が該当した. ちなみに本遺伝子群はフタル酸により転写誘導されることが判明している (Nishiyama *et al.*, 2010). EPa45 株のフェナントレン分解過程で中間産物としてのフタル酸蓄積を予備的実験で見出しており, 本産物が共存 ATCC 17616 株のフタル酸分解系遺伝子群の転写誘導に関与したと推定された. ただ, EPa45 株のフェナントレン分解は ATCC 17616 株共存で促進されない知見 (上述) を踏まえると, EPa45 株フェナントレン分解経路で分解が順調に進行しないために細胞内に蓄積したフタル酸以前の中産物の毒性を ATCC 17616 株が何らかの機構で除去し, その結果としての ATCC 17616 株 SGI 効果発揮に至った可能性がある.

以上のような転写量が顕著に増加する遺伝子に関する予備的な成果は qRT-PCR 等で詳細に検証する必要がある. また, 転写量が顕著に減少する遺伝子の提示・検証とその解析が今後必要である. また, EPa45 株のフェナントレン分解能消失株やフェナントレン耐性株, そして ROS 除去系の欠損・過剰株の単離・解析, さらには, ATCC 17616 を含む *Burkholderia* 株の SGI 効果特異的消失株の単離・解析を実施することで, GI 現象とこれに対応する SGI 現象をそれぞれ支配する分子機構の詳細な提示をめざす予定である.



## 要 約

芳香族系化合物による人工的汚染化土壌由来のフェナントレン分解コンソーシアム MixEPa4 を構成していたフェナントレン完全分解 *Mycobacterium* 属 EPa45 株はフェナントレンによる生育阻害 (GI) 現象を示し、本現象は MixEPa4 由来の非分解 *Burkholderia* 属 Bcrs1W 株共存で緩和される SGI 効果を見出し、本研究では、両現象の更なる詳細な解析とともに、両現象の普遍的存在の有無の検討を実施した。EPa45 株のゲノム解析で本株のフェナントレン分解経路と分解酵素・遺伝子を推定し、RNA-seq 解析で本推定の妥当性を示した。本株のフェナントレンによる GI 現象時には菌の細胞死がおきていた。この細胞死を惹起するひとつの可能性として、毒性のあるフェナントレン自体あるいはその分解中間産物でフタル酸以前の未同定毒性産物によって上昇した活性酸素種 (ROS) の関与が示唆された。一方、Bcrs1W 株の SGI 効果発揮には、その生細胞の EPa45 株との物理的接触が必要であった。また、*B. multivorans* ATCC 17616 株を含む分類学的に広範な細菌株が生育阻害緩和 (SGI) 効果発揮能を備えていたが、各株の SGI 効果強度はこれを検定するために用いた培地での各株の生育能強度と正の相関性を示した。他方、EPa45 株と ATCC 17616 株の共存時にフェナントレンが存在すると、前者株での酸素ストレス除去系発現の上昇が RNA-seq データの初歩的解析で示唆され、本除去系発現上昇に後者株が何らかの機構で寄与していると推定された。以上の研究で示唆・推定された点に関して EPa45 株のフェナントレン非分解や耐性の変異株の取得・解析などで今後検討する必要がある。本研究ではさらに、EPa45 株はフェナントレン以外に完全分解可能な他 2 種の多環芳香族炭水化合物 (PAH) に対しても GI 現象を示すとともに、本現象を上記 2 種の *Burkholderia* 株が緩和できること、そして、3 種 PAH の完全分解可能な別の *Mycobacterium* 属細菌株もいずれの PAH に対する GI 現象とこれら GI 現象に対する 2 種 *Burkholderia* 株の SGI 効果発揮を示した。このように、PAH による GI 現象とこれに対応する SGI 現象に関しては、少なくとも研究対象にした 2 種 *Mycobacterium* 属細菌株で該当する知見を得た。

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 口頭発表

- 1) 加藤広海, 小川なつみ, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2015. メタゲノム情報を基盤とした汚染土壌の細菌コンソーシアムの研究. (ポスター発表) 第 30 回日本微生物生態学会年次大会 (10 月 17-20 日, 土浦)

- 2) 守屋梓, 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2016. フェナントレン分解細菌 *Burkholderia* sp. HB-1 株のゲノムと芳香族分解遺伝子の解析. (ポスター発表) 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 (3 月 4-5 日, 東京)
- 3) 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2016. 遺伝学的解析を用いた芳香族化合物分解コンソーシアムにおける分解菌と非分解菌の共存機構の解明. (ポスター発表) 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 (3 月 4-5 日, 東京)
- 4) 大坪嘉行, 加藤広海, 永田裕二, 津田雅孝. 土壌細菌叢変動とレジームシフト. 2016. 第 89 回日本細菌学会総会 (3 月 22-25, 大阪)
- 5) 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2016. フェナントレン分解コンソーシアムに存在する非分解菌の分解菌に対する効果. (ポスター発表) 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 札幌)
- 6) 守屋梓, 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2016. フェナントレン分解コンソーシアム Mix-EPa4 における構成細菌間の相互作用. (ポスター発表) 日本農芸化学会 2016 年度大会 (3 月 27-30 日, 札幌)
- 7) 小川なつみ, 石毛太郎, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 吉川博文, 津田雅孝. 2017. フェナントレン分解細菌 *Mycobacterium* sp. EPa45 株のフェナントレンに対する転写応答. (ポスター発表) 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (3 月 2-4 日, 藤沢)
- 8) 池内倫子, 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. フェナントレン分解細菌の基質耐性突然変異株の取得と解析. (ポスター発表) 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 (3 月 2-4 日, 藤沢)
- 9) 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. フェナントレン分解細菌の生育阻害の緩和に対する非分解細菌の生細胞の重要性. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (3 月 17-20 日, 京都)

## 原著論文

- 1) Kato, H., Ogawa, N., Ohtsubo, Y., Oshima, K., Toyoda, A., Mori, H., Nagata, Y., Kurokawa, K., Hattori, M., Fujiyama, A. & Tsuda, M. 2015. Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPa45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. *Genome Announc.* 3: e00782-15.
- 2) Kato, H., Mori, H., Maruyama, F., Toyoda, A., Oshima, K., Endo, R., Fuchu, G., Miyakoshi, M., Dozono, A., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Hattori, M., Fujiyama, A., Kurokawa, K. & Tsuda, M. 2015. Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res.* 22: 413-424.
- 3) Ohtsubo, Y., Mori, A., Kato, H., Ogawa, N., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2015. Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738). *Genome Announc.* 3: e01283-15.
- 4) Ohtsubo, Y., Nonoyama, S., Ogawa, N., Kato, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2016. Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp. EPa45. *J. Biotechnol.* 228: 67-68.

その他

- 1) 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝. 2015. メタゲノム情報を基盤とした土壌細菌コミュニティの解析. 日本微生物生態学会誌 **30**: 57-64.
- 2) 加藤広海, 津田雅孝. 2017. 土壌細菌叢メタゲノムの時間的変動. 生体の科学 **68**: 160-164.
- 3) 加藤広海, 津田雅孝. 2017. 土壌細菌叢の化学的攪乱に対するロバスト性. 化学と生物 **55**: 466-467.

## 保存機関に寄託した菌株

*Mycobacterium* sp. EPa45 (NBRC 110737) と *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738), *Burkholderia* sp. Bcrs1W (NBRC 110739) を (独) 製品評価基盤機構 Biological Resource Center に寄託した.

## 謝 辞

本研究実施に当たりまして研究助成をして頂きました公益財団法人発酵研究所に深く御礼申し上げます。また、本研究実施に大きく尽力して頂いた小川なつみ氏と加藤広海氏、大坪嘉行氏を始めとする東北大学大学院生命科学研究所の研究に携わって頂いた関係者の皆様に感謝いたします。

## 文 献

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. **2**: 2006.0008.
- Cereda, A., Carpen, A., Picariello, G., Iriti, M., Faoro, F., Ferranti, P. & Pagani S. 2007. Effects of the deficiency of the rhodanese-like protein RhdA in *Azotobacter vinelandii*. FEBS Lett. **581**: 1625-1630.
- Kato, H., Mori, H., Maruyama, F., Toyoda, A., Oshima, K., Endo, R., Fuchu, G., Miyakoshi, M., Dozono, A., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Hattori, M., Fujiyama, A., Kurokawa, K. & Tsuda, M. 2015a. Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. DNA Res. **22**: 413-424.
- Kato, H., Ogawa, N., Ohtsubo, Y., Oshima, K., Toyoda, A., Mori, H., Nagata, Y., Kurokawa, K., Hattori, M., Fujiyama, A. & Tsuda, M. 2015b. Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPa45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. Genome Announc. **3**: e00782-15.
- 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝. 2015. メタゲノム情報を基盤とした土壌細菌コミュニティの解析. 日本微生物生態学会誌 **30**: 57-64.
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D. & Cerniglia C. E. 2008. Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Biodegradation **19**: 859-881.
- Kishida K., Inoue, K., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2017. Host range of the conjugative transfer system of IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and characterization of its *oriT* region and relaxase. Appl. Environ. Microbiol. **83**: e02359-16.
- Komatsu, H., Imura, Y., Ohori, A., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2003. Distribution and organization of auxotrophic genes on the multichromosomal genome of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. J. Bacteriol. **185**: 3333-3343.
- Mori, H., Maruyama, F., Kato, H., Toyoda, A., Dozono, A., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Fujiyama, A., Tsuda, M. & Kurokawa, K. 2014. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. DNA Res. **21**: 217-227.
- Nagata, Y., Senbongi, J., Ishibashi, Y., Sudo, R., Miyakoshi, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. 2014. Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. Microbiology **160**: 883-891.
- Nagayama, H., Sugawara, T., Endo, R., Ono, A., Kato, H., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2015. Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. Appl. Microbiol. Biotechnol. **99**: 4453-4470.
- Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Nagata Y. & Tsuda, M. 2010. Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by in vivo expression technology. Environ. Microbiol. **12**: 2539-2558.
- Nojiri, H., Tsuda, M., Fukuda, M. & Kamagata, Y. (ed.) 2015. Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve. Springer-Verlag, Tokyo.
- Ohtsubo, Y., Moriya, A., Kato, H., Ogawa, N., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2015. Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Burkholderia* sp. HB-1 (NBRC 110738). Genome Announc. **3**: e01283-15.
- Ohtsubo, Y., Nonoyama, S., Ogawa, N., Kato, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. 2016. Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp. EPa45. J. Biotechnol. **228**: 67-68.
- Ponce, B. L., Latorre, V. K., Gonzalez, M. & Seeger, M. 2011. Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400. Enzyme Microb. Technol. **49**: 509-516.
- Sato, T., Nonoyama S., Kimura, A., Nagata, Y., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. 2017. The small protein, HemP, is a transcriptional activator for the hemin uptake operon in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. Appl. Environ. Microbiol. **83**: e00479-17
- Schweizer, H. P. 2012. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. Future Microbiol. **7**: 1389-1399.
- Shintani, M., Takahashi, Y., Tokumaru, H., Kadota, K., Hara, H., Miyakoshi, M., Naito, K., Yamane, H., Nishida, H. & Nojiri, H. 2010. Response of the *Pseudomonas* host chromosomal transcriptome to carriage of the IncP-7 plasmid pCAR1. Environ. Microbiol. **12**: 1413-1426.

# 窒素循環研究のパラダイムシフトを目指した未培養性硝化細菌の 網羅的高速ハンティング

常 田 聡

早稲田大学先進理工学部生命医科学科

〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 早稲田大学先端生命医科学センター

## Comprehensive and High-Throughput Hunting of Uncultured Nitrifiers for Paradigm Shift in Nitrogen Cycle Research

Satoshi Tsuneda

Department of Life Science and Medical Bioscience,  
School of Advanced Science and Engineering, Waseda University  
2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan

Nitrification is an important reaction in the biological nitrogen removal process in wastewater treatment plants (WWTPs). As ammonia-oxidizing microbes are slow-growing and sensitive to environmental factors such as free ammonia, pure strains are hard to obtain, preventing our understanding of their physiological characteristics. To conquer this hurdle, we report a high-throughput isolation technique based on scattering signatures, which exploits the tendency of many ammonia-oxidizing bacteria (AOB) to form microcolonies in activated sludge. The AOB microcolonies were directly sorted from the activated sludge without long incubation and enrichment bias, and were sequentially inoculated into 96-well microtiter plates containing growth medium. Phylogenetic analysis of the pure strains isolated in this study revealed a deeply branching and unrecognized lineage and diversity within the genus *Nitrosomonas*, beyond our expectation.

Key words: activated sludge, isolation, microcolony, nitrification, *Nitrosomonas*

### 緒 言

硝化反応は、排水処理施設の生物学的窒素除去プロセスにおいて重要な反応である。硝化反応は、アンモニア酸化古細菌 (AOA) とアンモニア酸化細菌 (AOB) によってアンモニアを亜硝酸に変換するアンモニア酸化反応、亜硝酸酸化細菌 (NOB) によって亜硝酸を硝酸に変換する亜硝酸酸化反応の2つのステップで構成されている。近年、一種の細菌がアンモニア酸化と亜硝酸酸化の両方を行うことができる Comammox 細菌が発見され (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015)、窒素循環に関わる微生物生態の研究は大きな変革期を迎えている。一般的に、AOBは増殖速度が遅く、アンモニアのような様々な環境因子に対して感受性が高いため、アンモニ

ア酸化は排水処理施設の窒素除去において律速段階であると認識されている (Wagner *et al.*, 1995)。排水処理施設に流れ込むアンモニアは、自然環境中のアンモニアよりも低濃度であることから (Wells *et al.*, 2009)、排水処理施設ではAOAよりもAOBが優占していることが多い (Mußmann *et al.*, 2011)。したがって、水処理効率を向上させるためには排水処理施設に棲息するAOBの生理生態学的性質を理解することが重要である。また、新規に発見されたComammox細菌については知見が乏しく、排水処理施設においてどの程度優占しているのか不明であるため、今後の研究が期待される。

近年、16S rRNA 遺伝子や *amoA* 遺伝子に基づいた分子生物学的なアプローチや *in situ* 生理解析によって、活性汚泥中のAOBの種の多様性が明らかになってきた。しかし、遺伝子ベースで明らかにされる多様性に比べ、純粋分離された分離株の種類は極めて少ない (Suwa *et al.*, 1994; Koops & Harms, 1985)。排水処理施設における窒素除去の安定性は、AOBの種の多様性によって維

E-mail: stsuneda@waseda.jp

共同研究者：藤谷拓嗣 (早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構)

持されているにも関わらず、分離株の不足が個々のAOBを対象にした生理学的性質の理解を妨げる大きな要因となっている (Suwa *et al.*, 1997; Koops & Pommerening-Röser, 2001; Kowalchuk & Stephen, 2001). 従来、平板プレートや限界希釈法などの古典的な培養法によってAOB分離株は獲得されてきたが、新しい分離培養手法の開発が新規なAOBの獲得を可能にするかもしれない。

私たちの研究グループでは、セルソーターの散乱光を用いてマイクロコロニーを分取する新しい分離培養手法を開発してきた。排水処理施設の活性汚泥から集積したNOBの*Nitrospira* (Ushiki *et al.*, 2013; Fujitani *et al.*, 2014), および微生物固定化担体として有効な硝化グラニュールからAOBの*Nitrosomonas mobilis*の分離株の獲得に成功した (Fujitani *et al.*, 2015). 本手法は、これまで培養の難しい硝化細菌を単離する上で、きわめて有効なアプローチであった。しかしながら、マイクロコロニーを分取するまでに数年間という長期間の集積培養を経ており、集積培養によるバイアスでごく一部の細菌しか獲得することができなかった。こうした障壁を乗り越えるために、私たちは活性汚泥に棲息する多くの硝化細菌がマイクロコロニーを形成していることに着目した (Okabe *et al.*, 1999; Coskuner *et al.*, 2005; Maixner *et al.*, 2006; Gruber-Dorninger *et al.*, 2015). もし、活性汚泥サンプルを直接セルソーターに供試しマイクロコロニーを分取することができれば、未培養な硝化細菌を分離培養する効率が高まるのではないかと着想した。実際に、嫌気/無酸素/好気循環型処理 (A2O) プロセスで運転されている活性汚泥をサンプルソースとして、集積培養を介さず直接マイクロコロニーの分取を試みたところ、*Accumulibacter* や *Nitrospira* が形成するマイクロコロニーを散乱光で選択的に分取することが可能であった (Irie *et al.*, 2016).

本研究では、活性汚泥サンプルからAOBマイクロコロニーを直接分取する技術を報告する。さらに、本技術を用いて獲得したAOBの系統学的な解析を行ったところ、*Betaproteobacteria* 綱に属し、今まで同定されなかった新規なAOBを3種発見することに成功した。本研究で分離培養された新規なAOBは、特徴的な生理学的性質を保持している可能性が示唆された。これらの新しい種の存在が、複雑極める排水処理施設での窒素除去プロセスの安定性に貢献しているのかもしれない。

## 実験方法

### サンプリング, サンプル調製

硝化反応が確認されている東京都の排水処理施設よ

り、活性汚泥サンプル100mLを2014年4月, 2014年7月, 2014年10月, 2015年1月に採取した。以後、これらのサンプルはApr-AS, Jul-AS, Oct-AS, Jan-ASと呼ぶ。全てのサンプルは採取後、分離培養のために速やかに培地を含んだマイクロタイタープレートにマイクロコロニーを播種した。培地組成は、「AOBスクリーニングと継代培養」の項目で記載した。その後、DNA抽出のために、活性汚泥サンプル10mLを-80℃の冷凍庫で保存し、残りの活性汚泥サンプル10mLはFISH解析による顕微鏡観察のため、4%のパラホルムアルデヒドによって固定し、-4℃で保存した (Amann *et al.*, 1990).

### DNA抽出

ISOIL extraction kit (ニッポンジーン) を用い、付属のプロトコルに準拠し、Apr-AS, Jul-AS, Oct-AS, Jan-ASからDNAを抽出した。DNA濃度はNanoDrop分光光度計 (Nanodrop Technologies Inc.) を用いて計測した。

### アンプリコンシーケンスと系統解析

16S rRNA 遺伝子のV1-2領域をターゲットとしたForwardプライマー及びReverseプライマーを用いて、DNA抽出物を増幅させた。増幅産物を対象に、次世代シーケンサー (Ion Torrent; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) によって塩基配列を決定した。続いて、同一菌種のシーケンスを1つのOperational Taxonomic Unit (OTU) とみなし、macQIIMEを用いてUCLUST解析アルゴリズムに従い相同性97%以上のシーケンスを1つのOTUにまとめた。活性汚泥に棲息する*Nitrosomonas* 属の系統樹を作成するために、*Nitrosomonas* 属のシーケンスのみを抽出した。抽出したシーケンスから、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にてBLAST検索することで、近縁種、並びに近縁のクローンを探索した。つづいて、MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) を用いて、マルチプルアライメントを行った。遺伝的距離の計算にp-distanceモデルを使用し、塩基配列に基づいた系統樹作成に近接結合 (NJ) 法を用いた。Bootstrap numberは500とした。

### 蛍光プローブの設計

作成した系統樹に基づいて、*Nitrosomonas* 属をクラスター分類し、クラスター毎に*Nitrosomonas* 属を特異的に染色できるように蛍光プローブを設計した (Abe *et al.*, 2017). 設計したプローブは、5'末端及び3'末端をCy-3で標識した。Tm値とホルムアミド濃度はOligo Calculator (<http://www.ngrl.co.jp/tools/0217oligocalc.htm>) を使用し、算出した。また、汚泥中の全ての微生物を染めるために、真正細菌を網羅的に検出することが

可能なプローブである EUB mix を使用した (Daims *et al.*, 1999). EUB mix は 5' 末端を FITC で標識した.

#### Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法を用いた顕微鏡観察

Amann ら (1990) に準拠し、蛍光プローブをハイブリダイズし、細胞を染色した。染色したサンプルは蛍光顕微鏡または、共焦点顕微鏡を用いて、観察した。FISH により、特異的に染色された AOB を検出し、画像を保存した。全微生物数に占める AOB の割合を求める際は、最低 10 枚の顕微鏡画像から平均の細胞数を算出することを三回繰り返した。

#### 活性汚泥からのマイクロコロニーの分取

活性汚泥を 1.5 mL チューブに 1.0 mL 分注し、超音波破砕機を用いて 1 分間穏やかに分散させた。その後、35  $\mu\text{m}$  ポアサイズのフィルター (Falcon, Co., Ltd., Nagoya, Japan) を用いて大きな凝集体や活性汚泥に含まれる堆積物を取り除き、懸濁液を調製した。続いて懸濁液をセルソーター (FACS Aria, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) に供試した。ドットプロットは凝集体の大きさを表す前方散乱光 (Forward Scatter; FSC) と凝集体の内部構造の複雑さを表す側方散乱光 (Side Scatter; SSC) の 2 つのパラメーターに基づいて展開させた。この際、ドットプロットは最低でも 10,000 イベントを解析した結果を表示させた。各エリアに含まれるドットの数に 100 イベント以上になるようにドットプロット上に複数のエリアを設定した。設定したそれぞれのエリアからスライドガラスにサンプルを播種し、FISH 解析によってマイクロコロニーの存在を確認した。分取したマイクロコロニーの割合はダイレクトカウントによって算出し、最も多くのマイクロコロニーが含まれているエリアを特定した。最後に、特定したエリアから 96 ウェルプレートにマイクロコロニーを一つずつ分注し、以下の条件で培養を行った。

#### AOB のスクリーニングと継代培養

純粋培養に用いた培地の組成は以下の通りである。まず、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.0038–0.304 g/L),  $\text{NaCl}$  (0.116 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.04 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.073 g/L),  $\text{KCl}$  (0.038 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.034 g/L) を含む無機培地に、超純水 1 L で混合し、オートクレーブで滅菌した。一方、超純水 1 L に Trace element (1 mL/L) を添加し、 $\text{NaHCO}_3$  (21 g/L) を加え、pH を 7.8–8.5 の間に調整し、オートクレーブで滅菌した。Trace element の組成は、 $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 mg/L),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (100 mg/L),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (24 mg/L),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (24 mg/L),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (17 mg/L),  $\text{ZnCl}_2$  (68 mg/L),  $\text{Na}$

$\text{MoO}_4$  (24 mg/L), and  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (62 mg/L) とした。Apr-AS, Jul-AS サンプルにおける培地中のアンモニアの終濃度は 10 mg-N  $\text{L}^{-1}$  とし、Oct-AS, Jan-AS は 10 または 50 mg-N  $\text{L}^{-1}$  の 2 種類の培地を使用した。培養条件は 23  $^\circ\text{C}$ , 暗所, 静置とし、培養期間は 3 ヶ月間とした。

培養中、アンモニア酸化による亜硝酸生成の有無を確認するために Griess 試薬を使用した (Shinn, 1941)。AOB の増殖は FISH 解析によって確認した。純粋培養された AOB が確認された場合、5 mL の培地を含有した 25 mL チューブにスケールアップさせ、同条件で培養した。その後、20 mL の培地を含有した 100 mL チューブ、500 mL の培地を含有した 2 L 三角フラスコに順次スケールアップさせた。

#### 分離株の PCR と系統解析

継代培養に成功したサンプルから加熱処理 (95  $^\circ\text{C}$ , 10 min) によって DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子配列を 27F/1492R プライマーセットで PCR 法により増幅させた。また、*amoA* 遺伝子配列を *amoA*-1F/*amoA*-2R プライマーセットで増幅させた (Rotthauwe *et al.*, 1997)。PCR 産物を精製した後、27F/1492R プライマーセットまたは *amoA*-1F/*amoA*-2R プライマーセットを用い、シーケンス解析した。微生物菌叢の同定と近縁種の配列情報は日本 DNA データバンク (DDBJ) を利用した。遺伝的距離の計算に p-distance モデルを使用し、塩基配列に基づいた系統樹作成に NJ 法を用いた。Bootstrap number は 500 とした。

## 結 果

#### 活性汚泥に棲息する AOB の同定と菌叢解析

活性汚泥サンプルを対象にした菌叢解析では、いずれのサンプルにおいても、*Proteobacteria* 門と *Bacteroidetes* 門が優占的に検出された。既存の AOB として知られている *Nitrosomonas* 属に分類されたリードは 0.34–2.3 % を占めた。一方で、*Nitrosococcus* 属と *Nitrosospora* 属は今回の解析では検出されなかった。

本研究で得られた 57 クローンのうち、30 クローン (WWTPs clone 1–30) が Cluster 6a に分類された (Fig. 1)。Cluster 6a には、既存株 *Nitrosomonas* sp. Is79A3 と *Nitrosomonas* sp. AL212 が含まれている。残りの 27 クローン (WWTPs clone 31–57) は既存株 *Nitrosomonas* sp. Nm84, *Nitrosomonas* sp. JL21, *Nitrosomonas communis* strain Nm2 に対して低い相同性であり、これまでの分離株を含まない新規なクラスターに位置した (Fig. 1)。したがって、WWTPs clone 31–55 は、Unclassified Cluster 1 として定義し、WWTPs clone 56–57 は、Unclassified Clus-



**Fig. 1** Phylogenetic tree of the *Nitrosomonas* OTUs based on 16S rRNA gene sequencing. OTUs containing identical sequences were grouped as WWTPs clones (bold types). Filled circles on the branch nodes indicate the percentage bootstrap supports for the clades, based on 500 bootstrap resamplings (>70%). Numbers in brackets are the GenBank accession numbers of the strains in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Asterisks (\*, \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\*) indicate the target organisms of probes Cluster6a\_192, Nmo218, Nsm196, and Nsm153, respectively. Percent indicates the population of trimmed sequences, obtained by dividing the *Nitrosomonas* reads by the total trimmed sequences in each month. Brackets indicate the *Nitrosomonas* clusters defined by Purkhold *et al.* (2000). Clones excluded from previous clusters were newly clustered as Unclassified Cluster 1 and Unclassified Cluster 2. The bar represents 0.02-estimated change per nucleotide.

ter 2として定義した。Cluster 6aとUnclassified Cluster 1に含まれるクローンは、すべての汚泥サンプルで検出されたが、Unclassified Cluster 2に含まれるクローンは、Oct-AS, Jan-ASのみ検出された。どのクローンも、Cluster 6b (*Nitrosomonas marina*), Cluster 7 (*Nitrosomonas europaea*), Cluster 8 (*Nitrosomonas communis*)には属さなかった (Fig. 1)。

#### 活性汚泥に棲息する *Nitrosomonas* の形態解析

活性汚泥から直接マイクロコロニーを分取するために、活性汚泥において *Nitrosomonas* がマイクロコロニーを形成しているかどうかを FISH 解析によって確認した。 *Nitrosomonas oligotropha* 系統 (WWTPs\_clone 1-15) の細胞を選択的に染色する Cluster 6a\_192 プロープ (5'-CTT TCG ATC CCC TAC TTT CC-3') では、マイクロコロニーはほとんど確認されず、マイクロコロニーよりも他の微生物との凝集体が多く確認された。 *Nitrosomonas oligotropha* 系統 (WWTPs\_clone 1-30) と Unclassified Cluster 1 (WWTPs\_clone 31-55) を選択的に染色する Nmo218 プロープ (5'-CGG CCG CTC CAA AAG CAT-3') では、いずれの汚泥からも複数種で構成する凝集体が頻繁に確認された。また、Apr-AS, Jul-AS, Oct-ASにおいて、直径2-4 $\mu$ mのマイクロコロニーも検出された。 *Nitrosomonas oligotropha* 系統 (WWTPs\_clone 20-30) と Unclassified Cluster 1 (WWTPs\_clone 31-55) を選択的に染色する Nsm196 プロープ (5'-CGA TCC CCT ACT TTT C-3') では、Apr-AS, Jul-AS, Oct-ASから *Nitrosomonas* 属のマイクロコロニーが頻繁に検出された。 Unclassified Cluster 2 (WWTPs\_clone 56-57) を選択的に染色する Nsm153 プロープ (5'-GGA GTA TTA GCA CAC C-3') では、マイクロコロニーの数が検出限界を下回っており、FISH 解析による顕微鏡観察では確認することが出来なかった。

#### *Nitrosomonas* 属マイクロコロニーの分取

活性汚泥に存在するマイクロコロニーを選択的に分取するため、超音波破砕機を用いて活性汚泥サンプルを分散処理し、セルソーターに供試し、ドットプロットを展開させた。展開させたドットプロット上でFSCとSSCの値が異なる6つのエリアを設定した。それぞれのエリアからサンプルを分取した後、顕微鏡観察を行ったところ、浮遊する単一細胞はFSCの値が小さいエリアに集まることが分かった。また、SSCの値が小さいエリアには *Nitrosomonas* のマイクロコロニーが多く含まれていた。一方で、FSC, SSCの値が大きいエリアには複数種で構成される凝集体が含まれていた。続いて、 *Nitrosomonas* のマイクロコロニーが多く含まれるエリアから、

100 イベント (ドットプロット上で表示される1イベントは、1つのマイクロコロニー、または1つのシングルセルを示す) ずつ分取し、FISH 解析によって *Nitrosomonas* のマイクロコロニーの割合を算出した。Apr-AS, Jul-AS, Oct-AS, Jan-ASのマイクロコロニーの割合はそれぞれ26.6%, 21.5%, 24.9%, 13.5%であった。

#### 培養サンプルのスクリーニングと純粋培養

3ヶ月間培養を行った後、アンモニア酸化反応が生じているウェルを特定するため、Griess 試薬を用いて全てのウェルをスクリーニングした。調査した3800ウェルのうち、Apr-AS由来のサンプルは9ウェル、Jul-AS由来のサンプルは4ウェル、Oct-AS由来のサンプルは262ウェル、Jan-AS由来のサンプルは5ウェル、合計280ウェルにおいてアンモニア酸化反応が確認された。そこで、これらの280ウェルから20 $\mu$ Lずつサンプルをスライドガラスに載せ、FISH 解析を用いた顕微鏡観察によってAOBが増殖しているかどうか確認した。アンモニア酸化反応が確認された280ウェルのうち、249ウェルにおいては他の細菌と共存し複数種の微生物が増殖していた。一方で、31ウェルにおいて純粋な *Nitrosomonas* 属の細菌の増殖が観察された。

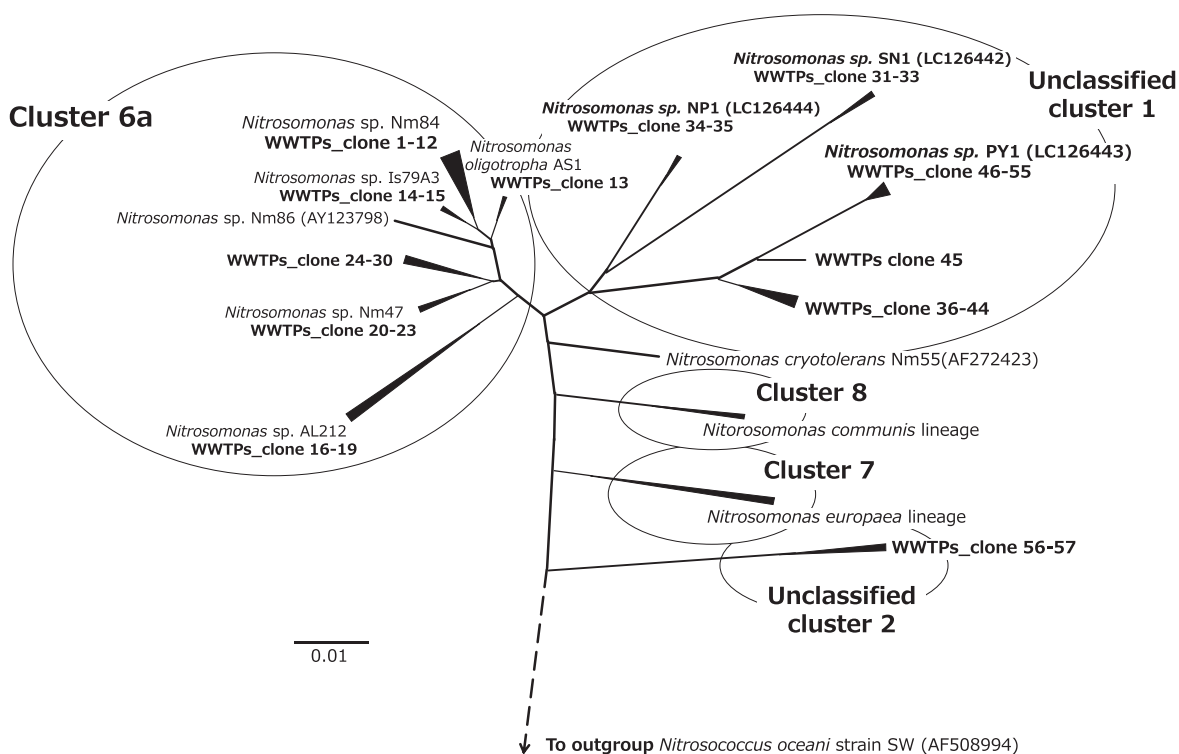
#### 分離株の同定

純粋培養を確認した31ウェルについて16S rRNA 遺伝子配列に基づいたシーケンス解析を行ったところ、3種類の新規な種として同定されることが期待された (Table 1, Fig. 2)。それぞれの種の代表株を、 *Nitrosomonas* sp. NP1 (Jul-ASから培養された4株のうちの一つ)、 *Nitrosomonas* sp. PY1 (Apr-ASから培養された5株とOct-ASから培養された19株のうちの一つ)、 *Nitrosomonas* sp. SN1 (Oct-ASから培養された3株のうちの一つ)として定義した。特に、PY1株は暫定的に、 *Candidatus Nitrosomonas yedoensis* と命名した。Jan-ASからは *Nitrosomonas* 属の分離株を獲得できなかった。また、 *Nitrosomonas* 属以外には、 *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Actinobacteria* などが全ての汚泥サンプルから獲得された。3つの分離株は、近縁種との相同性が95%となり、Unclassified Cluster 1に分類された。分離株間の相同性は94.8-96.1%であった (Table 1, Fig. 2)。

続いて、分離株の *amoA* 遺伝子配列を決定して解析した (Table 1, Fig. 3)。3つの分離株は、近縁種との相同性が88%であり、分離株間の相同性は81.0-90.1%であった (Table 1)。また、活性汚泥から獲得されたクローンだけでなく、河川、淡水などの貧栄養環境から獲得されたクローンと高い相同性 (97%) を示していた。NP1株は貧栄養環境のクローンが形成するグループに、PY1

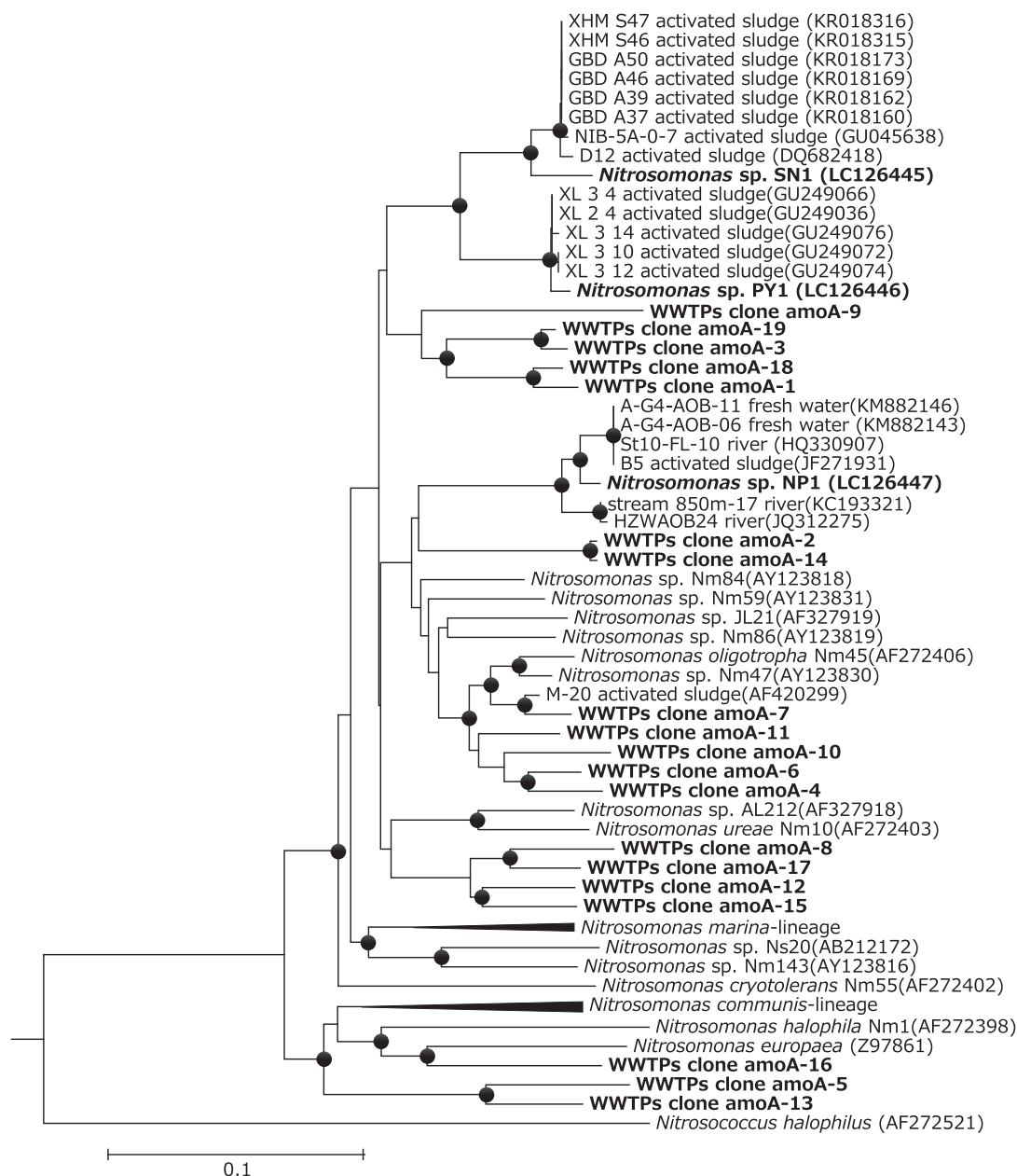
**Table 1** Similarities of pure strains based on 16S rRNA genes and *amoA* genes

Pure strain	Closest species	Identity	Similarities with <i>Nitrosomonas</i> sp. PY1	Similarities with <i>Nitrosomonas</i> sp. NP1
<i>Nitrosomonas</i> sp. PY1 (16S rRNA)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is79A3	0.95	-	0.948
<i>Nitrosomonas</i> sp. NP1 (16S rRNA)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm84	0.95	0.948	-
<i>Nitrosomonas</i> sp. SN1 (16S rRNA)	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm86	0.95	0.961	0.949
<i>Nitrosomonas</i> sp. PY1( <i>amoA</i> )	<i>Nitrosomonas</i> sp. JL21	0.88	-	0.856
<i>Nitrosomonas</i> sp. NP1 ( <i>amoA</i> )	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm84	0.88	0.856	-
<i>Nitrosomonas</i> sp. SN1 ( <i>amoA</i> )	<i>Nitrosomonas</i> sp. Nm86	0.88	0.81	0.901



**Fig. 2** Phylogenetic tree of pure strains within the genus *Nitrosomonas* based on 16S rRNA genes. Clones and pure strains obtained in this study are indicated by bold. Numbers in brackets are the GenBank accession numbers of the strains in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Circular frames indicate the *Nitrosomonas* clusters based on 16S rRNA gene classification by Purkhold *et al.* (2000). The bar represents 0.01-estimated change per nucleotide.





**Fig. 3** Phylogenetic tree of the genus *Nitrosomonas* based on *amoA* gene sequencing. Filled circles on the branch nodes indicate the percentage bootstrap supports for the clades, based on 500 bootstrap resamplings (>70%). Numbers in brackets are the GenBank accession numbers of the strains in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ). The bar represents 0.1-estimated change per nucleotide.

株と SN1 株は活性汚泥由来のクローンが形成するグループに属していた (**Fig. 3**). したがって、獲得した分離株の *amoA* 遺伝子は既存の系統ではなく、新規な系統に区分されることが明らかになった。

## 考 察

### 本手法の優位性

本研究では、次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析と FISH 法による顕微鏡観察に基づいて、マイクロコロニーを形成する AOB を選別した。さらに、セル

ソーターによってマイクロコロニーを直接分取することで系統学的に新規なAOBの獲得に成功した。一般的に、AOBは増殖速度が遅く、実験室での培養が困難である。集積培養は標的細菌の細胞数を増大させるのに効果的であるが、集積化するのに膨大な時間を要し、集積条件のバイアスもかかってしまう (Kamagata, 2015)。また、AOBが産生する有機物が従属栄養細菌の炭素源かつエネルギー源になることから (Rittmann *et al.*, 1994; Kindaichi *et al.*, 2004; Okabe *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2010)、従属栄養細菌とAOBは共存しやすく、AOBを純化することも困難である。

本手法は、平板プレートや限界希釈法などの従来の培養方法と比べ、2つの優位性を持っている。一つは、培養開始の段階で、他の細菌やコンタミの存在を排除できる点である。一度、96ウェルプレートの個々のウェルにマイクロコロニーが分注されれば、他の細菌との競合もなく、標的細菌を培養することができる。もう一つは、寒天などのゲル化剤による毒性を避けることができる点である。ゲル化剤はある種の細菌にとって、増殖を抑制させるはたらきを持っており (Tamaki *et al.*, 2009; Hara *et al.*, 2012)、特定の細菌ばかり培養されてしまうといった偏り (バイアス) が生じやすい。AOBについても同一の培地組成で調製した固体培地では増殖できないが、液体培地では増殖できることが確認されている (Fujitani *et al.*, 2015)。本研究で獲得されたAOBについても、今のところ固体培地での増殖は確認できていない。

興味深いことに、アンモニアの消費が確認できた262ウェルのうち、249ウェルでAOBと一緒に共存する他の細菌を確認した。他の細菌と共存することで、AOBのアンモニア酸化が促進されていた可能性がある。実際、NP1株とSN1株は継代過程でアンモニア酸化活性が低下している。分離株自身が産生する亜硝酸や代謝物の蓄積によって、アンモニア酸化活性が低下しているのであれば、NOBや従属栄養細菌との共培養がアンモニア酸化活性を高める上で重要なものかもしれない。

#### *Nitrosomonas* 属の形態的特徴

硝化細菌の形態は、個々の株における増殖過程や環境条件に依存して変化する。*Nitrosomonas europaea* や *Nitrospira* は対数増殖期にマイクロコロニーを形成し、定常期から飢餓状態に入ると分散してしまう (Hesselsøe & Sørensen, 1999)。また、富栄養環境では *Nitrosomonas europaea* は浮遊細胞として存在しているのに対し、*Nitrosomonas oligotropha* は細胞外高分子物質の産生が盛んであり、マイクロコロニーの形成が確認されている (Stehr *et al.*, 1995; Suwa *et al.*, 1994)。驚くべきことに、本研究において異なる FISH プローブを用いることで、

様々な *Nitrosomonas* 属の形態を観察することができた。つまり、Cluster 6a\_192 プローブで検出される細胞は、複数種の凝集体を形成し、Nsm196 プローブで検出される細胞は、マイクロコロニーを形成した。Unclassified Cluster 1 に属するすべての細胞が対数増殖期にあったとは考えにくいことから、マイクロコロニーを形成する能力は、系統学的に保存されているのかもしれない。また、この研究で獲得した分離株は、それぞれ独特な形態的特徴を持っていた。NP1株は直径1 $\mu$ m以下の小さな細胞が planktonic 状態で存在していた。活性汚泥中のマイクロコロニーを分取して単離していることを鑑みると、NP1株は環境中ではマイクロコロニーを形成していたが、純粋分離の状態になると浮遊状態に移行したと考えられる。一方で、PY1株とSN1株はEPSを過剰に産生し緩やかに凝集したマイクロコロニーを形成していた。

獲得した3種の純粋分離された株については、継代培養を繰り返し行い、大量培養することを目指している。大量培養できた株から、随時生理学的な特徴とゲノム特性を明らかにしていく予定である。このように、環境サンプルから新規な硝化細菌を獲得し、特徴づけを行っていくことは、窒素循環に関わる微生物生態学の重要な研究課題である。

## 要 約

本研究では、排水処理施設の活性汚泥を対象に、微生物が形成するマイクロコロニーを直接分取することが可能なハイスループット分離培養技術を開発した。本手法によって、これまで存在が明らかにされてこなかった、未培養なAOBを獲得することができた。以下に具体的な要点を挙げる。

- 1) 包括的な系統解析とFISH観察によって、*Nitrosomonas* 属の細菌を形態的な特徴に基づいて分類した。特に、本研究で設計したNsm196プロローブによって、活性汚泥中に棲息する *Nitrosomonas* 属のマイクロコロニーが豊富に検出された。
- 2) 2種類の散乱光 (FSCとSSC) によって、活性汚泥中の微生物群集から、*Nitrosomonas* 属のマイクロコロニーを分取することができた。この発見は、蛍光標識を用いず、環境サンプルからマイクロコロニーを形成する未培養な細菌を直接的に分取し、分離培養できることを意味している。
- 3) 本研究で分離培養された株を、16S rRNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子に基づき系統解析したところ、既存のクラスターに属さない *Nitrosomonas* 属の細菌であることが明らかになった。

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 謝 辞

## 口頭発表

- 1) 牛木章友, 藤谷拓嗣, 諸星知広, 常田 聡. 2017. *Nitrospira* の亜硝酸酸化活性を制御する Quorum-sensing 機構の発見, 第11回日本ゲノム微生物学会年会, 3月2-4日, 藤沢
- 2) Fujitani, H., Abe, T., Ushiki, N. & Tsuneda, S. 2016. Direct isolation of microcolonies from activated sludge opens the window of unrecognized genus *Nitrosomonas* as ammonia oxidizers, 16th International society for microbial ecology, 21-26 August, Montreal, Canada
- 3) Ushiki, N., Fujitani, H., Sekiguchi, Y. & Tsuneda, S. 2016. Comparative genomic analysis of phylogenetically distinct two *Nitrospira* strains isolated from a wastewater treatment plant, 16th International society for microbial ecology, 21-26 August, Montreal, Canada
- 4) 藤谷拓嗣, 牛木章友, 神野 大, 安部拓磨, 常田 聡. 2016. 新規な分離培養技術によって獲得された硝化細菌の生理・ゲノム特性, 環境バイオテクノロジー学会, 6月13-14日, 広島
- 5) 牛木章友, 藤谷拓嗣, 関口勇地, 常田 聡. 2015. 比較ゲノム解析が明らかにする亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* の生態学的ニッチ, 31th Japanese Society Microbial Ecology Annual Meeting and 7th Japan-Taiwan-Korea Symposium on Microbial Ecology, 17-20 October, Tsuchiura, Japan
- 6) 安部拓磨, 牛木章友, 藤谷拓嗣, 常田 聡. 2015. 新規分離培養手法を用いたハイスループットなアンモニア酸化細菌の獲得, 2015年度環境バイオテクノロジー学会, 6月29-30日, 東京

## 原著論文

- 1) Ishii, K., Fujitani, H., Nakagawa, T., Takahashi, R. & Tsuneda, S. 2017. Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite oxidizer *Nitrotoga* sp. from an eel-grass sediment, *Appl. Environ. Microbiol.* (*in press*) doi: 10.1128/AEM.00549-17
- 2) Ushiki, N., Jinno, M., Fujitani, H., Suenaga, T., Terada, A. & Tsuneda, S. 2017. Nitrite oxidation kinetics of two *Nitrospira* strains: the quest for competition and ecological niche differentiation, *J. Biosci. Bioeng.* **123**: 581-589.
- 3) Abe, T., Ushiki, N., Fujitani, H. & Tsuneda, S. 2017. A rapid collection of yet unknown ammonia oxidizers in pure culture from activated sludge, *Water Res.* **108**: 169-178.
- 4) Thandar, S. M., Ushiki, N., Fujitani, H., Sekiguchi, Y. & Tsuneda, S. 2016. Ecophysiology and comparative genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor, *Front. Microbiol.* **7**: 1869.

## 保存機関に寄託した菌株

*Nitrosomonas mobilis* Ms1 = NBRC 112761

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, 国立研究開発法人産業技術総合研究所の関口勇地博士には, 硝化細菌のゲノム解析において多大なるご尽力を賜りました。さらに, 東京農工大学工学部化学システム工学科の寺田昭彦准教授には, 高感度微小電極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

- Abe, T., Ushiki, N., Fujitani, H. & Tsuneda, S. 2017. A rapid collection of yet unknown ammonia oxidizers in pure culture from activated sludge, *Water Res.* **108**: 169-178.
- Amann, R., Krumholz, L. & Stahl, D. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**: 762-770.
- Coskuner, G., Ballinger, S., Davenport, R., Pickering, R., Solera, R., Head, I. & Curtis, T. 2005. Agreement between theory and measurement in quantification of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6325-6334.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. & Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.
- Daims, H., Lebedeva, E., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. & Wagner, M. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**: 504-509.
- Fujitani, H., Ushiki, N., Tsuneda, S. & Aoi, Y. 2014. Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ. Microbiol.* **16**: 3030-3040.
- Fujitani, H., Kumagai, A., Ushiki, N., Momiyuchi, K. & Tsuneda, S. 2015. Selective isolation of ammonia-oxidizing bacteria from autotrophic nitrifying granules by applying cell-sorting and sub-culturing of microcolonies. *Front. Microbiol.* **6**:1159.
- Gruber-Dorninger, C., Pester, M., Kitzinger, K., Savio, D., Loy, A., Rattei, T., Wagner, M. & Daims, H. 2015. Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. *ISME J.* **9**: 643-655.
- Hara, S., Isoda, R., Tahvanainen, T. & Hashidoko, Y. 2012. Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *PLoS ONE* **7**: e41142.
- Hesselsoe, M. & Sorensen, J. 1999. Microcolony formation as a viability index for ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 383-391.
- Irie, K., Fujitani, H. & Tsuneda, S. 2016. Physical enrichment of uncultured *Accumulibacter* and *Nitrospira* from activated sludge by unlabeled cell sorting technique. *J. Biosci. Bioeng.* **122**: 475-481.

- Kamagata, Y. 2015. Keys to cultivating uncultured microbes: elaborate enrichment strategies and resuscitation of dormant cells. *Microbes Environ.* **30**: 289–290.
- Kindaichi, T., Ito, T. & Okabe, S. 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1641–1650.
- Koops, H. & Harms, H. 1985. Deoxyribonucleic-acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **141**: 214–218.
- Koops, H. & Pommerening-Roser, A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**: 1–9.
- Kowalchuk, G. & Stephen, J. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**: 485–529.
- Maixner, F., Noguera, D., Anneser, B., Stoecker, K., Wegl, G., Wagner, M. & Daims, H. 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environ. Microbiol.* **8**: 1487–1495.
- Matsumoto, S., Katoku, M., Saeki, G., Terada, A., Aoi, Y., Tsuneda, S., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M. 2010. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environ. Microbiol.* **12**: 192–206.
- Mußmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Damste, J., Hatzenpichler, R., Richter, A., Nielsen, J., Nielsen, P., Müller, A., Daims, H., Wagner, M. & Head, I. 2011. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 16771–16776.
- Okabe, S., Satoh, H. & Watanabe, Y. 1999. *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3182–3191.
- Okabe, S., Kindaichi, T. & Ito, T. 2005. Fate of C-14-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3987–3994.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M., Koops, H. & Wagner, M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5368–5382.
- Rittmann, B., Regan, J. & Stahl, D. 1994. Nitrification as a source of soluble organic substrate in biological treatment. *Water Sci. Technol.* **30**: 1–8.
- Rotthauwe, J., Witzel, K. & Liesack, W. 1997. The ammonia monoxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4704–4712.
- Shinn, M. 1941. Colorimetric method for determination of nitrite. *Ind. Eng. Chem.* **13**: 0033–0035.
- Stehr, G., Zorner, S., Bottcher, B. & Koops, H. 1995. Exopolymers - an ecological characteristic of a floc-attached, ammonia-oxidizing bacterium. *Microb. Ecol.* **30**: 115–126.
- Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T. & Urushigawa, Y. 1994. Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in activated sludges. *Water Res.* **28**: 1523–1532.
- Suwa, Y., Sumino, T. & Noto, K. 1997. Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**: 373–379.
- Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y. & Kamagata, Y. 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.* **11**: 1827–1834.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- Ushiki, N., Fujitani, H., Aoi, Y. & Tsuneda, S. 2013. Isolation of *Nitrospira* belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant. *Microbes Environ.* **28**: 346–353.
- van Kessel, M., Speth, D., Albertsen, M., Nielsen, P., Op den Camp, H., Kartal, B., Jetten, M. & Lücker, S., 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* **528**: 555–559.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. & Schleifer, K. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 251–264.
- Wells, G., Park, H., Yeung, C., Eggleston, B., Francis, C. & Criddle, C. 2009. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of *Crenarchaea*. *Environ. Microbiol.* **11**: 2310–2328.

## 平成23年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：平成23年10月～平成29年 3 月



## BioCentury を先導する次世代酵母リソース中核拠点の形成

金子 嘉信

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

### Establishment of a foothold for the leading yeast resource in the era of life science

Yoshinobu Kaneko

Yeast Genomic Resources Laboratory, Graduate School of Engineering, Osaka University

Yamadaoka 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

The methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* (syn. *Hansenula polymorpha*) is an attractive industrial non-conventional yeast showing high thermo-tolerance (up to 50°C) and xylose assimilation. To facilitate genetic manipulation in *O. polymorpha*, we developed a CRISPR/Cas9 system, in which both of single guide RNA (sgRNA) and endonuclease Cas9 were expressed by a single autonomously-replicable plasmid and the sgRNA portion was easily changed using PCR technique. Moreover, we employed tRNA<sup>CUG</sup> gene for the sgRNA expression. The editing efficiency of our system was 17 to 71 % of the transformants in several target genes tested. Next, we unveiled a mating-type switching mechanism in *O. polymorpha*. Two *MAT* loci, *MATa* and *MATα*, are ~18kb apart near centromere on the same chromosome. One *MAT* locus distal to the centromere was transcriptionally active, while the other proximal to the centromere was repressed. An inversion of the *MAT* intervening region was induced by nutrient limitation, resulting in the swapping of the chromosomal locations of two *MAT* loci, and hence switching of mating type identity. This chromosomal inversion-based mechanism represents a novel form of mating-type switching. We also found that co-presence of *MATa1* and *MATα2* was sufficient to prevent mating-type switching, suggesting that ploidy information resides solely in the mating type locus. Additionally, *RME1* deletion resulted in a reduced rate of switching, and ectopic expression of *O. polymorpha RME1* overrode the requirement for starvation to induce *MAT* inversion. These results suggested that mating-type switching in *O. polymorpha* is likely regulated by two distinct transcriptional programs linked to the ploidy and transmission of the starvation signal. Lastly, we characterized the phosphate signal transduction (PHO) pathway of *O. polymorpha* in order to get more information for the diversity and evolution of the PHO pathway in yeasts. Several *pho* gene-deficient mutants were constructed by using the information of annotated draft genome of *O. polymorpha* BY4329. Except for the *pho2*-deficient mutant, these mutants exhibited the same phenotype of repressible acid phosphatase (APase) production as their *Saccharomyces cerevisiae* counterparts. We also screened for UV-irradiated mutants that expressed APase constitutively and obtained four classes of mutants. Genetic analysis showed that one class of recessive constitutive mutations was allelic to *PHO80* and a group of dominant mutations occurred in the *PHO81* gene. Epistasis analysis between *pho81* and the other two classes of recessive constitutive mutations suggested that the corresponding new genes, named *PHO51* and *PHO53*, function upstream of *PHO81* in the PHO pathway. Taking these findings together, we conclude that the main components of the PHO pathway identified in *S. cerevisiae* are conserved in the methylotrophic yeast *O. polymorpha*, even though these organisms were separated from each other before duplication of the whole genome.

### 第1章 はじめに

C1化合物であるメタノールを単一炭素源として利用できるメタノール資化酵母は、世界に先駆けて京都大学

の Ogata *et al.* (1969) が自然界から *Kloeckera sp.* (後に *Candida boidinii* に再同定; Kato *et al.*, 1976) を分離、報告して以来、1970年代には微生物タンパク質供給源として、1990年前半には異種タンパク質発現系が整備されて、異種タンパク質生産宿主として利用が進められてきた (Faber *et al.*, 1995)。また、メタノールや硝酸塩の資化代謝経路の生化学的・生理学的研究やペルオキシ

E-mail: kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

教員：前川裕美 (現 九州大学大学院農学研究院)

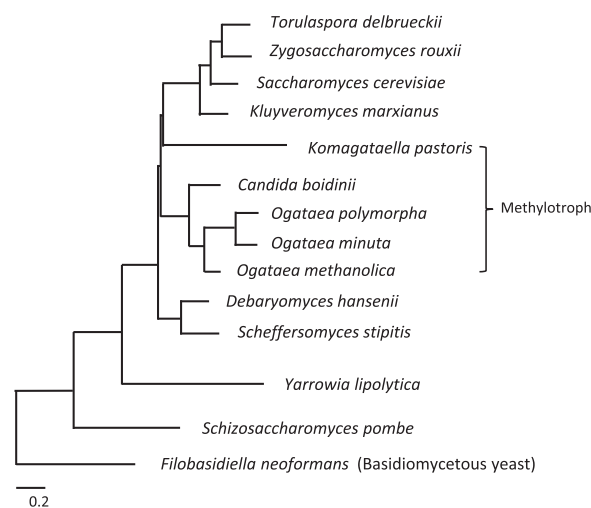
ソーム形成の分子細胞学的研究などの基礎生物学的研究材料としても使用されてきた (Gleeson & Sudbery, 1988a). 既知の約 1500 の酵母種のうち、メタノール資化酵母は *Ogataea* 属に分類されているものが多く、*Ogataea* 属 30 種と、現在は rRNA 配列の違いで *Komagataella pastoris*, *K. phaffii*, *K. pseudopastoris* の 3 種に再分類されている *Pichia pastoris* (Kurtzman, 2011), および *Candida boidinii* などが知られている (Kurtzman *et al.*, 2011). 中でも *Ogataea polymorpha* (syn. *Hansenula polymorpha*) は古典遺伝学的あるいは分子遺伝学的手法が適用でき (Gleeson & Sudbery, 1988a, b; Saraya *et al.*, 2012), 生育上限温度が 50°C と他の酵母より高く (Péter *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2001; Suh & Zhou, 2010), 産業利用の観点からは有利な点がある.

*O. polymorpha* では、メタノール誘導性の高発現系や高密度培養法などが開発されているため、異種タンパク質生産のための宿主として利用されおり、ヒル由来の血液凝固ペプチドは臨床レベルまで進み、B 型肝炎ワクチンは韓国やアルゼンチンで製品として市販されている (Gellissen, 2000). また、微生物酵素として、*Aspergillus* 由来のフィターゼの生産は 13.5g/L の分泌生産が可能である (Mayer *et al.*, 1999). さらに、タンパク質生産だけでなく、ペルオキシソームへの代謝経路酵素の導入発現によるペニシリン G の生産も報告されている (Gidijala *et al.*, 2009). したがって、生理活性物質や汎用化学物質の生産にも利用できる可能性がある。*O. polymorpha* は最高 50°C までの高温で生育可能で、グルコース、キシロースおよびセロビオースを含む様々な炭素源を資化できるため (Ryoba *et al.*, 2003), *Saccharomyces cerevisiae* などと並んでバイオエネルギー分野にも貢献できる魅力的な産業用酵母でもある。しかし、その基礎生物学的知見は *S. cerevisiae* と比べてまだまだ乏しく、効率のよい育種や安定な性質・能力維持のためには生活環や遺伝子発現調節機構などの基礎生物学的な知見の蓄積がこれから 21 世紀を担う産業酵母として望まれる。そこで、本寄附講座ではこの *O. polymorpha* を研究材料とし、その接合型変換機構やリン酸シグナル伝達機構の解明およびゲノム編集ツールの開発を行うことにした。

Kurtzman *et al.* (2011) による最新の酵母分類体系は複数の遺伝子配列の相同性に基づく系統進化関係を反映させたものとなっている。担子菌酵母 *Filobasidiella neoformans* をアウトグループとした子囊菌酵母の系統進化関係 (Kurtzman & Robnett, 2013) をメタノール資化酵母に注目して簡略した系統図を Fig. 1 に示した。担子菌と分岐した子囊菌では、*Schizosaccharomyces pombe* が最も古く先に分岐し、子囊菌系糸状菌 (Pezizomycotina) がさらに分岐した後に *Yarrowia lipolytica* が分岐し、続

いて CUG ロイシンコドン をセリンコドンとして使用している *Candida albicans* や *Debaryomyces hansenii* などのグループが分岐したと考えられる。そして、メタノール資化酵母は全ゲノム重複が起こった *S. cerevisiae* を含むグループとは約 1 億年前の全ゲノム重複の以前に分岐している。*Ogataea* 酵母は系統進化的に比較的まとまりがあり、*C. boidinii* ととも近いが、*K. pastoris* とは遠い関係にある。研究材料として選んだ *O. polymorpha* は系統進化的に *S. cerevisiae* と *Sch. pombe* の間に位置していることから、接合型変換やリン酸シグナル伝達の機構に関する知見は子囊菌における系統進化的観点からも興味深い。

真核モデル生物である *S. cerevisiae* と *Sch. pombe* ではその詳細な生活環や接合型変換機構が明らかにされている (田仲 & 山本, 2007; 原島, 2007). 両酵母では、接合型変換を起こして接合型の異なる一倍体細胞間で接合し、二倍体形成、減数分裂と胞子形成という有性世代を回すホモタリック系統と接合型変換を起こさずに接合型の異なる細胞間で接合し、有性世代を回すヘロタリック系統が知られている。Fig. 2 にはホモタリック系統の生活環を示した。*S. cerevisiae* のホモタリック系統では、**a** 型あるいは  $\alpha$  型の一倍体細胞は栄養増殖中に接合型変換を起こし、反対の接合型細胞が生じる。つまり、**a** 細胞でスタートしても増殖中に  $\alpha$  細胞が生じ、その  $\alpha$  細胞は接合変換していない **a** 細胞と接合して **a**/ $\alpha$  二倍体細胞となり、増殖を継続する。そして、栄養飢餓状態になる



**Fig. 1** Phylogenetic relationships among ascomycetous yeasts. This figure was prepared by modifying Fig. 1 in the paper of Kurtzman & Robnett (2013). The concatenated gene sequences for LSU rRNA, SSU rRNA, EF-1 $\alpha$ , RPB1 and RPB2 were analyzed by the maximum likelihood program. *Filobasidiella neoformans* was the designated outgroup species in the analysis.



と二倍体細胞は減数分裂、胞子形成を経て、4つの一倍体の子嚢胞子を形成する。子嚢胞子は栄養状態がよい条件下で発芽して、一倍体の栄養細胞へと戻る。一方、*Sch. pombe* のホモタリック系統でも栄養増殖中に接合型変換が起こり、 $h^+$ 細胞からは $h^-$ 細胞が、 $h^-$ からは $h^+$ が生じる。しかし、栄養豊富な条件では接合は起こらず、異なる接合型細胞の混合状態で増殖を継続する。そして、栄養飢餓状態になることで、異なる接合型細胞どうしで接合を起こし、二倍体細胞となり、そのまま減数分裂、胞子形成が進行する。なお、形成された二倍体細胞を栄養豊富な条件に戻すと、二倍体細胞として栄養増殖させることが可能である。しかし、栄養増殖中に染色体喪失による一倍体化が起こりやすいと言われている。接合型遺伝子として、*S. cerevisiae*で3つの遺伝子座 (*MAT* 座, *HML* 座, *HMR* 座) が、また *Sch. pombe* でも3つの遺伝子座 (*mat1* 座, *mat2* 座, *mat3* 座) が存在しているが、接合型決定のために発現しているのは1つの遺伝子座のみであり、それぞれ *MAT* 座と *mat1* 座である。残りの2つの遺伝子座は発現が抑制されているサイレント遺伝子座である。つまり、*MAT* 座が *MATa* 遺伝子の時には  $a$  細胞, *MAT $\alpha$*  の時には  $\alpha$  細胞になり, *mat1* 座が *mat1-P* 遺伝子の時には  $h^+$  細胞, *mat1-M* の時には  $h^-$  細胞になるわけである。そして、接合型変換は、どちらの酵母でもサイレント遺伝子座の遺伝子情報が発現遺伝子座

(*MAT* 座, *mat1* 座) に遺伝子変換されることによって起こることがわかっている。*S. cerevisiae*では *MAT* 座特異的な HO エンドヌクレアーゼによって二重鎖切断が生じることで接合型変換が起こるが、*Sch. pombe*では HO エンドヌクレアーゼに相当する酵素が存在せず、*mat1* 座近傍の DNA 複製の一時停止に起因する組換え反応による接合型変換モデルが提案されている。モデル生物である両酵母と比べて、系統進化的に両者の中間にある *O. polymorpha* では、ホモタリックであるということは知られており、Fig. 2 に示すような *Sch. pombe* に近い生活環が提案されていた (Gleeson & Sudbery, 1988a)。しかし、栄養飢餓により接合、減数分裂、胞子形成が誘導されることはわかっていたが、接合型遺伝子座はいくつあるのか、いつ接合型変換は起こるのかなどについての情報は全くなかった。この研究により、*O. polymorpha* の接合型変換についてのいくつかの重要な知見を得ることができた。

*O. polymorpha* では1986年に形質転換が報告され、染色体組込型ベクターや自立複製起点 (ARS) を利用した自立複製型ベクターの遺伝子操作ツールが開発されてきた (Gleeson *et al.*, 1986; Roggenkamp *et al.*, 1986; Tikhomirova *et al.*, 1986)。 *S. cerevisiae* で実施されている遺伝子改変手法はほぼ同様に *O. polymorpha* においても実施可能で、PCR を利用した遺伝子破壊も行われて

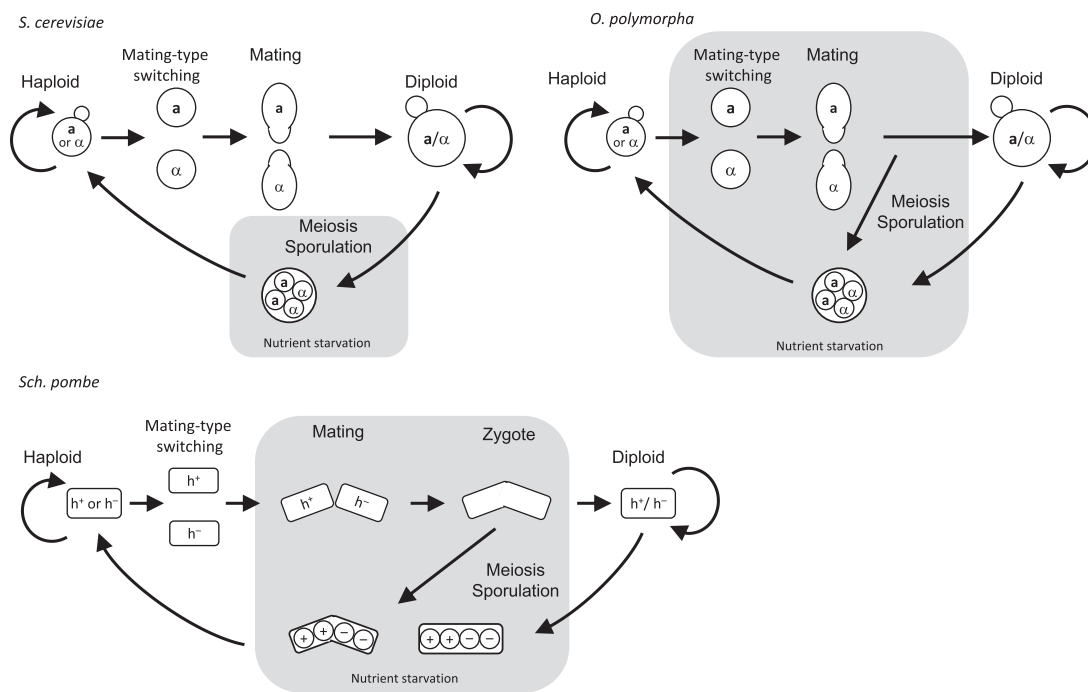


Fig. 2 Homothallic life cycles of three yeasts.

いる (González *et al.*, 1999). しかし, 実際には非相同組換えが相同組換え (HR) より頻度高く起こり, *O. polymorpha* の遺伝子操作は少し煩雑で手間がかかり, 効率的な標的部への組み込みには, 500bp 以上の隣接する相同 DNA 断片が必要である. また, ランダムな染色体への組み込み頻度も高く, 遺伝子によっては標的改変が著しく困難な場合がある. この弱点を克服するため, 非相同末端結合 (NHEJ) による二本鎖切断 (DSB) 修復に必要な遺伝子 *YKU80* を欠失させ, *O. polymorpha* における HR 効率を相対的に増加させる工夫も報告されている (Saraya *et al.*, 2012). しかし, *YKU80* はテロメア長の維持にも必要であり, その機能欠損はしばしば DNA 損傷に対する感受性を増加させる. したがって, しばしば *yku80Δ* 変異を回復させるさらなる操作が必要となる. そこで, 標的遺伝子改変効率が高いゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein 9) システム (Terns & Terns, 2014) が酵母においても適用可能であることが示されたので (DiCarlo *et al.*, 2013), *O. polymorpha* での CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツールの開発を試み, 遺伝子改変効率の検討を行った. CRISPR/Cas9 システムでは, Fig. 3 に示すように 20 ヌクレオチドの標的配列を含むガイド RNA (sgRNA) とエンドヌクレアーゼ Cas9 の複合体が標的遺伝子に DSB を入れ, その修復を誘導する. DSB が入る場所は, プロト Spacer 隣接モチーフ (PAM) と呼ばれる 5'-NGG-3' (N は任意の塩基) 配列の 3bp 上流の標的配列内である. sgRNA-Cas9 複合体によって生じた標的配列内の DSB は, 誤りを生じやすい NHEJ によって修復さ

れるか, 外来の相同部分をもつ供与 DNA がある場合には相同組換えにより供与 DNA が標的部に組み込まれて修復される. つまり, NHEJ 修復の場合は標的遺伝子座に欠失または挿入突然変異が起こる. また, 外来 DNA 断片を同時に導入した場合は DNA 断片の相同配列を利用した相同組換え修復によって標的遺伝子座に外来 DNA 断片を組み込むことができる. 動物細胞での CRISPR/Cas9 によるゲノム編集効率は数 10% であると言われているので, *O. polymorpha* でも効率のよい標的遺伝子改変が可能になると期待できた.

遺伝子発現調節機構の知見は, 代謝経路の改変や異種タンパク発現などを行う上で重要な情報となる. PHO 経路として知られる *S. cerevisiae* のリン酸シグナル伝達経路は真核生物におけるリン酸恒常性を維持する遺伝子発現調節機構として詳細に研究されてきた (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012; Oshima, 1997; Yadav *et al.*, 2016). *S. cerevisiae* の PHO 経路において, 高リン酸条件下ではサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (サイクリン-CDK) 複合体 Pho80-Pho85 によってリン酸化された転写活性化因子 Pho4 はエクスポーチン Msn5 によって核から細胞質に排出される. その結果, 酸性ホスファターゼ (APase) *PHO5* 遺伝子およびリン酸輸送体 *PHO84* 遺伝子のようなリン酸抑制遺伝子は発現されない. 反対にリン酸濃度が十分に低い場合, Vip1 により合成されるイノシトール 7 リン酸 (inositol heptakisphosphate, IP7) によって活性化される CDK 阻害因子 (CKI) Pho81 が Pho80-Pho85 複合体の活性を阻害し, リン酸化されない Pho4 が核内にとどまり, Pho2 との協働でリン酸抑制遺伝子を脱抑制する (Kaffman *et al.*, 1994, 1998a, b; Lee *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1994). PHO 経路を構成する多くの因子についての詳細はかなり明らかにされているが, リン酸シグナル自体がどのように感知されるかについては不明なままである. 近年, いくつかの酵母でこの PHO 経路についての研究がなされてきた. Fig. 4 に *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*, そして日和見病原性酵母 *Candida glabrata* の PHO 経路の遺伝子構成をまとめた. *C. glabrata* では PHO 経路の多くの調節因子が保存されているが, *PHO2* はリン酸飢餓応答遺伝子の発現には必要ない (Kerwin & Wykoff, 2009). また, *C. glabrata* は *S. cerevisiae* の APase 遺伝子 *PHO5* の相同遺伝子を持たず, その代わりに機能的に置き換わる別のタイプのリン酸飢餓応答酸性ホスファターゼ *PMU2* が存在する (Orkwis *et al.*, 2010). 一方, *Sch. pombe* の PHO 経路には, *PHO81*, *PHO2* および *PHO4* に対する相同遺伝子はなく, *PHO80* と *PHO85* の相同遺伝子は PHO 経路に関与していない. さらに, APase 遺伝子 (*pho1*) の転写活性化因子 Pho7 は, 転写

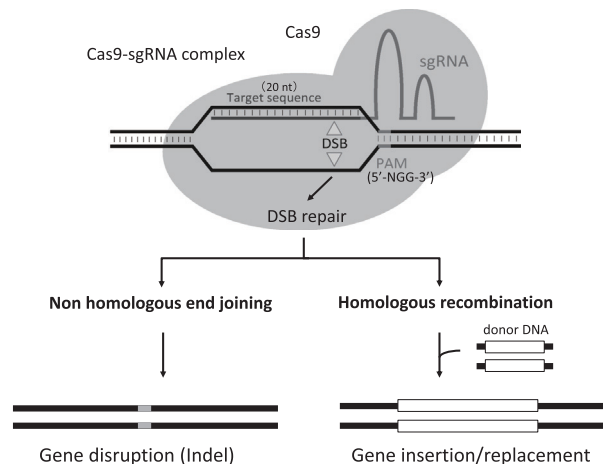
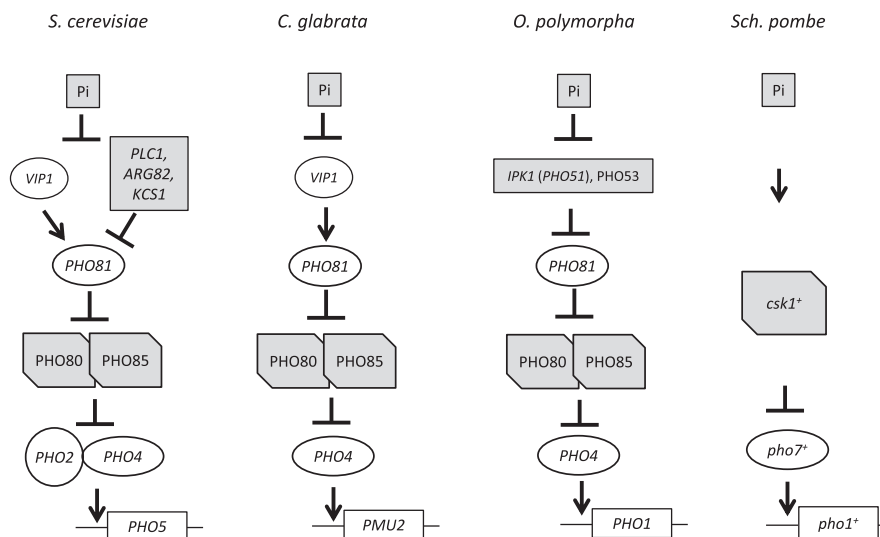


Fig. 3 Schematic diagram of the genome editing by CRISPR/Cas9 system

## 次世代酵母リソース中核拠点の形成



**Fig. 4** Genetic models of the PHO pathway in four yeasts. The arrows indicate positive function and the marks of ⊥ indicate negative function.

活性化因子 Pho4 のヘリックス-ループ-ヘリックス型とは異なる亜鉛フィンガー型転写活性化因子である (Henry *et al.*, 2011). また、この *Sch. pombe* PHO 経路では CDK 活性化キナーゼ遺伝子 *csk1* が *pho7* を負に調節している (Estill *et al.*, 2015). 最近では、子囊菌とは違う担子菌系の日和見病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の *PHO4*, *PHO80*, *PHO85* および *PHO81* が実際に PHO 経路の調節遺伝子であり、*S. cerevisiae* の対応する遺伝子と同じ調節作用があると報告されている (Toh-e *et al.*, 2015). 一方、*O. polymorpha* ではすでに *S. cerevisiae* APase 遺伝子 *PHO5* の相同遺伝子 *PHO1* は同定されていたが (Phongdara *et al.*, 1998)、発現調節遺伝子を含む PHO 経路に関する研究は全くなされていなかった. そこで、遺伝子発現調節システムの進化という観点からも含めて、*O. polymorpha* の PHO 経路の構成遺伝子の解明に挑戦した.

## 第2章 研究成果の概要

### 1) メタノール資化酵母 *O. polymorpha* におけるゲノム編集ツールの開発

*O. polymorpha* では *S. cerevisiae* とは対照的に、相同組換え効率が低いため、*O. polymorpha* の遺伝子操作はしばしば煩雑で時間がかかる. この弱点を克服するために、*O. polymorpha* に強力なゲノム編集ツールとして CRISPR/Cas9 システムを適用した. 我々のシステムでは、ガイド RNA (sgRNA) とエンドヌクレアーゼ Cas9 の両方を単一の自律複製可能なプラスミドで発現させ、

PCR および In-Fusion クローニング技術を用いて sgRNA 部分を容易に交換できるようにしている. さらに sgRNA 発現には tRNA<sup>CUG</sup> 遺伝子を融合させたカセットを用いた. このシステムの編集効率は試験したいくつかの標的遺伝子 (*ADE12*, *PHO1*, *PHO11*, *PHO84*) における形質転換体の 17-71% であった. したがって、この CRISPR/Cas9 システムを用いることにより、*O. polymorpha* の遺伝子操作がより簡便になり、加速されることが期待される.

### 2) メタノール資化酵母 *O. polymorpha* の逆位による接合型変換機構の発見

*O. polymorpha* を細胞増殖及び有性生殖のモデル系として確立するためには実験に有利なヘテロタリック株の取得が必須であると考え、*O. polymorpha* の生殖サイクルの解明に挑戦した. *O. polymorpha* のドラフトゲノム配列を解析したところ、*S. cerevisiae* とは異なる接合型遺伝子構成をしていることが明らかになった. α型の接合型遺伝子 (*MATα*) 近傍の配列が、同じ染色体上の異なる位置に重複しており、さらに重複領域に隣接して a 型の接合型遺伝子 (*MATa*) が存在していた (A タイプ). さらに、菌株によっては *MATα*-*MATa* を両端とする染色体領域が逆向きになった構造を取っていた (I タイプ). いずれの株でも 2 つの *MAT* 配列の一つのみが転写発現しており、染色体上の位置に依存して A タイプでは α 型、I タイプでは a 型細胞の形質を示していた. A/I タイプ間での変換が起こるかを検討した結果、栄養増殖中は A/I タイプは安定的に保持されるが、栄養飢餓条件

にするとA/Iタイプの変換によって接合型が変換した細胞が混在するようになることがわかった。つまり、両MAT遺伝子座の外側に隣接する逆向き反復配列（IR）間での組換えによる染色体逆位によって接合型変換が起こったと考えられる。IRを欠失させた変異体では逆位が起こらなくなり、ホモリズムを示さなくなったことから、*O. polymorpha*の接合型変換は染色体逆位による新しい機構であることが明らかになった。この機構は、2つのMAT座をもつ点と逆位による接合型変換という点で*S. cerevisiae*や*Sch. pombe*の機構とは異なっており、子囊菌酵母の接合型の進化過程をたどる上で重要な知見となった。

### 3) メタノール資化酵母 *O. polymorpha* の接合型変換に関わる転写因子

栄養飢餓条件でのみ誘導される接合型変換がどのように制御されているかについて検討を試みた。接合して減数分裂・胞子形成へと進行するには一倍体であることと栄養飢餓状態であることが必要である。そこで、*S. cerevisiae*などの知見からこれらの条件下で重要であることが予想される転写因子について、接合型変換への関与を調べた。まず、**a**型および $\alpha$ 型接合型遺伝子が同一細胞内に共存する時（**a**/ $\alpha$ 二倍体）にのみ生じる**a1**-**a2**複合体の影響を調べた。その結果、予想通り接合型変換は**a1**-**a2**により抑制されることがわかった。次に*Kluyveromyces lactis*における接合型変換の鍵となるRme1転写因子の相同遺伝子について解析したところ、*RME1*遺伝子欠失変異体では接合型変換頻度が野生型の半分程度に低下した。一方、*RME1*を構成的に発現させると栄養増殖中にも接合型変換が起こった。*RME1*は栄養増殖細胞中でも発現しているが、栄養源飢餓により転写量の増加が観察され、タンパク質量も数倍に上昇することがわかった。これらの結果から、栄養飢餓シグナルはRme1転写因子を介して接合型変換に関与する遺伝子(群)の発現を調節していることが示唆された。また、*RME1*は接合にも必須であることから、*O. polymorpha*は接合型変換と接合に関与する遺伝子(群)の発現をRme1転写因子の下流に位置づけることにより、接合型変換と接合が同じ条件・タイミングで引き起こされることを保証していると考えられる。

### 4) メタノール資化酵母 *O. polymorpha* のリン酸シグナル伝達経路の解明

酵母におけるPHO経路の多様性および進化についての情報を得るために、*O. polymorpha*のPHO経路を調べた。*O. polymorpha* BY4329の注釈付きドラフトゲノム情報を利用して、いくつかの*pho*遺伝子欠損突然変異体を

作製した。*pho2*欠損突然変異体を除いて、これらの突然変異体は対応する*S. cerevisiae*突然変異体と同じAPase生産性を示した。次に、*pho80*および*pho85*突然変異体が*pho81*突然変異の抑圧変異体として単離でき、さらに*pho4*変異体が*pho80*および*pho85*突然変異の抑圧変異体として得られた。*O. polymorpha*のPHO経路のより完全な構成因子を網羅するために、UV照射処理によってAPaseを構成的に発現する突然変異体を分離し、遺伝解析を行った。その結果、3種類の劣性構成的変異および1つの優性構成的変異が得られた。そして、劣性構成的突然変異の1つは*PHO80*の対立遺伝子であり、優性突然変異が*PHO81*の対立遺伝子であることがわかった。*pho81*変異と2つの未知の劣性構成的変異(*pho51*と*pho53*と命名)との間の上位下位試験は、*PHO51*(*IPK1*と判明)と*PHO53*がPHO経路の*Op-PHO81*の上流で機能することを示唆した。これらの結果をまとめると、*S. cerevisiae*とは全ゲノム重複が生じる前に分岐した*O. polymorpha*においてもPHO経路の主要調節遺伝子は保存されており、*S. cerevisiae*や*C. glabrata*と同じサイクリン-CDK-CKI複合体による転写活性化因子Pho4の核局在制御様式による遺伝子発現調節機構をもつことがわかった(Fig. 4参照)。しかし、イノシトールポリリン酸生成経路遺伝子である*IPK1*や*KCS1*の欠損変異体では*S. cerevisiae*とAP表現型の違いが見られ、*S. cerevisiae*とは異なるイノシトールポリリン酸種がPho81CKI活性調節に働く可能性が示唆された。この知見は酵母におけるPHO経路の進化の研究に有用な情報となる。

## 第3章 おわりに

寄附講座では、これからのバイオテクノロジーを支える酵母の1つとしてメタノール資化酵母*O. polymorpha*を研究材料として取り上げ、CRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集ツールの開発、染色体逆位による接合型変換機構の解明、リン酸飢餓応答システムであるPHO経路の解明を行った。ゲノム編集ツール開発では、sgRNAをtRNAと融合した形で発現させることにより、実用に耐えうるゲノム編集プラスミドを構築できた。今後はプラスミドの選択マーカーを薬剤耐性マーカーなどに換えて、ゲノム編集できる株の制限を広げたり、sgRNAカセットを複数導入して複数箇所の同時ゲノム編集を可能にしたりすることによって、*O. polymorpha*での遺伝子改変の効率化が期待される。さらに産業利用が検討されている*O. polymorpha*近縁のメタノール資化酵母(*O. minuta*や*O. thermomethanolica*)でのゲノム編集の道も拓いたと言えよう。今まで不明であった*O.*

*polymorpha* の接合型変換機構が2つの接合型遺伝子座間の逆位によって起こるという発見は、*S. cerevisiae* と *Sch. pombe* で知られていた機構とは異なる第3の新しいタイプの発見であり、子囊菌での接合型システム進化の観点から興味が広がっている (Hanson & Wolfe, 2017)。一方、*O. polymorpha* の PHO 経路で *S. cerevisiae* や *C. glabrata* と同じサイクリン-CDK-CKI 複合体による転写活性化因子の核局在制御様式が保存されていたことは、この制御様式が基本的な遺伝子発現調節システムであるということを示唆している。*Sch. pombe* の PHO 経路は今のところ特殊な構成をしており、系統的に *Sch. pombe* との間に位置すると考えられる酵母、例えば *D. hansenii* や *Y. lipolytica* の PHO 経路の構成に興味もたれる。

最後にもう1つの活動についても触れておきたい。寄附講座は文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP; <http://www.nbrp.jp>) の受皿となって大阪市立大学理学研究科の代表機関と共に NBRP 酵母リソース事業 (<http://yeast.lab.nig.ac.jp/yeast/>) を推進してきた。寄附講座活動5.5年間で酵母株2,760とDNAクローン2,067の酵母リソースの増加があり、リソース保有数は酵母株27,170とDNAクローン6,081となった。特に、リボソーム生合成の研究分野で著名であった米国カリフォルニア大学アーバイン校の故・野村真康教授コレクション (菌株とプラスミドあわせて約1,600) を収集できたことは意義深い。Fig. 5に示すようにリソース提供数は5.5年間で菌株1,993、DNAクローン2,162であり、海外への提供はのべ36カ国で提供総数の43%を占めた。したがって、国際的にも貢献できたと考えている。そして、第3期NBRPに採択された29生物種の中でもマウス、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナなどのモデル生物種とともに13の「優れた成果をあげた」生物種の1つとしてプロジェクト事後評価を受け、寄附講座とい

う活動基盤が事業推進に非常に貢献した。また、引き続き第4期事業継続が可能になったのも寄附講座での活動が貢献したと思われる。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成23(2011)年度寄附講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして、寄附講座特任研究員 (周 瑩, 名城千香, 沼本 穂, 山田菜美子, 山本勝良), 寄附講座技術補佐員 (長沢奈央子), 寄附講座事務補助員 (角田洋子, 三浦準子) の協力のもとに実施しました。また、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学講座の原島俊教授 (現、崇城大学教授) と村中正俊教授のご支援とご協力、生物工学講座ゲノム機能工学研究室に在籍した大学院生の皆さんの協力の賜物です。あわせて感謝します。

## 文 献

- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. & Church, G. M. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4336-4343.
- Estill, M., Kerwin-Iosue, C.L. & Wykoff, D.D. 2015. Dissection of the PHO pathway in *Schizosaccharomyces pombe* using epistasis and the alternate repressor adenine. *Curr. Genet.* **61**: 175-183.
- Faber, K.N., Harder, W., Ab, G. & Veenhuis, M. 1995. Review: Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**: 1331-1344.
- Gellissen, G. 2000. Heterologous protein production in methylophilic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741-750.
- Gidijala, L., Kiel, J.A., Douma, R.D., Seifar, R.M., van Gulik, W.M., Bovenberg, R.A., Veenhuis, M. & van del Klei, I.J. 2009. An engineered yeast efficiently secreting penicillin. *PLoS ONE* **4**: e8317.
- Gleeson, M.A., Ortori, G.S. & Sudbery, P.E. 1986. Transformaton

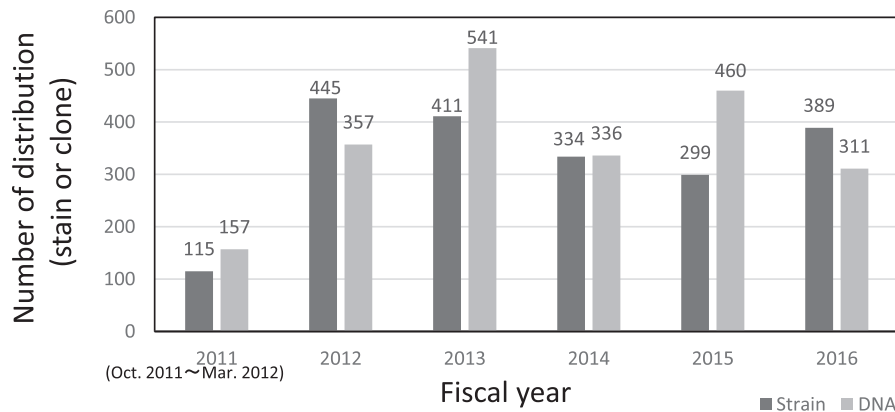


Fig. 5 Distribution activity of NBRP-Yeast during 5.5 years.

- of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. J. Gen. Microbiol. **132**: 3459-3465.
- Gleeson, M.A. & Sudbery, P.E. 1988a. The methylotrophic yeasts. Yeast **4**: 1-15.
- Gleeson, M.A. & Sudbery, P.E. 1988b. Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Yeast **4**: 293-303.
- González, C., Perdomo, G., Tejera, P., Brito, N. & Siverio, J.M. 1999. One-step, PCR-mediated, gene disruption in the yeast *Hansenula polymorpha*. Yeast **15**: 1323-1329.
- Hanson, S.J. & Wolfe K.H. 2017. An evolutionary perspective on yeast mating-type switching. Genetics **206**: 9-32.
- 原島 俊 2007. 9.3 出芽酵母, 分裂酵母の接合型変換, 大隅良典・下田 親 (編), 酵母のすべて-系統, 細胞から分子まで-, p. 285-292, シュプリンガー・ジャパン, 東京.
- Henry, T.C., Power, J.E., Kerwin, C.L., Mohammed, A., Weissman, J.S., Cameron, D.M. & Wykoff, D.D. 2011. Systematic screen of *Schizosaccharomyces pombe* deletion collection uncovers parallel evolution of the phosphate signal transduction pathway in yeasts. Eukaryot. Cell **10**: 198-206.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Robert, T. & O'Shea, E.K. 1994. Phosphorylation of the transcription factor Pho4 by a cyclin-CDK complex, Pho80-Pho85. Science **263**: 1153-1156.
- Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., Huang, L.S. & O'Shea, E.K. 1998a. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. Nature **396**: 482-486.
- Kaffman, A., Rank, N.M. & O'Shea, E.K. 1998b. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. Genes Dev. **12**: 2673-2683.
- Kato, N., Omori, Y., Tani, Y. & Ogata, K. 1976. Alcohol oxidase of *Kloeckera* sp. No.2201 and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structure. Eur. J. Biochem. **64**: 341-350.
- Kerwin, C.L. & Wykoff, D.D. 2009. *Candida glabrata* PHO4 is necessary and sufficient for Pho2-independent transcription of phosphate starvation genes. Genetics **182**: 471-479.
- Kurtzman, C.P. 2011. Chapter 37 *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda & Mikata (1995), In Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.), The yeasts, a taxonomic study, 5th ed., p. 491-495, Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.) 2011. The yeasts, a taxonomic study, 5th edition, Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. 2013. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of the species. FEMS Yeast Res. **13**: 23-33.
- Lee, Y.S., Mulugu, S., York, J.D. & O'Shea, E.K. 2007. Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. Science **316**: 109-112.
- Ljungdahl, P.O. & Daignan-Fornier, B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **190**: 885-929.
- Mayer, A.F., Hellmuth, K., Schlieker, H., Lopez-Ulibarri, R., Oertel, S., Dahlems, U., Strasser, A.W.M. & van Loon, A.P.G.M. 1999. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. Biotechnol. Bioeng. **63**: 373-381.
- Ogata, K., Nishikawa, H. & Ohsugi, M. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. Agric. Biol. Chem. **33**: 1519-1520.
- Ogawa, N., Noguchi, K., Sawai, H., Yamashita, Y., Yompakdee, C. & Oshima, Y. 1995. Functional domain of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signal in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **15**: 997-1004.
- Orkwis, B.R., Davies, D.L., Kerwin, C.L., Sanglard, D. & Wykoff, D.D. 2010. Novel acid phosphatase in *Candida glabrata* suggests selective pressure and niche specialization in the phosphate signal transduction pathway. Genetics **186**: 885-895.
- Oshima, Y. 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Genet. Syst. **72**: 323-334.
- Péter, G., Tornai-Lehoczki, J., Shin, K.S. & Dlačny, D. 2007. *Ogataea thermophila* sp. nov., the teleomorph of *Candida thermophila*. FEMS Yeast Res. **7**: 494-496.
- Phongdara, A., Merckelbach, A., Keup, P., Gellissen, G. & Hollenberg, C.P. 1998. Cloning and characterization of the gene encoding a repressible acid phosphatase (PHO1) from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 77-84.
- Roggenkamp, R., Hansen, H., Eckart, M., Janowicz, Z. & Hollenberg, C.P. 1986. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. Mol. Gen. Genet. **202**: 302-308.
- Rybova, O. B., Chmil, O. M. & Sibirny, A. A. 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast. FEMS Yeast Res. **4**: 157-164.
- Saraya, R., Krikken, A. M., Kiel, J. A. K. W., Baerends, R. J. S., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. **12**: 271-278.
- Schneider, K.R., Smith, R.L. & O'Shea, E.K. 1994. Phosphate-Regulated inactivation of the kinase Pho80-Pho85 by the CDK inhibitor Pho81. Science **266**: 122-126.
- Shin, K.-S., Shin, Y.K., Yoon, J.-H. & Park, Y.-H. 2001. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 2167-2170.
- Suh, S.-O. & Zhou, J.J. 2010. Methylotrophic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. FEMS Yeast Res. **10**: 631-638.
- 田仲加代子 & 山本正幸. 2007. 9.1 生活環における細胞分化シグナル, 大隅良典・下田 親 (編), 酵母のすべて-系統, 細胞から分子まで-, p. 269-278, シュプリンガー・ジャパン, 東京.
- Terns, R.M. & Terns M.P. 2014. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. Trends Genet. **30**: 111-118.
- Tikhomirova, L.P., Ikononova, R.N. & Kuznetsova, E.N. 1986. Evidence for autonomous replication and stabilization of recombinant plasmids in the transformants of yeast *Hansenula polymorpha*. Curr. Genet. **10**: 741-747.
- Toh-e, A., Ohkusu, M., Li, H.M., Shimizu, K., Takahashi-Nakaguchi, A., Gono, T., Kawamoto, S., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H. & Nishizawa, M. 2015. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet. Biol. **80**: 19-30.
- Yadav, K.K., Singh, N. & Rajasekharan, R. 2016. Responses to phosphate deprivation in yeast cells. Curr. Genet. **62**: 301-307.

# メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* における tRNA-sgRNA 融合を用いた CRISPR/Cas9 によるゲノム編集ツールの開発

金子 嘉 信

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

## Development of a genome editing tool by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*

Yoshinobu Kaneko

Yeast Genomic Resources Laboratory, Graduate School of Engineering, Osaka University  
Yamadaoka 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

The methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha* (syn. *Hansenula polymorpha*) is an attractive industrial non-conventional yeast showing high thermo-tolerance (up to 50°C) and xylose assimilation. However, genetic manipulation of *O. polymorpha* is often laborious and time-consuming because of less homologous recombination efficiency in contrast to *Saccharomyces cerevisiae*. To overcome this weakness, we have applied the CRISPR/Cas9 system as a powerful genome editing tool in *O. polymorpha*. In our system, both of single guide RNA (sgRNA) and endonuclease Cas9 were expressed by a single autonomously-replicable plasmid and the sgRNA portion was easily changed using PCR and In-Fusion cloning techniques. Moreover, we employed tRNA<sup>CUG</sup> gene for the sgRNA expression. The editing efficiency of our system was 17 to 71 % of the transformants in several target genes tested. Therefore, it is expected that genetic manipulation of *O. polymorpha* will be more convenient and accelerated by using this CRISPR/Cas9 system.

Key words: Genome editing, CRISPR/Cas9, tRNA-processing, *Ogataea polymorpha*

### 緒 言

*Ogataea polymorpha* (syn. *Hansenula polymorpha*, *Pichia angusta* nom. nud.) は、炭素源およびエネルギー源としてメタノールを利用できるメタノール資化酵母で、メタノール代謝の生化学および生理学を研究するためのモデル生物としてだけでなく、異種タンパク質産生のための宿主としても利用されている (Gellissen, 2000; Stochmann *et al.*, 2009; van der Klei *et al.*, 1991). さらに、*O. polymorpha* は、最高 50°C までの高温で生育可能であり、グルコース、キシロースおよびセロビオース (Ryvoba *et al.*, 2003) を含む様々な炭素源を資化することができるため、バイオエタノール生産のための魅力的な産業用酵母でもある。

*O. polymorpha* 細胞では相同組換えより非相同組換えが頻度高く起こり、*O. polymorpha* の遺伝子操作は少し煩雑で手間がかかる。*Saccharomyces cerevisiae* では、標

的部位と隣接する 40 塩基対の配列を用いることにより、DNA 断片の標的部位への組み込みを効率的に行うことができる。しかし、*O. polymorpha* における効率的な標的部位への組み込みには、500 bp 以上の隣接する相同 DNA 断片が必要である (González *et al.*, 1999)。非同末端結合による二本鎖切断修復に必要な遺伝子 *YKU80* を欠失させると *O. polymorpha* における相同組換え効率が相対的に増加する (Saraya *et al.*, 2012)。しかし、*YKU80* はテロメア長の維持にも必要であり、その機能欠損はしばしば DNA 損傷に対する感受性を増加させる。したがって、しばしば *yku80Δ* 変異を回復させるさらなる操作が必要となる。

最近、ゲノム編集のための CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein 9) システムが細菌から高等真核生物に至る多くの生物で確立されている (Jinek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2013; Friedland *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013)。この技術では 20 ヌクレオチドの標的配列を含むガイド RNA (sgRNA) と

E-mail: kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

エンドヌクレアーゼ Cas9 の複合体が重要な役割を果たす。sgRNA の標的配列によって Cas9 は標的遺伝子座に誘導されて、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列 (5'-NGG-3', N は任意の塩基) の 3bp 上流の標的配列内に二重鎖切断を生じさせる。そして、誤りを生じやすい非相同末端結合による二重鎖切断の修復によって標的遺伝子座に欠失または挿入突然変異が起こる。つまり、マーカー遺伝子を必要としない遺伝子ノックアウトが可能である。また、外来 DNA 断片を同時に導入すると、DNA 断片の相同配列を利用した相同組換えによって標的遺伝子座に外来 DNA 断片を組み込むことができる。

*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* および *Pichia pastoris* などの酵母においてはすでに CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集が実施されている (DiCarlo *et al.*, 2013; Jacobs *et al.*, 2014; Horwitz *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2016; Weninger *et al.*, 2016)。そこで本研究では、*O. polymorpha* における CRISPR/Cas9 システムの有効性を検討した。sgRNA の発現に tRNA 遺伝子を用いた改良 CRISPR/Cas9 システムを用いると、試したいくつかの標的遺伝子 (*ADE12*, *PHO1*, *PHO11*, および *PHO84*) で効率的に突然変異体を得られた。したがって、本研究で開発した改良 CRISPR/Cas9 システムは *O. polymorpha* のゲノム編集の有用なツールとなると期待される。

## 実験材料と実験方法

### 菌株と培地

*O. polymorpha* BY4330 (*ura3-1*) は NBRP-YGRC (<http://yeast.lab.ac.jp/yast/>) から入手した。酵母の培養には 0.2g/L アデニンを追加した Difco YPD broth [50g/L; Becton, Dickinson and Company (BD), USA] の完全培地 (YPDA) または合成デキストロース培地 (SD) を使用して、37°C で増殖させた。SD は 6.7g/L Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (BD) と 20g/L Glucose を含む培地である。平板培地には 2% の寒天を加えた。ハイグロマイシン耐性 (Hyg<sup>R</sup>) 酵母形質転換体の選択にはハイグロマイシン B (200 µg/mL; ナカライテスク, Japan) を追加した YPDA を使用した。アデニン栄養要求性株の赤色コロニーアッセイには、アデニン (10 µg/mL) を SD 平板培地に追加した。組換えプラスミド DNA 調製には ECOS<sup>TM</sup> Competent *E. coli* DH5α (ニッポンジーン, Japan) を宿主として 37°C, 100 µg/mL のアンピシリンを追加した LB 培地 (Miller) (関東化学, Japan) で培養した。

### プラスミドの作製と DNA 操作

使用したすべてのプラスミドおよびプライマーを Table 1 と Table 2 にそれぞれ示した。PCR には PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ, Japan)

**Table 1** Plasmids used in this study

Plasmid	Inserted gene	<i>E. coli</i> marker	Yeast marker
pKS133	<i>hphNT1</i>	Amp	<i>hphNT1</i>
pSC6cen-14a	<i>OpURA3</i> , <i>CEN</i>	Amp	<i>URA3</i>
pHP-Cas901	<i>P<sub>ScTEF1</sub>-Cas9-T<sub>ScCYC1</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pUC-HpSNR6a	<i>OpSNR6</i>	Amp	
pHP-gRNA	<i>P<sub>ScSNR52</sub>-gRNA.CANI-T<sub>ScSUP4</sub></i>	Amp	
pUC-gRNA (ADE12)	<i>P<sub>OpSNR6</sub>-sgRNA(ADE12)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	
pCRIC-ADE12	<i>P<sub>ScTEF1</sub>-Cas9-T<sub>ScCYC1</sub>, P<sub>OpSNR6</sub>-sgRNA(ADE12)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pSC6cen-TDH3p-PHO1	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-OpPHO1-T<sub>OpTDH3</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN27	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN67	<i>P<sub>ScTEF1</sub>-Cas9-T<sub>ScCYC1</sub>, tRNA-sgRNA(ADE12)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN70	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(ADE12)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN77	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO84S49)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN87	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO84S80)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN73	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S13)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN74	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S18)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN80	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S30)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN84	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S40)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN96	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S1)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN91	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S2)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>
pMN93	<i>P<sub>OpTDH3</sub>-Cas9-T<sub>OpTDH3</sub>, tRNA-sgRNA(PHO1S17)-T<sub>OpSNR6</sub></i>	Amp	<i>URA3</i>



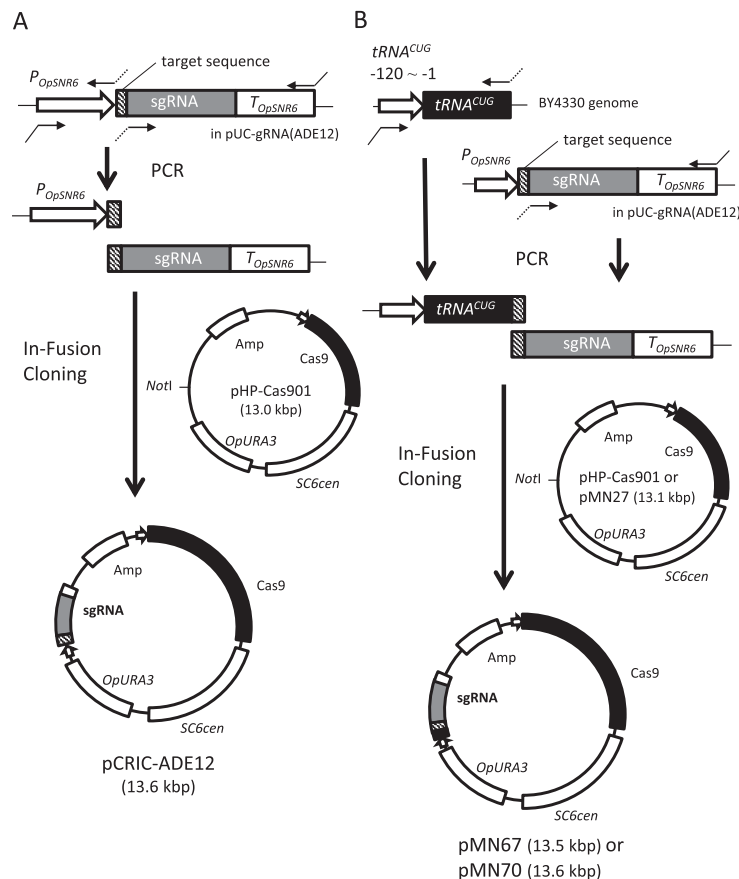
Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence
Cas9-F1	5'-TATAGGGCGAATTGGAGCTCATAGCTTCAAAATGT-3'
Cas9-R1	5'-AGAGCTCGACCTCGACGTACCGCCGCAAATTA-3'
Cas9 ORF-F1	5'-ATGGACAAGAAGTACTCCAT-3'
Cas9-SV40-R1	5'-CTCGAGAAGAGATCACACCT-3'
Cas9-TDH3t-F1	5'-TGATCTCTTCTCGAGGCTCGGCTCCATCTACATAT-3'
TDH3p-Cas9-R1	5'-GTACTTCTTGCCATTTTGTCTATATATCTTTGTACTAAAGAGCAAT-3'
HpSnR6-F	5'-GCAGCTTGTGAAGAAGTTGTCTG-3'
HpSnR6-R	5'-TGGCCGGTCGTATTTTCGTG-3'
SNR52p_gRNA-F1	5'-GCGGCCGCTTCTTTGAAAAGATAATGTATG-3'
SNR52p_gRNA-R1	5'-GCGGCCGCTGACATACTAATTACATGAC-3'
SNR6gRNA_xxx-1F1	5'-AGTCTAGAGCGGCCCTTGTGAAGAAGTTGTCTG-3'
SNR6gRNA_xxx-2R1	5'-ACCGCGTGGCGGCCCTGGCCGGTCGTATTTTCGTG-3'
ADE12_gRNA-F	5'-GCTTAAAACCCACACGCGTGTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'
ADE12_gRNA-R	5'-CTAGCTAAAAAAAAGCACCACCGACTCGGTGCCAC-3'
HP-SNR6v-F2	5'-TTTTTTTAGCTAGCGAAAAAGCTCGGGC-3'
Hp-SNR6v-R	5'-TGTGGGGTTCAAGCGACGTAGAGTAGTGTGG-3'
Hyg F1	5'-CGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
Hyg R1	5'-ATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
ADE12-Hyg F1	5'-GTAGCTCTAACCCAGAAAGATGGTTGCAAAAAGTGAAGAGAGCGCTTGA AACCCACACGCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
ADE12-Hyg R1	5'-TGTTGATGTGACCCAGTTCGCGCCCGTCTGTTGGATTTCCGTACAGTA AACCGACGATCGATGAATTCGAGCTCG-3'
Leu (CUG)-F1	5'-AGTCTAGAGCGGCCCTGTAGTCAAAGTTAAATACCCTGC-3'
Leu (CUG)-sgADE12-R	5'-TGTGGGGTTTCAAGCTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO84-S49-sgRNA F2	5'-AAGCAGGAGACGCAGGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO84-S49 R1	5'-TGCCTCCGCTTTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO84-S80-sgRNA F2	5'-AGATACAGATCTACCGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO84-S80 R1	5'-GGTAGATCTGTATCTTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
Leu-sgPHO1-S13 R1	5'-TGTGGGGTTTCAAGCTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
pUC-gRNA PHO1-S13 F2	5'-GCTCAATTAATCATGCGACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
Leu-sgPHO1-S18 R1	5'-GTCGATAACGTTGGCTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
pUC-gRNA PHO1-T18 F2	5'-GCCAACGTTATCGACTACAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG -3'
PHO1-S30-sgRNA F2	5'-ATTTGCAGCAAGCGAGGACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO1-S30 R1	5'-TCGCTTGCTGCAAATGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO1-S40-sgRNA F2	5'-AGCAAATGCCTGACCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO1-S40 R1	5'-TCGCTTGCTGCAAATGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO11-S1-sgRNA F2	5'-CCGATCAATCTAATGTGTTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO11-S1 R1	5'-CATTAGATTGATCGGTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO11-S2-sgRNA F2	5'-AATGTGTTGCGGTACTTGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO11-S2 R1	5'-GTACCGCAACACATTTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
PHO11-S17-sgRNA F2	5'-AGAGTACTTTGTCAACGATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
tRNA-PHO11-S17 R1	5'-TTGACAAAGTACTTGTGGGCTAAGAGGTTTCGAA-3'
Hyg C R1	5'-GCTGTCGAACTTTTCGATCA-3'
Hyg C F1	5'-GTCTGGACCGATGGCTGTGT-3'
ADE12 seqF1	5'-GTGCCGTTTGCAGTCTGCCG-3'
ADE12 seqR1	5'-CCCATTATCACGCCGACGAG-3'
PHO84 662- F	5'-GCACTGAAACTGTATCAAG-3'
PHO84 -1595 R	5'-GTCTTCTCTTGGTTTCAGG-3'
PHO1 Seq Primer F1	5'-ATGTTTTCCTTGCACG-3'
PHO1 -800 R	5'-TCGCAGAAGCTCGAATGCCC-3'
PHO11 -138 F	5'-AGCTAACTACACGTGCGTAA-3'
PHO11 555 R	5'-ACAGGACGAATTGTAATTGATCC-3'

を用いた。Cas9とsgRNAを発現させるプラスミドはYCp型プラスミドベクターpSC6cen-14aを元に作製した。pSC6cen-14aにCas9遺伝子を組み込んだpHP-Cas901 (Fig. 1A) は以下のようにして構築した: *ScTEF1* プロモーターと *ScCYC1* ターミネーターを含む *Homo sapiens* コドン最適化 Cas9 DNA断片を p414-TEF1p-Cas9-CYC1t (# 43802; Addgene, USA; DiCarlo *et al.*, 2013) を鋳型に, Cas9-F1と Cas9-R1をプライマーにしてPCR増幅した。得られたPCR断片を In-Fusion クローニングキット (タカラバイオ) を用いて *KpnI-XhoI* で切断した pSC6cen-14a に連結した。pMN27 (Fig. 1B) は次のようにして構築した: pHP-901を鋳型として Cas9-ORF-F1と Cas9-SV40-R1のプライマーで Cas9断片を増幅した。また, pSC6cen-TDH3p-PHO1を鋳型として *OpTDH3* プロモーターを含むベクター部分を Cas9-TDH3t-F1と TDH3p-Cas9-R1をプライマーとして増幅し

た。次に, 得られた2つの増幅断片を In-Fusion クローニングで連結した。

sgRNA発現カセットの調製のために, pUC-HpSNR6a および pHP-gRNAを最初に構築した。300bp上流および259bpの下流領域を含む *OpSNR6* 遺伝子を, BY4330のゲノムDNAを鋳型として, プライマー HpSnR6-Fと HpSnR6-Rを用いて増幅した。SNR52プロモーターおよび *SUP4* ターミネーターを含む sgRNA断片は p426-SNR52p-gRNA.CAN1.Y-SUP4t (# 43803; Addgene; DiCarlo *et al.*, 2013) を鋳型とし, SNR52p\_gRNA-F1と SNR52p\_gRNA-R1をプライマーとして増幅した。これらの増幅断片を Mighty Cloning Reagent (Blunt End) (タカラバイオ) を用いて pUC118の *HincII* 部位に挿入し, 得られたプラスミドをそれぞれ pUC-HpSNR6a および pHP-gRNAと命名した。pUC-gRNA(ADE12)を構築するために, pHP-gRNAを鋳型に, ADE12\_gRNA-Fと ADE12\_gRNA-Rをプ



**Fig. 1** Construction of plasmids for the CRISPR/Cas9 system in *O. polymorpha*. The promoter fragment and the sgRNA-terminator fragment were amplified by using primers containing the target sequence. The two resulting PCR amplicons were ligated and inserted into *NotI*-digested pHP-Cas901 (Cas9 expressed by the *ScTEF1* promoter) or pMN27 (Cas9 expressed by the *OpTDH3* promoter) by using In-Fusion cloning. The sgRNA was transcribed with the *OpSNR6* promoter (A) or with the  $tRNA^{CUG}$  promoter containing the tRNA coding region (B).

ライマーとして用いて *OpADE12* 遺伝子を標的とする sgRNA 発現カセットを増幅し、次にプライマー HP-SNR6v-F2 と Hp-SNR6v-R を用いて pUC-HpSNR6a から増幅したベクター部分と増幅 sgRNA 発現カセットを In-Fusion クローニングで連結した。 *OpADE12* 遺伝子座をゲノム編集するためのプラスミド pCRIC\_ADE12 を構築するため、鋳型として pUC-gRNA(ADE12) を、そしてプライマー SNR6gRNA\_xxx-1F1 と SNR6gRNA\_xxx-2R1 を用いて増幅した PCR 断片を、 *NotI* で切断した pHP-Cas901 に In-Fusion クローニングした (Fig. 1A)。 pMN67 と pMN70 の構築は、以下のように行った (Fig. 1B)：プライマー Leu(CUG)-F1 と Leu(CUG)-sgADE12-R を用いて BY4330 ゲノム DNA から tRNA<sup>CUG</sup> 遺伝子を増幅した。 *OpADE12* 遺伝子を標的とする sgRNA 発現カセットを、 pUC-gRNA(ADE12) を鋳型として、プライマー ADE12\_gRNA-F と SNR6gRNA\_xxx-2R1 を用いて増幅した。次に、この PCR 増幅断片を In-Fusion クローニングによって *NotI* で切断した pHP-Cas901 または pMN27 に挿入した。 pMN67, pMN74, pMN77, pMN80, pMN84, pMN87, pMN91, pMN93 および pMN96 は以下のようにして構築した：各標的部位に対応する sgRNA カセットの2つの DNA 断片を鋳型として pMN67 を用いて増幅し、 In-Fusion クローニングを用いて *NotI* 切断した pMN27 に挿入した (Fig. 1B 参照)。

変異遺伝子座を解析するために、Kaneka Easy DNA Extraction Kit version 2 (カネカ, Japan) を用いて単一コロニーからゲノム DNA を抽出し、PCR 増幅のための鋳型 DNA として使用した。 PCR 断片を QIAquick PCR 精製キット (QIAGEN, Germany) で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列解析を行った。 遺伝子ノックアウトのために、 *OpADE12* 座に対して 60bp の相同領域を有するまたは有さない Hyg<sup>R</sup> カセットを pKS133 (Janke *et al.*, 2004) を鋳型にして増幅した。 Hyg<sup>R</sup> カセット (*hphNT1*, 1.7kb) は、 *Ashbya gossypii* *TEF* プロモーター、ハイグロマイシン B ホストトランスフェラーゼをコードする大腸菌プラスミド由来 *hph* 遺伝子および *S. cerevisiae* *CYC1* ターミネーターから構成される。

#### 酵母形質転換

*O. polymorpha* の形質転換は Frozen-EZ Yeast transformation II Kit (Zymo Research, USA) を用いて行った。 約 0.2  $\mu$ g の環状プラスミド DNA または 2  $\mu$ g の線状 DNA 断片を形質転換に用いた。

#### 酸性ホスファターゼ活性のコロニー染色検出法

以前に報告したコロニー活性染色法 (Zhou *et al.*, 2016) によって酸性ホスファターゼ活性を検出した。

## 結 果

#### ゲノム編集のための CRISPR/Cas9 システムの実施

CRISPR/Cas9 システムが *O. polymorpha* で有効に働くかどうか調べるため、まず Cas9 と sgRNA の両方を1つのプラスミドで発現させる CRISPR/Cas9 プラスミドを構築した。 Cas9 のゲノム標的部位は sgRNA 中の 20 スクレオチド標的配列を置換することによって変更できる。 標的配列を含むプライマーを用いて増幅された sgRNA の PCR 断片を In-Fusion クローニングによって Cas9 ベクターに挿入した (Fig. 1)。 CRISPR/Cas9 プラスミドの有効性を試験するために、最初に *ScADE2* のオルソログである *OpADE12* 遺伝子 (Gleeson & Sudbery, 1988) を標的とした。 この遺伝子の欠損は限定量のアデニンしか含まない培地上で赤色コロニーを形成する表現型でモニターすることができるので、 *OpADE12* 遺伝子を CRISPR/Cas9 活性の評価のための最初の標的として使用することにした。 プラスミド pCRIC\_ADE12 は *URA3* 選択マーカー、 Cas9 および *OpADE12* 遺伝子を標的とする sgRNA を含んでいる (Fig. 1A)。 sgRNA は真核生物の CRISPR/Cas9 システムで一般的に使用されている *OpSNR6* (*O. polymorpha* の U6 small noncoding RNA) 遺伝子のプロモーターによって発現されるようにした (Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013)。 BY4330 (*ura3-1*) へ pCRIC\_ADE12 を導入すると、得られた Ura<sup>+</sup> 形質転換体の中にアデニン要求性 (Ade<sup>-</sup>) を示すクローンが 10<sup>-3</sup> の頻度で出現した (Table 3)。 2つの Ade<sup>-</sup> クローンを任意を選んで *OpADE12* 遺伝子座の塩基配列を分析すると、 Ade<sup>-</sup> 変異体は *OpADE12* 遺伝子座内の CRISPR/Cas9 システムでの推定切断部位に 1塩基挿入あるいは 2塩基欠失の変異を生じていることがわかった。

次に、他の2つの標的遺伝子、 *OpADE8* および *OpPHO85* についてもゲノム編集を試みた。 *OpADE8* は BY4329 のドラフトゲノム配列 (Zhou *et al.*, 2016) から *ScADE8* のホモログとして同定され、 *ade8* 欠損突然変異体は Ade<sup>-</sup> 表現型が期待される。 *OpPHO85* はリン酸シグナル伝達 (PHO) 経路に参与するサイクリン依存性タンパク質キナーゼをコードする *ScPHO85* のオルソログとして以前に同定されており、その突然変異は抑制性酸性ホスファターゼ (APase) の構成的産生を示す (Zhou *et al.*, 2016)。 CRISPR/Cas9 プラスミドを細胞に導入して培養をしばらく継続してゲノム編集候補株をスクリーニングすると、 CRISPR/Cas9 システムの効率がしばしば

**Table 3** Mutagenesis efficiency of *OpADE12* using the CRISPR/Cas9 system

Plasmid	Cas9	sgRNA	Mutation efficiency		Transformation
	promoter	promoter	(Ade <sup>-</sup> /Ura <sup>+</sup> )		efficiency (Ura <sup>+</sup> /μg)
pHP-Cas901	<i>ScTEF1</i>	No sgRNA	0%	(0/242)	3.3 x 10 <sup>3</sup>
pCRIC-ADE12	<i>ScTEF1</i>	<i>OpSNR6</i>	0.36%	(2/552)	2.7 x 10 <sup>3</sup>
pMN67	<i>ScTEF1</i>	<i>tRNA<sup>CUG</sup></i>	38%	(92/245)	1.2 x 10 <sup>3</sup>
pMN70	<i>OpTDH3</i>	<i>tRNA<sup>CUG</sup></i>	45%	(48/106)	5.3 x 10 <sup>2</sup>

**Table 4** Targeting efficiency of donor DNA using the CRISPR/Cas9 system

Host	Donor DNA	Targeting efficiency	
		(Ade <sup>-</sup> /Hyg <sup>R</sup> )	
BY4330 [pHP-Cas9]	<i>hphNT1</i>	0%	(0/284)
BY4330 [pHP-Cas9]	<i>hphNT1</i> + homologous arm	0%	(0/680)
BY4330 [pCRIC-ADE12]	<i>hphNT1</i>	12%	(46/388)
BY4330 [pCRIC-ADE12]	<i>hphNT1</i> + homologous arm	47%	(186/394)

上昇することが報告されているので (Schwartz *et al.*, 2016), Ura<sup>+</sup> 形質転換体を液体 SD 培地で一晚増殖させた。その結果, *ade8* および *pho85* 変異体の両方を得たが, 変異効率はそれぞれわずか 0.36% および 0.08% であり, 効率の顕著な増加は見られなかった。

#### CRISPR/Cas9 システムによる供与 DNA の染色体組み込み

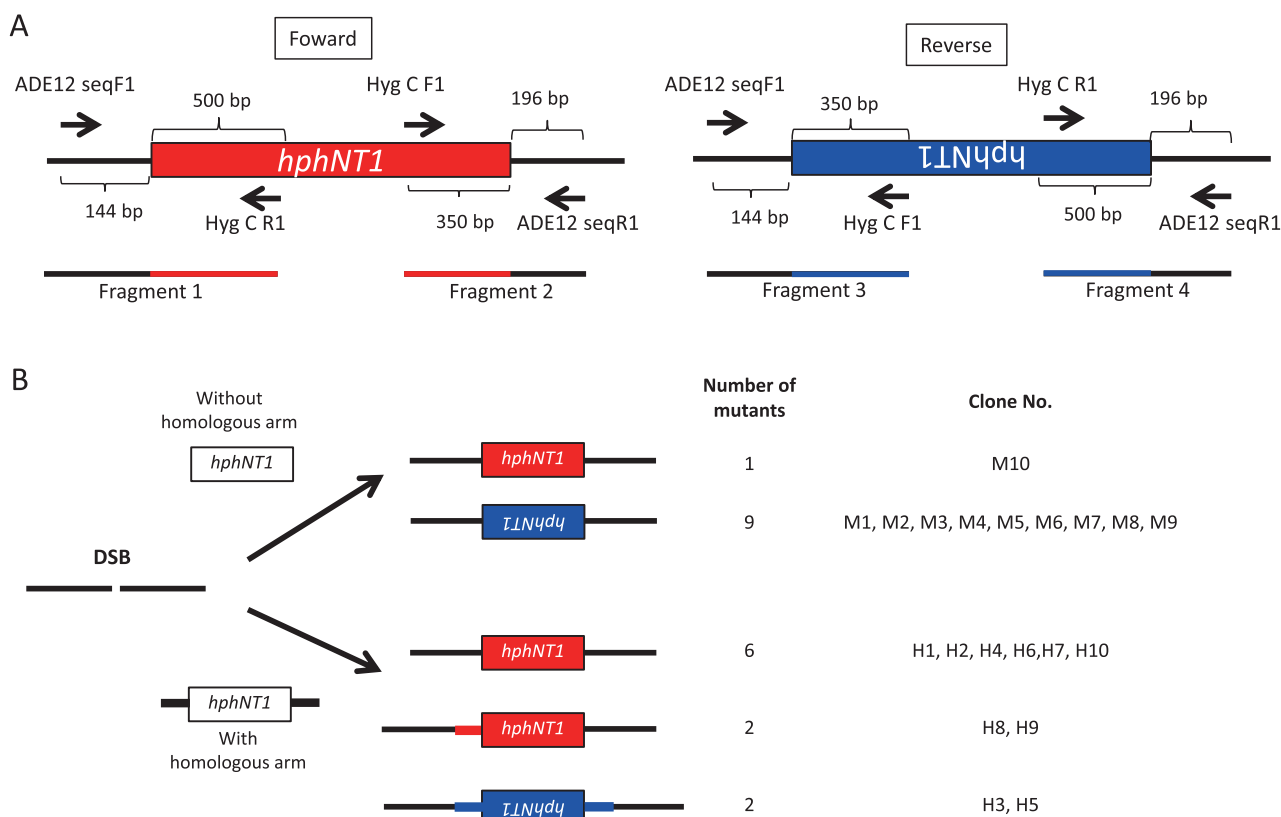
CRISPR/Cas9 システムによる供与 DNA の標的化された組み込みを調べるために, 60bp 相同領域をもつあるいはもたない Hyg<sup>R</sup> カセット (*hphNT1*) DNA を用いた *OpADE12* 遺伝子の破壊を試みた。プラスミド pCRIC\_ADE12 をもつ細胞を *hphNT1* DNA で形質転換し, 得られた Hyg<sup>R</sup> 形質転換体の Ade 表現型を調べた。Table 4 に示すように, *hphNT1* DNA を相同領域なしで導入した場合は Hyg<sup>R</sup> 形質転換体の 12% が, 相同領域がある場合は 47% が Ade<sup>-</sup> 表現型を示した。対照的に, Cas9 酵素のみを発現するプラスミド pHP-Cas9 による形質転換では, Ade<sup>-</sup> コロニーが得られなかった。このことから CRISPR/Cas9 システムによって誘導された二重鎖切断が標的ゲノム部位に供与 DNA の組込みを促進すると考えられた。

相同領域あるなしの供与 DNA のそれぞれで, 無作為に 10 個の Ade<sup>-</sup> Hyg<sup>R</sup> 形質転換体を選択し, *OpADE12* 標的遺伝子座について PCR 増幅と DNA 塩基配列決定により分析を行った (Fig. 2)。PCR 増幅分析から調べたすべての形質転換体で標的部位に供与 *hphNT1* が挿入され

ていることを確認できた (Fig. 2A & B)。しかしながら, 興味深いことに, PCR 増幅断片の DNA 塩基配列分析は様々なパターンを示した。相同領域がない供与 DNA の場合, 10 個の Ade<sup>-</sup> 形質転換体のうち 9 個は *OpADE12* 転写と反対方向に供与 DNA が組み込まれており, そのうち 6 個は組み込みの接合部で 1~23 塩基の欠失が生じていた (Fig. 2B & D)。一方, 相同領域をもつ供与 DNA の場合, *OpADE12* と同じ転写方向に *hphNT1* が挿入された Ade<sup>-</sup> 形質転換体 8 個と反対方向に *hphNT1* が挿入された Ade<sup>-</sup> 形質転換体が 2 個であった (Fig. 2B)。同じ方向に挿入された 8 個の形質転換体のうちの 6 個では, *hphNT1* DNA は標的部位にそのまま組み込まれていた。しかし, 残りの 2 個では 5'-側相同領域にそのまままたは 2 塩基欠失で連結されていた。反対方向に挿入された 2 つの Ade<sup>-</sup> 形質転換体では 5' 末端に 1 つか 2 つの塩基欠失を有し, 3' 末端に欠失なしに 1 塩基欠失が見られた (Fig. 2D)。

#### tRNA-sgRNA 融合による遺伝子編集効率の向上

細胞内の sgRNA 量が CRISPR/Cas9 システムの編集効率にとって重要であることがいくつか報告されている (Cong *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2015)。そこで, ゲノム編集での突然変異効率を高めるために sgRNA 発現カセットを再設計することにした。通常, sgRNA は 5' 末端キャッピングや 3' 末端ポリ A 付加などの転写物の末端修飾を避けるために,



**Fig. 2** Integration of donor DNAs into the target site in various patterns. **A.** Principle of PCR analysis of donor DNA integration. To examine whether the donor DNA was integrated into the *ADE12* target site, PCR amplification was performed with four pairs of primers: (1) ADE12 seqF1 and Hyg C R1; (2) ADE12 seqR1 and Hyg C F1; (3) ADE12 seqF1 and Hyg C F1; and (4) ADE12 seqR1 and Hyg C R1. If the donor DNA was integrated at the *ADE12* site in the direction of transcription (forward), fragments 1 and 2 would be amplified. If integration occurred in the opposite direction, fragments 3 and 4 would be amplified. If the donor DNA was integrated elsewhere, no amplicon would be obtained with any primer pair. **B.** Summary of integration patterns of the donor DNA at the *ADE12* target site. Ten *ade12* mutants obtained with each donor DNA with or without homologous arms were analyzed by PCR, and the insertion direction of the donor DNA was assessed. The junction sequences of integration were then confirmed by sequencing each amplified fragment (see panel D). In four mutants with donor DNA without homologous arms (M2, M4, M5, and M7), the donor DNA was simply inserted at the target site in the reverse direction. The other six mutants contained a small deletion at one or both sides of the inserted donor DNA. Of the ten *ade12* mutants with the donor DNA with 60-bp homologous arms, only two (H3 and H5) showed the reverse pattern of insertion; among the mutants with forward insertion, fragment 1 amplicons from mutants H8 and H9 were slightly larger than the other fragment 1 amplicons. **C.** Primer sequences used for PCR amplification of the donor DNAs. The 60-bp homologous sequences to the *ADE12* target site are shown in bold. **D.** Junction sequences of the integrated donor DNAs without (M clones) and with (H clones) homologous arms in the *ade12* mutants. PCR products (fragments 1–4 in panel A) were used as templates for sequence analysis. The CRISPR/Cas9 target sequence is underlined; the PAM sequence is indicated in italics. Red and blue letters indicate the sequences of, respectively, the forward- and reverse-integrated cassette (see also panel B). In the M1 mutant, the donor DNA was inserted with a deletion at both sides in addition to a 16-bp deletion of the PAM side of targeted *ade12* locus. Sequence analysis of fragments 1 and 2 amplified from H1 suggested that ideal insertion of the donor DNA occurred by homologous recombination in the major class of mutants.

Continued on the next page.

C

Hyg F1 5' -CGTACGCTGCAGGTCGAC-3'  
 Hyg R1 5' -ATCGATGAATTCGAGCTCG-3'  
 ADE12-Hyg F1 5' -GTAGCTCTAACCCAGAAGAATGGTTGCAAAAGTGCAAGAGAGCGCTTGAACCCACACAGCGTACGCTGCAGGTCGAC-3'  
 ADE12-Hyg R1 5' -TGTGGATGTGACCCAGTTCCGGCCGGTCTGTTGGATTTCCGTACAGGTAACCAGCATCGATGAATTCGAGCTCG-3'

D

965 1084

WT	GTAGCTCTAACCCAGAAGAATGGTTGCAAAAGTGCAAGAGAGCGCTTGAACCCACACAGCGTTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCCAACAGACCGGGCCGGAAACTGGGTACATCAACA	
M1	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG-----TGAATTCGAGCTCG... 5bp del.
M2	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACAGTCGATGAATTCGAGCTCG... No indel
M3	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG-TCGATGAATTCGAGCTCG... 1bp del.
M4	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACAGTCGATGAATTCGAGCTCG... No indel
M5	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACAGTCGATGAATTCGAGCTCG... No indel
M6	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACAGTCGATGAATTCGAGCTCG... No indel
M7	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACAGTCGATGAATTCGAGCTCG... No indel
M8	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG---GATGAATTCGAGCTCG... 3bp del.
M9	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG---GATGAATTCGAGCTCG... 3bp del.
M10	Fragment 1	...GCTTGAACCCACACGCGTACGCTGCAGGTCGAC... No indel
WT	GTAGCTCTAACCCAGAAGAATGGTTGCAAAAGTGCAAGAGAGCGCTTGAACCCACACAGCGTTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCCAACAGACCGGGCCGGAAACTGGGTACATCAACA	
M1	Fragment 4	...GTCGACCTGCA-----CGGAAAAATCC... 23bp del.
M2	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M3	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M4	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M5	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M6	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTA--CGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... 2bp del.
M7	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M8	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M9	Fragment 4	...GTCGACCTGCAGCTACGCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... No indel
M10	Fragment 2	...CGAGCTCGAATTCATCGA-CGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... 1bp del.
WT	GTAGCTCTAACCCAGAAGAATGGTTGCAAAAGTGCAAGAGAGCGCTTGAACCCACACAGCGTTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCCAACAGACCGGGCCGGAAACTGGGTACATCAACA	
H1	Fragment 1	...GCTTGAACCCACACGCGTACGCTGCAGGTCGAC... Replacement
H3	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG-GTTGATGTGACCCAGTT... Insertion+1bp del.
H5	Fragment 3	...GCTTGAACCCACACG--TTGATGTGACCCAGTT... Insertion+2bp del.
H8	Fragment 1	...GCTTGAACCCACACG--AGCTCTAACCCAGAAG... Insertion+2bp del.
H9	Fragment 1	...GCTTGAACCCACACGCTAGCTCTAACCCAGAAG... Insertion
WT	GTAGCTCTAACCCAGAAGAATGGTTGCAAAAGTGCAAGAGAGCGCTTGAACCCACACAGCGTTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCCAACAGACCGGGCCGGAAACTGGGTACATCAACA	
H1	Fragment 2	...GAGCTCGAATTCATCGATCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... Replacement
H3	Fragment 4	...CTTCGGGTTAGAGCTACCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... Insertion
H5	Fragment 4	...CTTCGGGTTAGAGCTA-CGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... Insertion+1bp del.
H8	Fragment 2	...GAGCTCGAATTCATCGATCGTCGGTTTACCTGTACGGAAAAATCC... Replacement

Fig. 2 continued

5S RNA, tRNAおよびsnRNAを転写するRNAポリメラーゼ III (Pol III) で転写発現させる。しかし、最近sgRNA発現のために内在性tRNAプロセシングシステムを利用した効率的なCRISPR/Cas9システムがイネにおいて開発された (Xie *et al.*, 2015)。tRNA前駆体の5'および3'末端はそれぞれRNase PおよびtRNase Zによって切断されるため、tRNA-sgRNA融合遺伝子の一次転写産物はこの内在性tRNAプロセシングシステムによって細胞内で成熟sgRNA分子に変換され、成熟sgRNAはCas9と複合体を形成し、標的遺伝子座に結合すると期待される。さらに、tRNA遺伝子はコーディング配列内にPol IIIのための内部プロモーターエレメント (AおよびBボックス) をもち、tRNA遺伝子がPol IIIの転写エンハンサーとしても働くことも期待できる。これらの特徴を考慮して、tRNA遺伝子を*O. polymorpha*でもsgRNA高発現に適用可能であると考えた。まず、tRNA-scan-SEプログラム (Lowe & Eddy, 1997) を用いて、*O. polymorpha* BY4329のゲノム中の80の潜在的tRNA遺伝子を同定した。この予測された遺伝子数は、*Ogataea*

*parapolymorpha* DL-1ゲノム解析の結果と一致した (Ravin *et al.*, 2013)。DL-1は最近まで*H. polymorpha* (*O. polymorpha*の異名) として同定されていた (Kurtzman, 2011)。高いコドン使用頻度のtRNA遺伝子は細胞内で高発現されると考え、最も頻繁に使用されるコドンとして、*O. polymorpha* (*Pichia angusta* nom. nud.) のコドン使用データベース中の上位5つのコドンを選んだ。次に、一部のtRNA遺伝子では重複した遺伝子座が存在しているため、tRNA遺伝子あたりのコドン使用率を計算した。Table 5に示すように、CUGコドンは*O. polymorpha*中のtRNA遺伝子あたり最も高いコドン使用頻度であると計算された。したがって、CUGコドンに対応するtRNA<sup>CUG</sup>遺伝子が最も高く発現されると推定し、それをsgRNAの高発現のための改変CRISPR/Cas9プラスミドに使用した (Fig. 1B)。

*OpADE12*を標的とした改変CRISPR/Cas9プラスミド (pMN67) を構築し、これを用いてBY4330 (*ura3-1*) を形質転換した。*ScTEF1*プロモーターの代わりに*OpTDH3*プロモーターを使用した第2の改変プラスミド

**Table 5** Predicted top five codons used most frequently in *O. polymorpha*

Codon	Amino acid	Codon usage* (per 1000 codons)	Number of tRNA genes**	Codon usage per tRNA gene
GAG	Glu	41.3	3	13.8
GAC	Asp	38.3	3	12.8
AAG	Lys	37.5	3	12.5
AAC	Gln	30.5	2	15.3
CUG	Leu	30.5	1	30.5

\*Selected from the Codon usage database of Kazusa DNA Res. Inst.

(http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4905)

\*\*Predicted by tRNAscan-SE analysis (Lowe &amp; Eddy, 1997).

**Table 6** Mutagenesis of OpPHO1 and OpPHO11 using the CRISPR/Cas9 plasmid

Plasmid	Target position*	Mutation efficiency (mutants/transformants)	Mutation pattern (observed number)	Sequence of the target region**
pMN73	PHO1S13 (193-212)	0% (0/7)	Wild-type (7)	AATTGAACAGGCTCAATTATTCATGCGACA CGGGGAAAGATTC
pMN74	PHO1S18 (280-299)	50% (2/4)	Wild-type (2) 1-bp deletion (1) 3-bp deletion (1)	ACTCAAGAAGGCCAACGTTATCGACTACAA AGGACCTCTAGCC ACTCAAGAAGGCCAACGTTATCGACT-CAAAGGACCTCTAGCC ACTCAAGAAGGCCAACGTTATCGA---CAAAGGACCTCTAGCC
pMN80	PHO1S30 (471-490)	71% (5/7)	Wild-type (2) 1-bp insertion (1) 1-bp deletion (4)	TTCTACCTATATTTGCGCAAGCGAGGACA GGGTTGTGGACAC TTCTACCTATATTTGCGCAAGCGAGGACAGGGTTGTGGACAC TTCTACCTATATTTGCGCAAGCGAG-ACAGGGTTGTGGACAC
pMN84	PHO1S40 (594-613)	0% (0/9)	Wild-type (9)	CCAGCAAAGGAGCAAATGCCCTGACCACCA AGGACAATTGTCC
pMN96	PHO1S1 (89-108)	0% (0/8)	Wild-type (8)	CAAACATCGACCGATCAATCTAATGTGTTGCGGTTACTTGAATG
pMN91	PHO1S2 (100-119)	30% (3/10)	Wild-type (7) 1-bp deletion (1) 3-bp deletion (1) 13-bp deletion (1)	CGATCAATCTAATGTGTTGCGGTACTTGAA TGGGGACCGTTT CGATCAATCTAATGTGTTGCGGTACT- GAA TGGGGACCGTTT CGATCAATCTAATGTGTTGCGGTA--- GAA TGGGGACCGTTT CGATCAATCTAATGTGTTGCGGTA----- CCGTTT
pMN93	PHO1S17 (327-346)	17% (1/6)	Wild-type (5) 2-bp deletion (1)	TGAAGGACCTAGAGTACTTTGTCAACGATC CGGAAAATTACGA TGAAGGACCTAGAGTACTTTGTCAACG--CCGGAAAATTACGA

\*The number in parentheses indicates the nucleotide position from the initiation codon ATG.

\*\*Underline indicates the targeting sequence of sgRNA; and italic indicates the PAM sequence.

(pMN70) も、pMN67 と比べて Cas9 のより高い発現を期待して形質転換に使用した。Table 3 に示すように、これら2つの CRISPR/Cas9 プラスミド (pMN67 と pMN70) では同程度の高い効率 (38% と 45%) で Ade<sup>-</sup> 変異体が得られた。pMN67 で形質転換された5つの Ade<sup>-</sup> コロニーの塩基配列解析から1塩基あるいは2塩基の欠失が生じていることがわかった。つまり、改変 CRISPR/Cas9 システムでの突然変異効率が最初のシステムの突然変異効率の100倍であることが示された。

#### 改良 CRISPR/Cas9 システムによる PHO 経路遺伝子のゲノム編集

改善された CRISPR/Cas9 システムの有効性を他の遺伝子でも検証するため、PHO 経路を構成する遺伝子か

ら *OpPHO1*, *OpPHO11* および *OpPHO84* を選択した。*OpPHO1* および *OpPHO11* はそれぞれ、*S. cerevisiae* 酸性ホスファターゼ (APase) をコードする *ScPHO5* とアミノ酸配列で35%および33%同一である。また、*OpPHO84* は BY4329 のドラフトゲノム解析 (Maekawa & Kaneko, 2014) の注釈情報から *S. cerevisiae* 高親和性リン酸トランスポーターをコードする *ScPHO84* のホモログと考えられる。

*OpPHO1* 遺伝子座と *OpPHO11* 遺伝子座にそれぞれ4つおよび3つの標的部位を設計した (Table 6)。4-10個の無作為に選択した Ura<sup>+</sup> 形質転換体クローンの塩基配列解析により、PHO1S18, PHO1S30, PHO1S2 および PHO1S17 の標的部位で17-71%の変異効率で *OpPHO1* および *OpPHO11* の挿入/欠失 (indel) 突然変異

が起こっていた。しかし、残りの3つの標的部位（すなわち、PHO1S13, PHO1S40 および PHO11S1）については、調べた7-9個のUra<sup>+</sup>形質転換体中に突然変異体は観察されなかった（Table 6）。

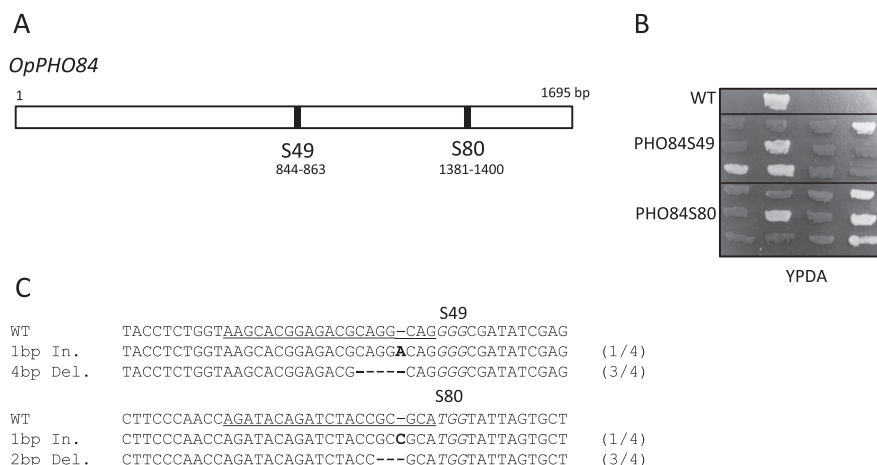
*S. cerevisiae*において、*PHO84* 遺伝子の欠損変異は高リン酸条件下での構成的 APase 産生を示す（Bun-Ya *et al.*, 1991）。改良 CRISPR/Cas9 システムによる *OpPHO84* の突然変異誘発を試験するために、遺伝子コーディング内の2つの部位、すなわち ATG 開始コドンから 844-863 bp に位置する PHO84S49（pMN77）および 1381-1400 bp に位置する PHO84S80（pMN87）を選んだ（Fig. 3A）。調べた12個のUra<sup>+</sup>形質転換体の中で、APase 活性の構成性表現型を示す変異体が高効率（67%）で得られた（Fig. 3B）。PHO84S49 および PHO84S80 構成変異体のそれぞれ2クローンの塩基配列解析の結果、indel 変異が期待どおり両方の標的部位で生じていることがわかった（Fig. 3C）。

以上の結果から、標的部位によっては高効率に働かない場合もあるが、他の生物での場合と同じく *O. polymorpha* でも改良 CRISPR/Cas9 システムによって実用的な高い効率でゲノム編集が可能であることを確認できた。

## 考 察

ゲノム編集のための CRISPR/Cas9 システムはいくつ

かの酵母種を含む多くの生物での適用例が報告されている（Jinek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Kimura *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2013; Friedland *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Jacobs *et al.*, 2014; Horwitz *et al.*, 2015; Schwartz *et al.*, 2016; Mali *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015）。本研究では、メタノール酸化耐熱性酵母 *O. polymorpha* におけるゲノム編集ツールとしての CRISPR/Cas9 システムの実用性を検討した。*OpSNR6* プロモーターで sgRNA を発現する最初の CRISPR/Cas9 システムでは実用的な *O. polymorpha* のゲノム編集には至らなかった。しかし、tRNA-sgRNA 融合遺伝子として発現させる改変システムは *OpADE12* の突然変異効率を約100倍増加させ、40%前後まで高めた（Table 3）。同様に、改良 CRISPR/Cas9 システムで他の遺伝子の変異体（*OpPHO1*, *OpPHO11* および *OpPHO84*）も17-71%と高い効率で得られた（Fig. 3C と Table 6）。したがって、改善された CRISPR/Cas9 システムは *O. polymorpha* における実用的な遺伝子操作ツールとなりうる。しかし、現時点では、改良 CRISPR/Cas9 システムでもみられた標的部位の違いによる編集効率の大きなばらつきをうまく説明することはできない。最近、Hinz *et al.*（2015）は *in vitro* で組換えヌクレオソームを基質として Cas9 活性を測定し、PAM がヌクレオソーム内に位置する場合には Cas9 活性が強く阻害されるが、リンカー DNA 内に位置する



**Fig. 3** Mutation of *OpPHO84* by the CRISPR/Cas9 system. A. Target positions (S49 and S80) for genome editing of the *OpPHO84* gene. The target region is indicated by nucleotide number from the start codon of *OpPHO84* (A is +1). B. Phenotype of acid phosphatase production. Acid phosphatase activity was determined by a colony-staining assay on YPDA plates as described previously (Zhou *et al.*, 2016). Colony color turns red if cells produce the enzyme. Red color is expressed as dark color in this photo. WT, PHO84S49, and PHO84S80 indicate BY4330 transformants containing pMN27, pMN77, and pMN87, respectively. C. Sequence analysis of the target region in four of the APase-constitutive clones shown in B. The target sequence of S49 and S80 is underlined; the PAM sequence is shown in italics.



PAMの場合には阻害されないことを見出した。したがって、ヌクレオソーム中のPAMの位置が*in vivo*で効率的なゲノム編集の重要なポイントになる可能性も考えられる。

CRISPR/Cas9システムにより、Hyg<sup>R</sup>マーカーをゲノムの特定の標的部位に効率的に組み込むことができ (Table 4)、相同領域をもたないHyg<sup>R</sup>マーカーでも比較的高い頻度 (12%) で *OpADE12* 座に組み込まれた。したがって、遺伝子破壊の表現型が予測できる場合にはCRISPR/Cas9システムは選択マーカーのみの導入で遺伝子破壊変異体が取得できる。また、60塩基の相同領域を両端にもたせたHyg<sup>R</sup>マーカーでは、より長い相同領域断片を必要とする従来の遺伝子破壊法 (González *et al.*, 1999) よりも効率的に遺伝子破壊変異体を得られた。CRISPR/Cas9システムによって導入DNAを標的部位に組み込む方法は *O. polymorpha* ゲノムの特定部位に点突然変異またはタグ断片を導入するなどの他の状況においても有用と思われる。しかし、Fig. 2Dに示したようにゲノム標的部位への組み込みは様々なパターンで起こるため、導入DNAがインフレームに挿入されていることを確認する作業が必要である。導入DNAが様々なパターンで組み込まれたのは、*O. polymorpha* 細胞で相同組換えよりもエラーが起こりやすい非同相末端結合の方がより強い活性を示すためかもしれない。

sgRNAにtRNA遺伝子を融合して発現させると、細胞内sgRNA量が増加し、酵母 (Schwartz *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2014) および植物 (Xie *et al.*, 2015) におけるゲノム編集の効率が高い。実際、tRNA-sgRNA融合発現システムは *O. polymorpha* においてもCRISPR/Cas9編集の標的突然変異効率を有意に高くした (Table 3)。さらにXie *et al.* (2015) は8個のsgRNAを含むタンデム配列のtRNA-sgRNAカセットを使用してイネの多重ゲノム編集が可能であることも示した。tRNA-sgRNA融合システムは *O. polymorpha* において良好に機能するので、タンデムtRNA-sgRNAアレイを用いた多重ゲノム編集も *O. polymorpha* において適用できると考えられる。

結論として、本研究で開発した改変CRISPR/Cas9システムは *O. polymorpha* の遺伝子操作をより便利にし、*O. polymorpha* 株の育種を促進し、分子生物学および合成生物学および代謝工学を含む様々な分野で利用されることが期待される。

## 要 約

メタノール資化酵母である *Ogataea polymorpha* (syn. *Hansenula polymorpha*) は、高い耐熱性 (50℃まで) とキシロース資化性も示す魅力的な産業酵母である。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* とは対照的に、相同組換

え効率が低いため、*O. polymorpha* の遺伝子操作はしばしば面倒で時間がかかる。この弱点を克服するために、*O. polymorpha* に強力なゲノム編集ツールとしてCRISPR/Cas9システムを適用した。我々のシステムでは、ガイドRNA (sgRNA) とエンドヌクレアーゼ Cas9 の両方を単一の自律複製可能なプラスミドで発現させ、PCRおよびIn-Fusionクローニング技術を用いてsgRNA部分を容易に交換できるようにしている。さらにsgRNA発現にはtRNA<sup>CUG</sup>遺伝子を融合させたカセットを用いた。このシステムの編集効率は試したいくつかの標的遺伝子において得られた形質転換体の17-71%であった。したがって、このCRISPR/Cas9システムを用いることにより、*O. polymorpha* の遺伝子操作がより便利になり、加速されることが期待される。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 金子嘉信, 周 瑩, 前川裕美. 2014. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の新しい高安定性プラスミドベクター, 第66回日本生物工学会大会, 9月, 札幌.
- 沼本 穂, 前川裕美, 金子嘉信. 2015. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* におけるCRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第67回日本生物工学会大会, 10月, 鹿児島.
- 沼本 穂, 前川裕美, 金子嘉信. 2016. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の改良CRISPR/Cas9によるゲノム編集, 第68回日本生物工学会大会, 9月, 富山.
- Numamoto, M., Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2016. P-246 Genome editing in *Hansenula polymorpha* using CRISPR/Cas9 system, 14th International Congress on Yeasts, September, Awaji city, Hyogo, Japan.

### 原著論文

- Numamoto, M., Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2017. Efficient genome editing by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. J. Biosci. Bioeng. **124**: 487-492 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.001>).

## 保存機関に寄託した微生物株

CRISPR/Cas9システムのゲノム編集で得られた *O. polymorpha* の *ade12* 突然変異体 (BY28911, BY28912) と *pho* 突然変異体 (BY28926~BY28943) 及び Table 1 に記載したプラスミド (BYP9596~BY9615) はNBRP酵母遺伝資源センター (分担機関: 大阪大学工学研究科生命先端工学専攻) に寄託した。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成に

よって行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして、本研究は当寄附講座博士研究員の沼本 穂さんの協力のもとに実施しました。また、*S. cerevisiae*用のCRISPR/Cas9 プラスミド (#43802, #43803) を提供してくれた Addgene (Cambridge, MA, USA) にも感謝します。

## 文 献

- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. & Oshima, Y. 1991. The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 3229–3238.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. & Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819–823.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. & Church, G. M. 2013. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4336–4343.
- Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiácovo, M. P., Church, G. M. & Calarco, J. A. 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods* **10**: 741–743.
- Gellissen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741–750.
- Gleeson, M. A. & Sudbery, P. E. 1988. Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **4**: 293–303.
- González, C., Perdomo, G., Tejera, P., Brito, N. & Siverio, J.M. 1999. One-step, PCR-mediated, gene disruption in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **15**: 1323–1329.
- Hinz, J. M., Laughery, M. F. & Wyrick, J. J. 2015. Nucleosomes inhibit Cas9 endonuclease activity *in vitro*. *Biochemistry* **54**: 7063–7066.
- Horwitz, A. A., Walter, J. M., Schubert, M. G., Kung, S. H., Hawkins, K., Platt, D. M., Hernday, A. D., Mahatdejkul-Meadows, T., Szeto, W., Chandran, S. S. & Newman J. D. 2015. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Syst.* **1**: 88–96.
- Jacobs, J. Z., Ciccaglione, K. M., Tournier, V. & Zaratiegui, M. 2014. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nat. Commun.* **5**: 5334.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. & Knop, M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–962.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**: 233–239.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A. & Higashijima, S. 2014. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Sci. Rep.* **4**: 1–7.
- Kurtzman, C.P. 2011. A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolyomorpha*, the ascospore state of *Candida parapolyomorpha*. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**: 455–462.
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G. M. & Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* **31**: 688–691.
- Lowe, T. M. & Eddy, S. R. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**: 955–964.
- Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLoS Genet.* **10**: e1004796.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. & Church, G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823–826.
- Ravin, N. V., Eldarov, M. A., Kadnikov, V. V., Beletsky, A. V., Schneider, J., Mardanov, E. S., Smekalova, E. M., Zvereva, M. I., Dontsova, O. A., Mardanov, A. V. & Skryabin, K. G. 2013. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* **14**: 837.
- Ryan, O. W., Skerker, J. M., Maurer, M. J., Li, X., Tsai, J. C., Poddar, S., Lee, M. E., DeLoache, W., Dueber, J. E., Arkin, A. P. & Cate, J. H. D. 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife* **3**: e03703.
- Rybova, O. B., Chmil, O. M. & Sibirny, A. A. 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast. *FEMS Yeast Res.* **4**: 157–164.
- Saraya, R., Krikken, A. M., Kiel, J. A. K. W., Baerends, R. J. S., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* **12**: 271–278.
- Schwartz, C. M., Hussain, M. S., Blenner, M. & Wheeldon, I. 2016. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* **5**: 356–359.
- Stockmann, C., Scheidle, M., Dittrich, B., Merckelbach, A., Hehmann, G., Melmer, G., Klee, D., Buchs, J., Kang, H. A. & Gellissen, G. 2009. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment. *Microb. Cell Fact.* **8**: 1–10.
- van der Klei, I. J., Harder, W. & Veenhuis, M. 1991. Methanol metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Arch. Microbiol.* **156**: 15–23.
- Weninger, A., Hatzl, A. M., Schmid, C., Vogl, T. & Glieder, A. 2016. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotech.* **235**: 139–149.
- Xie, K., Minkenberg, B. & Yang, Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**: 3570–3575.
- Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y. S., Jiao, R. & Gao, G. 2013. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics* **195**: 289–291.
- Zhou, Y., Yuikawa, N., Nakatsuka, H., Maekawa, H., Harashima, S., Nakanishi, Y. & Kaneko, Y. 2016. Core regulatory components of the PHO pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **62**: 595–605.

# メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* では 2つの接合型遺伝子座間領域の染色体逆位により接合型が転換する

前川 裕美<sup>1)</sup>

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

## Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*

Hiromi Maekawa<sup>1)</sup>

Yeast Genetic Resources Laboratory, Graduate School of Engineering, Osaka University  
Yamadaoka 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Yeast mating type is determined by the genotype at the mating type locus (*MAT*). In homothallic (self-fertile) Saccharomycotina such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, high-efficiency switching between **a** and  $\alpha$  mating types enables mating. Two silent mating type cassettes, in addition to an active *MAT* locus, are essential components of the mating type switching mechanism. We investigated the structure and functions of mating type genes in *Ogataea polymorpha*. The *O. polymorpha* genome was found to harbour two *MAT* loci, *MAT1* and *MAT2*, that are ~18kb apart on the same chromosome. *MAT1*-encoded  $\alpha 1$  and *MAT2*-encoded **a2** specifies  $\alpha$  cell and **a** cell identity, respectively. *MAT1*-encoded  $\alpha 2$  and *MAT2*-encoded **a1** were, however, essential for meiosis. When present in the location next to *SLA2* and *SUI1* genes, *MAT1* or *MAT2* was transcriptionally active, while the other was repressed. An inversion of the *MAT* intervening region was induced by nutrient limitation, resulting in the swapping of the chromosomal locations of two *MAT* loci, and hence switching of mating type identity. Inversion-deficient mutants exhibited severe defects only in mating with each other, suggesting that this inversion is the mechanism of mating type switching and homothallism. This chromosomal inversion-based mechanism represents a novel form of mating type switching that requires only two *MAT* loci.

Key words: homothallism, mating type switching, methylotrophic yeast, chromosomal inversion, nutritional starvation

### 緒 言

酵母種の多くは細胞分裂による無性生殖に加えて有性生殖サイクルを持つ。酵母の性サイクルは接合相手となる細胞の認識と細胞融合、それに続く核融合により二倍体を形成する。二倍体は減数分裂を経て一倍体の胞子を形成する。子囊菌酵母では細胞間認識は異なる接合型細胞間でのみ起こる。酵母の接合型は接合型遺伝子座 (*MAT*) と呼ばれる単一の遺伝子座により決定される。*MAT* 遺伝子座は複数のアレルを持っているが、いずれも転写制御因子をコードしており、下流の遺伝子群の転

写制御を介して細胞の接合型アイデンティティーを決めている。子囊菌ではほとんどの種が接合型を2つだけもつことが知られている。

*Saccharomyces cerevisiae* では **a** 型または  $\alpha$  型の一倍体細胞は接合能をもつが、**a**/ $\alpha$  の二倍体細胞は接合能を持たない。*S. cerevisiae* の2つの *MAT* アレル *MATa*, *MAT $\alpha$*  はそれぞれ **a1**,  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  の転写因子をコードしている。 $\alpha 1$  は  $\alpha$  特異的遺伝子群の転写を活性化するのに対して、 $\alpha 2$  は **a** 特異的な遺伝子を抑制する。これに対して、**a** 特異的な遺伝子の転写は *MAT* 遺伝子に依存しておらず、 $\alpha 2$  が発現していない限りは **a** 特異的遺伝子の転写が認められる (Haber, 2012)。**a** 特異的遺伝子のデフォルトでの転写発現は *S. cerevisiae* に特徴的であるが、これは他の Saccharomycotina 酵母種のゲノム中には存在する

E-mail: hmaekawa@agr.kyushu-u.ac.jp

<sup>1)</sup> 現 九州大学大学院農学研究院

**a2** 遺伝子が *S. cerevisiae* では欠失しているためである。*Candida albicans* 及び *Candida lusitanae* では **a2** は **a** 特異的遺伝子群の転写を活性化する因子として機能する (Reedy *et al.*, 2009)。*S. cerevisiae* の二倍体細胞においては、**a2** は **a1** と複合体を形成し、一倍体特異的遺伝子群の転写を抑制しており、これにより接合能の喪失と、減数分裂能の獲得を保証している。

有性生殖システムには、相互に認識可能な異なる接合型株間でのみ接合可能なヘテロタリックと単一細胞由来の集団内で接合することができるホモタリックがある。酵母のホモタリズムの中で最も研究が進んでいるのは *S. cerevisiae* である (Haber, 2012)。転写活性があり機能しているのは接合型遺伝子座 (*MAT*) のみであるが、染色体上の別の位置にサイレントな「カセット」と称される *MATa*, *MAT $\alpha$*  配列のコピー (*HML $\alpha$*  と *HMRa*) が存在している。接合型変換は栄養増殖期にある細胞で起こるため、隣接する細胞との間で接合が可能となり、*S. cerevisiae* では栄養培地で接合して二倍体になるので、培養中の殆どの細胞は二倍体である。接合型変換は *MAT* 遺伝子座の DNA 配列を除去し、*HML $\alpha$*  又は *HMRa* を鋳型とする遺伝子変換反応であり、HO エンドヌクレアーゼによる DNA 二重鎖切断が引き金となり開始する。*S. cerevisiae* 近縁の *Candida glabrata*, *Saccharomyces castellii*, *Zygosaccharomyces rouxii* はサイレントな2つのカセットと HO エンドヌクレアーゼを持っているが、進化的に離れた *C. albicans* や *Yarrowia lipolytica* は機能的な *MAT* を一つだけ持つヘテロタリックであり、サイレントなカセットを持たない。*S. cerevisiae* 近縁種の一つである *Kluveromyces lactis* は2つのカセットを持つものの、HO エンドヌクレアーゼを持たない。しかし、*S. cerevisiae* と同様の遺伝子変換反応により接合型を変換することが分かっている (Butler *et al.*, 2004)。ゲノム中に HO エンドヌクレアーゼ遺伝子が存在した痕跡と考えられる DNA 領域があることから、進化の過程で遺伝子変換反応の引き金となる DNA 損傷を引き起す独自の機構を獲得し、HO エンドヌクレアーゼ遺伝子が退化したものと考えられている (Barsoum *et al.*, 2010; Herman & Roman, 1966) (Fig. 1)。

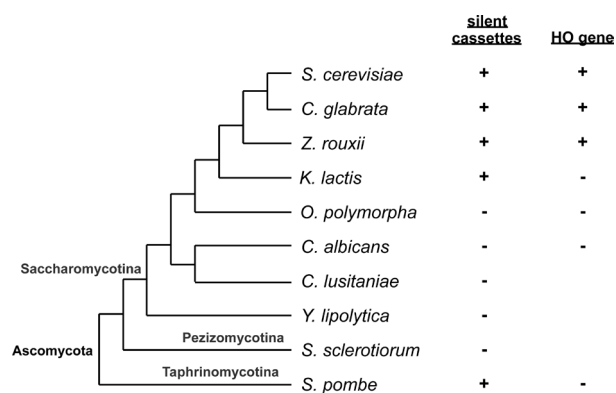
*Ogataea polymorpha* は *S. cerevisiae* とは進化的に離れた酵母であり、メタノール資化性をもつ等、様々な産業利用に有利な形質をもつが、細胞増殖制御や有性生殖などの分子制御機構についての理解は進んでいない。*O. polymorpha* は二倍体として増殖することは可能であるが、通常は一倍体である (Hansen and Hollenberg, 1996)。ホモタリックな有性生殖サイクルを持っており、栄養飢餓条件に置かれると同一株由来の細胞間で接合し、減数分裂を経て胞子形成を行なう。研究開始当時、*O.*

*polymorpha* の性システムは、他の子囊菌酵母と同様に接合型は二極性であると考えられたが、四極性であるとの記載もあった (Hansen & Hollenberg, 1996)。また、不完全ではあるもののドラフトゲノム配列が明らかにされており、*MATa* と *MAT $\alpha$*  が融合した構成を持つ特徴的な *MAT* 遺伝子座を持っていること、HO 遺伝子が見られないことが報告されていた (Butler *et al.*, 2004)。本研究では *O. polymorpha* を新たな酵母モデル系として確立するために、接合型の分子機構とホモタリズム機構を明らかにすることを旨とした。

## 実験方法

### 酵母菌株

*O. polymorpha* NCYC495 又は CBS4732 由来の研究室株を用いた (Lu *et al.*, 2000)。遺伝子欠失やタグ付加などのゲノム配列操作、酵母の培養、ゲノム DNA の精製は *S. cerevisiae* で標準的な用いられる方法により行なった (Janke *et al.*, 2004; Saraya *et al.*, 2012; Sherman, 1991)。富栄養条件としてはロイシン、ウラシル、アデニンを添加した酵母完全培地 (ロイシン、ウラシル、アデニンを各 200 mg/l 含有する 1% イーストエクストラクト、2% ペプトン、2% グルコース培地)、接合誘導培地として MEMA 培地 (2.5% マルトース、0.5% モルトエクストラクト培地) を用いた。培養は 30°C で行なった。



**Fig. 1** Schematic of phylogenetic relationships among yeast species and conservation of silent mating type cassettes and the *HO* gene.

Information on silent cassettes and the *HO* gene is based on ref. 13. The tree is not drawn to scale. Adopted from Maekawa *et al.* (2014).

### ドラフトゲノム配列解析

野生型 *O. polymorpha* 株 BY4329 のゲノム DNA を調整し、ロッシェ社の Genome Sequencer FLX System 及びイルミナ社の Genome Analyzer GAIIx を用いて解析した。ペアエンド・ライブラリー及びゲノムライブラリーは各々 Paired-End Library Preparation Method Manual 220kb and 8kb Span キット (ロッシェ社), TruSeq DNA Sample Preparation v2 キット (イルミナ社) を用いて作製した。なお、ライブラリー作製及び配列解析はタカラバイオ社に委託した。

### A( $\alpha$ ) 型と I(a) 型の PCR による検出

ゲノム DNA 10ng を鋳型とし、PRIME STAR Max (タカラバイオ社) を用いて PCR 反応を行なった。プライマーとして、Primer A (5'-ATAAGTACTCACAATCGAGGC-3', 5'-AGGAACAGGTTTCAGTACTGG-3') または Primer D (5'-ATAAGTACTCACAATCGAGGC-3', 5'-GATGGTAATGACTCTGTAGC-3') を用いた。PCR 反応は 21-23 サイクル行なった。PCR 産物は 0.8% アガロース電気泳動で解析した。

### 半定量的接合アッセイ

*leu1-1* 又は *ura3-1* の遺伝型を持つ酵母菌株は、YPDS 培地を用いて 30°C で培養した。PBS で洗浄後、同量の菌体を MEMA プレート上に置いたニトロセルロース膜上で混合し、30°C で 24 時間培養した。ニトロセルロース膜上の細胞を PBS に懸濁し、適当な倍率で希釈したものをロイシンを添加した合成培地 (SD+Leu), ウラシルを添加した合成培地 (SD+Ura), 合成培地 (SD) プレートに蒔き 37°C で 2 日間培養した。コロニー数をカウントし、次の計算式の値を接合率とした。

$$\text{接合率} = \frac{\{(\text{SD プレートのコロニー数}) \times \text{希釈倍率}\}}{\{(\text{SD+Leu と SD+Ura プレートのコロニー数のいずれか小さい方}) \times \text{希釈倍率}\}} \times 100$$

### RNA の抽出と解析

*O. polymorpha* の全 RNA は van Zutphen *et al.* (2010) に記載された手法で抽出した後、DNaseI 処理と RNeasy Plus Kit を用いて更に精製した (van Zutphen *et al.*, 2010)。1 $\mu$ g RNA を用いて SuperScriptIII により cDNA を合成した。定量解析には QuantStudio 3D Digital PCR system を用いた。

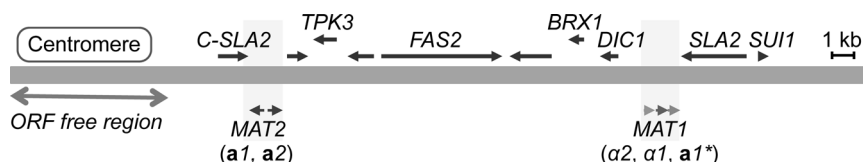
## 結 果

### *O. polymorpha* は 2 つの接合型遺伝子座を持つ

ドラフトゲノム配列から *O. polymorpha* の接合型遺伝子座として  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ , **a1** 遺伝子がこの順番に同じ向きに配置された遺伝子座が報告されていた (Butler *et al.*, 2004)。この遺伝子座に加えて、我々の全ゲノム配列解析から **a1**, **a2** 遺伝子をコードする配列が同一染色体上の約 19kb 離れた位置にあることが明らかになった (Fig. 2) (Hanson *et al.*, 2014; Maekawa & Kaneko, 2014)。この第二の接合型遺伝子座には *SLA2* 遺伝子の C 末側領域が隣接しており、第一の接合型遺伝子座に隣接する完全長の *SLA2* 遺伝子領域との間に約 2kb の逆向き反復配列を形成している。2 つの **a1** 様蛋白質のアミノ酸配列は N 末の 24 アミノ酸を除いて同一であり、*S. cerevisiae* の **a1** 蛋白質の類似性は共通領域に限られている。同様のゲノム構造は近縁の *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 でも報告されている (Ravin *et al.*, 2013)。本稿では既に報告のある接合型遺伝子座と新たに見いだされた遺伝子座をそれぞれ *MAT1*, *MAT2* と名付け、2 つの **a1** 様遺伝子の内、*MAT1* 中の遺伝子を **a1\***, *MAT2* 中の遺伝子を **a1** と表記する (Maekawa & Kaneko, 2014)。

接合過程でのパートナーの認識はフェロモン受容体に依存している

*O. polymorpha* のホモタリズムの分子機構を明らかにするために、接合型遺伝子の有性生殖での機能の解析を試みた。その為に、先ずヘテロタリックな **a** 型または  $\alpha$



**Fig. 2** Two mating type loci in *O. polymorpha*.

Schematic of the chromosomal region surrounding *MAT1* and *MAT2*. The chromosome is represented by a thick grey line;  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ , **a1\*** and **a1** genes are indicated by grey arrows. *MAT* loci are indicated by light grey. Predicted ORFs are indicated by arrows above the chromosome. Position of centrosome is based on Hanson *et al.* (2014).

型細胞として挙動する株の構築を行なった。酵母の接合では、接合フェロモンによる細胞間コミュニケーションが重要な役割を果たすことが知られており、フェロモンシグナル伝達経路は真菌類に広く保存されている。*O. polymorpha* のゲノム中に *S. cerevisiae* の **a** ファクター受容体遺伝子 STE3,  $\alpha$  型ファクター受容体遺伝子 STE2 の相同遺伝子が見いだされた (Burkholder & Hartwell, 1985; Hagen *et al.*, 1986). *ste2* 遺伝子欠失株, *ste3* 遺伝子欠失株は接合において各々ヘテロタリック  $\alpha$ , **a** 細胞と同様の挙動をすることが期待される。即ち、Self-fertility は持たないが、適合する接合型細胞との接合は可能である。接合能を評価するために半定量的接合アッセイ系を構築した。*O. polymorpha* の接合は栄養飢餓条件により誘導されるが、接合により生じる二倍体細胞は速やかに減数分裂・胞子形成過程へ移行することが知られている。しかし、二倍体形成後、減数分裂開始前に栄養条件が好転すると二倍体細胞として増殖を再開する。この性質を利用し、二倍体コロニー形成数を指標とした接合能の評価が可能かどうかを検証した。*ste2* $\Delta$  x *ste2* $\Delta$ , *ste3* $\Delta$  x *ste3* $\Delta$  の交配では二倍体は形成されなかったが、*ste2* $\Delta$  又は *ste3* $\Delta$  x 野生型, *ste2* $\Delta$  x *ste3* $\Delta$  では同等の二倍体コロニー形成が観察された (Fig. 3A)。この結果は、*O. polymorpha* の接合型が2極性であり、接合アッセイにおいて *ste2* $\Delta$  と *ste3* $\Delta$  は其々ヘテロタリック  $\alpha$  型, **a** 型細胞とみなすことができることを示している。

**a2** と  $\alpha 1$  は接合に、**a1** と  $\alpha 2$  は減数分裂・胞子形成に必須である

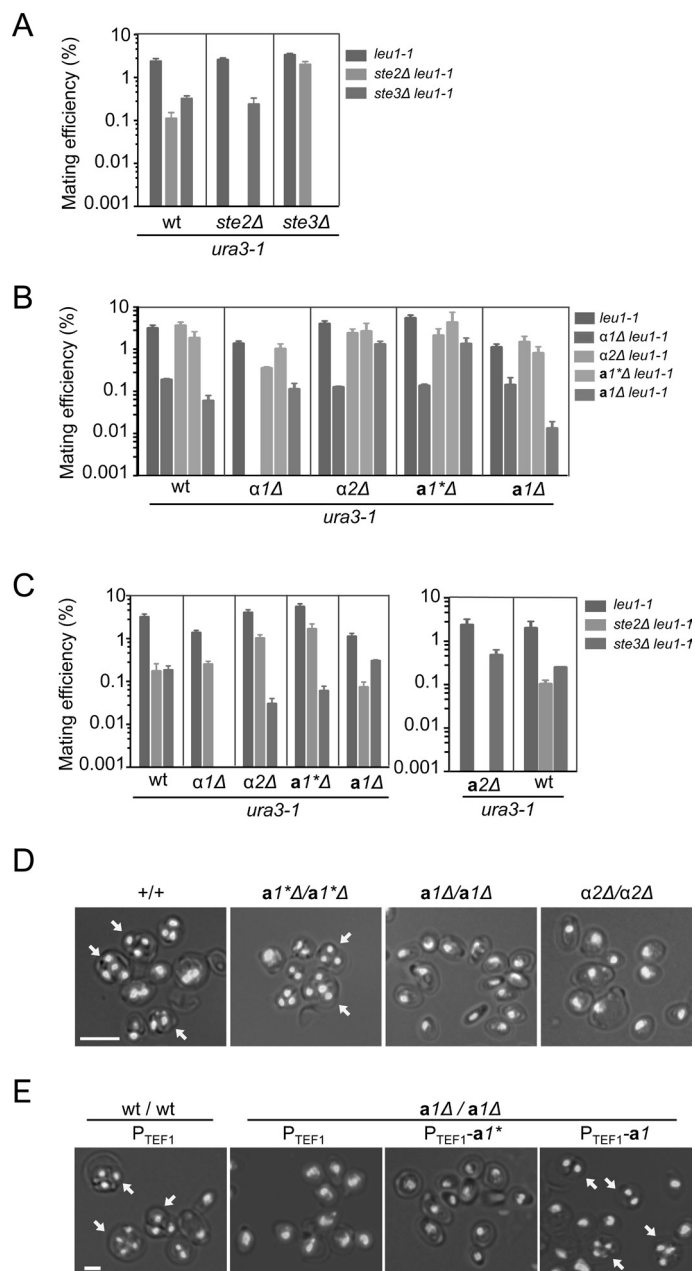
接合型遺伝子座にコードされる **a1**, **a2**, **a1\***,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  遺伝子の欠失変異株を作製し、有性生殖での表現型を解析した。接合能は半定量的接合アッセイで評価し、減数分裂・胞子形成については顕微鏡観察を行った。*O. polymorpha* の研究室株の接合率は一般に低く、野生型でも2%程度であるが、**a2** $\Delta$ ,  $\alpha 1$  $\Delta$  株では同じ遺伝型を持つ株の間では二倍体コロニーを形成することができず (**a2** $\Delta$  x **a2** $\Delta$ ,  $\alpha 1$  $\Delta$  x  $\alpha 1$  $\Delta$ ; Fig. 3B & 3C)。顕微鏡観察においても接合子や接合時の細胞形態変化などは観察されなかった。一方、**a1** $\Delta$ , **a1\*** $\Delta$ ,  $\alpha 2$  $\Delta$  株では同じ遺伝型を持つ株との交配で野生型と同程度の接合子が形成された (**a1** $\Delta$  x **a1** $\Delta$ , **a1\*** $\Delta$  x **a1\*** $\Delta$ ,  $\alpha 2$  $\Delta$  x  $\alpha 2$  $\Delta$ ; Fig. 3B & 3C)。これらの結果から、**a** 型及び  $\alpha$  型のアイデンティティーは其々 **a2**,  $\alpha 1$  が規定することが明らかになった。**a1** 及び  $\alpha 2$  は接合には必須でないが、**a1** $\Delta$ /**a1** $\Delta$  及び  $\alpha 2$  $\Delta$ / $\alpha 2$  $\Delta$  二倍体では減数分裂・胞子形成は観察されなかった。一方、**a1\*** $\Delta$ /**a1\*** $\Delta$  二倍体は野生型と同様に高い効率で減数分裂・胞子形成を行なった (Fig. 3D)。更に、**a1\*** 遺伝子を *TEF1* プロモーターを用いて高発現しても **a1** $\Delta$ /**a1** $\Delta$

二倍体での減数分裂能は回復しなかったことから、**a1** 遺伝子と **a1\*** 遺伝子は異なる機能を持つと考えられる (Fig. 3E)。**a1\*** 遺伝子は有性生殖には必須でないことから、*MAT1*, *MAT2* は其々 *MAT* $\alpha$ , *MAT***a** として機能するといえる。

*MAT* 間領域の逆位は接合型遺伝子の発現パターンを変化させる

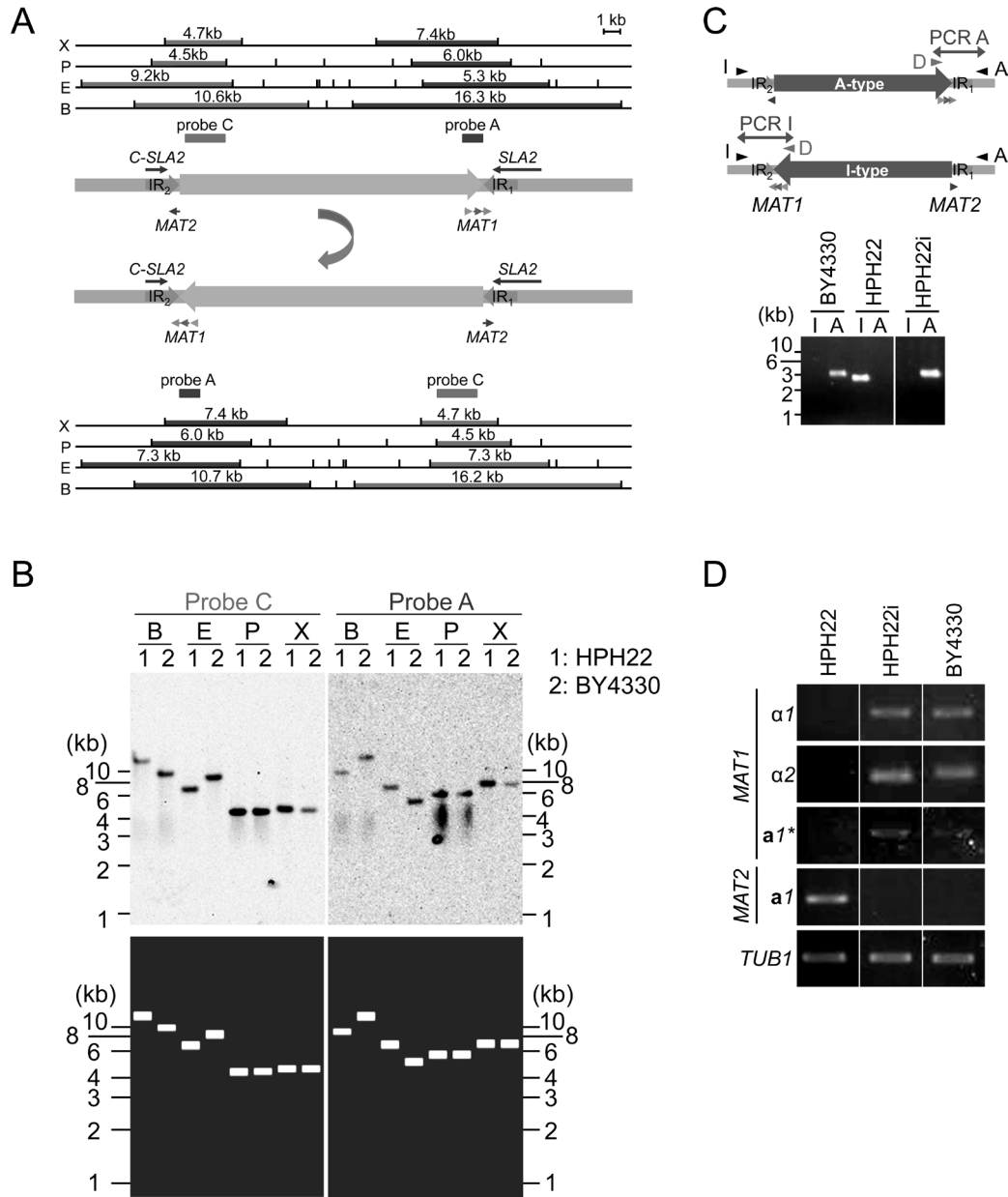
*MAT1* 上流と *MAT2* 下流は 2049 bp の逆向き反復配列となっている (IR1, IR2 と称する) (Fig. 4A)。IR1 又は IR2 を挟む PCR がしばしば不明瞭な結果を生じたことから、ゲノム DNA を用いたサザン解析により接合型遺伝子周辺のゲノム配列の解析を行った (Fig. 4B)。2つの研究室株 BY4330, HPH22 からゲノム DNA を調製し、*MAT1*, *MAT2* 近傍の DNA 領域をプローブとして用いた。BY4330 と HPH22 の結果は異なっており、BY4330 が我々のドラフトゲノム配列から予想される結果と一致した。一方、IR1 と IR2 の間の領域の逆位を想定すると HPH22 の結果と一致することから、この領域の向きが2つの株間で異なっているかを PCR 法により検証した。其々の向きに特異的な PCR プライマーを用いた PCR 解析の結果は上記の予想と完全に合致しており、BY4330 株と HPH22 株では染色体の *MAT* 領域が逆位の関係にあることが明らかになった (Fig. 4C)。出芽酵母の *MAT* 遺伝子座近傍の遺伝子配置は進化的に保存されていることが知られており、一般に *DIC1* 遺伝子と *SUI1* 遺伝子が *MAT* 遺伝子座に隣接している (Fig. 2) (Butler *et al.*, 2004)。この遺伝子配列に相当するのが BY4330 型の染色体であるので、BY4330 株の *MAT* の配置を Ancient 型 (A 型)、HPH22 株を Inverted 型 (I 型) と名付け、以降は遺伝型表記として A( $\alpha$ ) 及び I(**a**) を用いる。BY4330 株と HPH22 株のいずれも PCR サイクル数を増やすと両方の向きを示す PCR 産物が検出できるようになる。また、HPH22 株の複数のシングルコロニーを調べたところ、多くは I 型を保持していたが、少数のコロニーでは A 型に変換していた (HPH22i 株)。更に HPH22i 株のシングルコロニーのほとんどは A 型であった。これらの結果から、A 型・I 型間の変換は起こり得るが、栄養増殖中は比較的安定に維持されることを示唆している。

ゲノム中に *MAT* $\alpha$ , *MAT***a** が共存しているにもかかわらず、接合能をもつことから、2つの接合型遺伝子の転写が異なった制御を受けており、一方のみが発現している可能性を考えた。栄養増殖中の HPH22 株から RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行ったところ、*MAT2* にコードされる遺伝子は発現しているが、*MAT1* 上の遺伝子は発現が見られなかった (Fig. 4D)。これに対して BY4330 株では *MAT1* にコードされる遺伝子は発現しているが、



**Fig. 3** Functions of mating type genes in sexual development.

(A) Two mating pheromone receptors are required for mating. Wild-type, *ste2Δ* and *ste3Δ* *O. polymorpha* strains of *ura3-1* and *leu1-1* genotypes were combined on MEMA mating medium and incubated at 30 °C. After 24h, cells were spread on SD plates to select for Leu+Ura+ diploids. Colony number was counted after 2 days at 37 °C. Shown is the average of three independent matings. Error bars indicate SD. (B) Mating assay of wild-type, *α1Δ*, *α2Δ*, *a1\*Δ*, and *a1Δ* strains. Wild-type, *α1Δ*, *α2Δ*, *a1\*Δ*, and *a1Δ* strains were treated as described in (A). Shown is the average of three independent matings. Error bars indicate SD. (C) Mating assays of wild-type, *α1Δ*, *α2Δ*, *a1\*Δ*, *a1Δ* and *a2Δ* strains with *ste2Δ* and *ste3Δ* strains. Cells were treated as described in (A). Shown is the average of three independent matings. Note that *ste2Δ* and *ste3Δ* strains behave as heterothallic *α* or *a* strains, respectively. Error bars indicate SD. (D) Functions of *a1* and *a2* are essential for meiosis and sporulation. Shown are merged brightfield and DAPI epifluorescence images. White arrows indicate spores. Bar, 5 μm. (E) *a1\** and *a1* are functionally distinct. Logarithmically growing wild-type diploid and *a1Δ* homozygous diploid (*a1Δ/a1Δ*) cells carrying the indicated plasmid were spotted on MEMA plates and incubated at 30 °C for 24hrs. Plasmids used were vector plasmid, plasmids that carry P<sub>TEF1</sub>-*a1\** or P<sub>TEF1</sub>-*a1*. Shown are merged brightfield and DAPI epifluorescence images. White arrows indicate spores. Bar, 2 μm. Adopted from Maekawa & Kaneko (2014).



**Fig. 4** Inversion of the *MAT* intervening region alters the expression status of mating type genes.

(A) Schematics of the chromosomal region surrounding *MAT1* and *MAT2*.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $a1^*$ , and  $a1$  genes are indicated by pink, red, and light and dark blue arrows, respectively. IR regions are shown as thick orange arrows. DNA fragments used as probes for Southern blot analysis in (B) are shown as dark grey (probe A) or light grey (probe C) bars. The upper schematic shows the draft genome sequence. The lower schematic shows the predicted DNA sequences after the inversion between IR regions. Upper and lower panels show restriction enzyme sites deduced from the DNA sequences and the size of the DNA fragment hybridized by each probe. X, *Xho*I; P, *Pst*I; E, *Eco*RI; B, *Bam*HI. (B) Two types of chromosome configuration in different wild-type strains. Genomic DNA of two strains (indicated as 1 and 2) were prepared from logarithmically growing cells in YPDS medium and analyzed by Southern blotting using probes A and C (upper panel). The lower panel shows the results predicted from Upper (U) and Lower (L) schematics in (A). (C) PCR amplification of the I- or A-type *MAT1* locus (reaction I with Primer\_I/Primer\_D or reaction A with Primer\_A/Primer\_D). The presence of the I product and absence of the A product for HPH22 indicates that the chromosome is in the I-type orientation. HPH22i and BY4330 have an A-type chromosome. (D) Mating type genes are transcriptionally active at position 1 and repressed at position 2. The expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $a1^*$ , and  $a1$  genes was examined by RT-PCR. RNA samples were prepared from logarithmically growing wild-type cells in YPDS medium at 30 °C (HPH22, HPH22i, and BY4330). HPH22i is a clone isolated from HPH22 (Fig. S4B; see text). Adopted from Maekawa & Kaneko (2014).

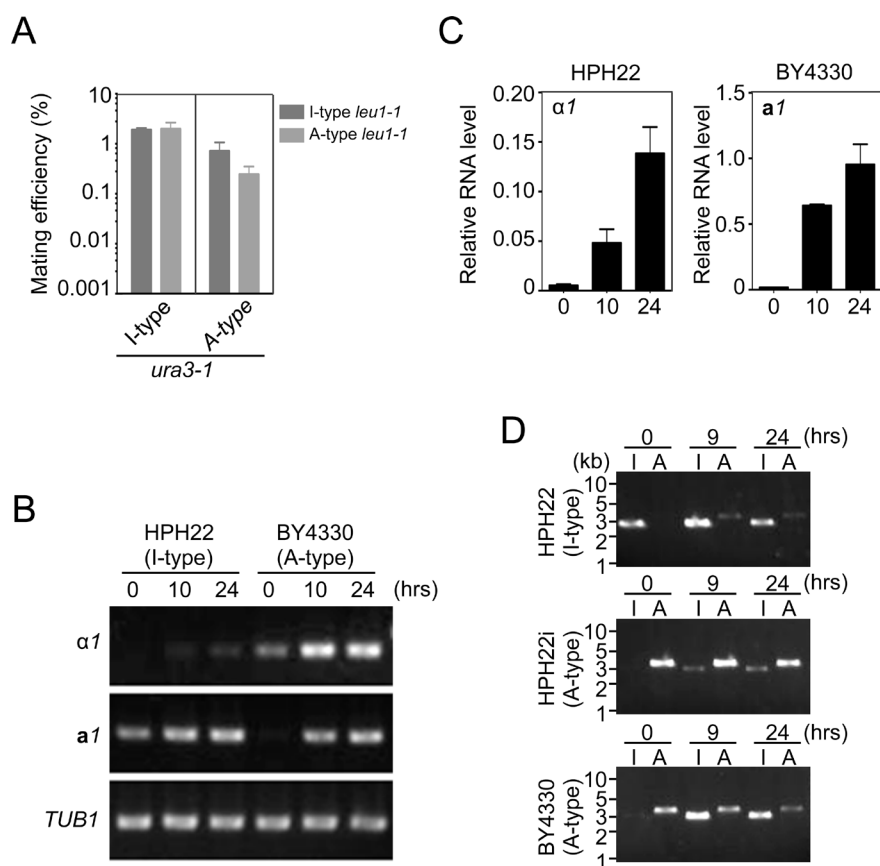


*MAT2*上の遺伝子は発現していなかった (Fig. 4D). HPH22i株はBY4330株と同じ発現パターンを示したことから、接合型遺伝子発現パターンの違いは菌株間の遺伝的背景の違いではなく、*MAT*領域の染色体上の向き (A型, I型) に依存していることが示唆される. 即ち, ORFフリー領域近傍の*MAT*は転写抑制されていると考えられる. Hanson *et al.* (2014)は, このORFフリー領域及び隣接する*MAT*領域はセントロメアクロマチン構造をとっていること示しており, *MAT*の転写抑制はこのクロマチン構造の影響であると考えられる.

接合型変換は栄養飢餓により誘導される

*O. polymorpha*はホモタリックであるが, 細胞の接合

型は*MAT*領域の染色体構造 (A型, I型) によって決まることから, A( $\alpha$ )株とI(**a**)株の交配の方が接合率が高い可能性を考えた. しかし, A( $\alpha$ )型とI(**a**)型の組み合わせの違いは接合率には影響しなかった (Fig. 5A). このことから, 接合誘導条件下では接合型変換が誘導される可能性が考えられる. そこで, BY4330株を用いて栄養源飢餓条件下での接合型遺伝子の発現を解析したところ, 栄養増殖中に発現している*MAT1*上の遺伝子( $\alpha 1$ )に加えて, 接合培地 (MEMA) で10時間培養すると*MAT2*上の遺伝子である**a1**の発現が検出された (Fig. 5B & 5C). 同様に, HPH22株ではMEMA培地での $\alpha 1$ 遺伝子の発現上昇が確認された (Fig. 5B & 5C). つまり, 接合誘導条件下での培養では全ての接合型遺伝子が発現し



**Fig. 5** Inversion of the *MAT* intervening region is induced during mating.

(A) Mating assay between I- and A-type strains. Cells were treated as described in Fig. 3A. Shown is the average of three independent matings. Error bars indicate SD. (B) RT-PCR analysis of  $\alpha 1$  and **a1** genes. RNA samples were prepared from I- or A-type wild-type cells incubated on MEMA medium for the indicated times. (C) Quantitative digital PCR analysis of  $\alpha 1$  and **a1** genes. RNA samples in (B) were subjected to digital PCR analysis.  $\alpha 1$  and **a1** RNA levels were normalized to that of *ACT1* RNA. Shown are the averages of two independent PCR reactions. Error bars indicate SD. (D) PCR amplification of the I- or A-type *MAT1* locus. PCR reactions are as described in Fig. 4C. Genomic DNA samples were prepared from three wild-type strains after incubation on MEMA for the indicated times. The appearance of the I product in the reaction with BY4330 (A-type) after 9 and 24 hrs indicates a switch to the I-type in a subset of the population. Adopted from Maekawa & Kaneko (2014).

ており, self-mating が全ての株で観察されることと整合している。

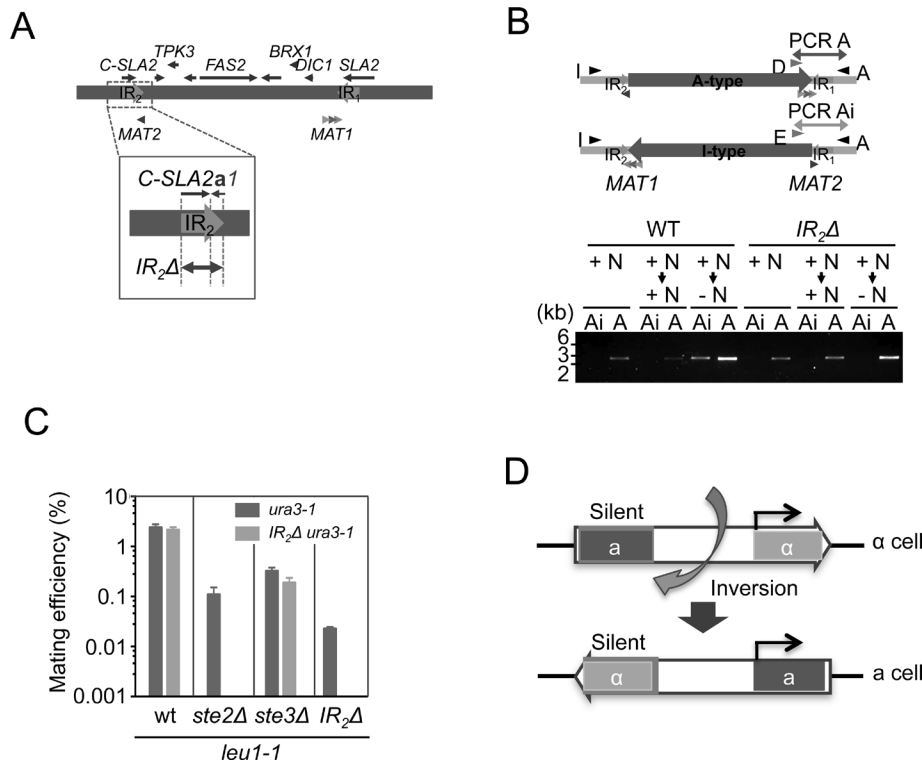
発現抑制されていた *MAT* の転写が栄養飢餓により活性化される機構として, 転写制御が変化する可能性, 染色体逆位により転写活性のある染色体の位置にある *MAT* 配列が変化する可能性が考えられる。後者を検証するために, BY4330 株, HPH22 株, HPH22i 株を接合培地中で培養し, *MAT* 周辺の染色体の向きを PCR 法を用いて解析した (Fig. 5D)。3 つ全ての株で接合培地中で染色体の向きの変換が見られた。HPH22 株に比べて BY4330 株の方が逆位の頻度がやや高いが, BY4330 株での飢餓下での *aI* の発現誘導が HPH22 株での *αI* 発現誘導より強いことと一致している。これらの結果から, *MAT* 間領域の逆位によって接合型遺伝子の転写誘導が引き起こされることが示唆された。

接合型変換の際には必ず *MAT* 領域間逆位が起こって

いることを確かめるために, 接合子由来の二倍体細胞を複数単離し, *MAT* 領域の向きを調べた。146 株の二倍体株は全て A(*α*) 型染色体と I(*a*) 型染色体を一本ずつ保持していた。この結果はセントロメアに隣接する *MAT* は栄養源飢餓下でも転写抑制されていることを示唆している。

*O. polymorpha* のホモタリズムは *MAT* 間領域の逆位によってのみ引き起こされる

*O. polymorpha* においては *MAT* 間領域の逆位が接合型変換の唯一の機構であることを確かめるために, A(*α*) 型野生型において *IR2* 配列を欠失させた変異株 (*IR2Δ*) を作製したところ, 栄養源飢餓下でも逆位が全く起こらなくなった (Fig. 6A & 6B)。この株の接合能を調べたところ, ヘテロタリック *a* 型細胞様株 (*ste3Δ*) との交配では接合子が形成されたが, ヘテロタリック *α* 型細胞様株 (*ste2Δ*) とは接合できなかった (Fig. 6C)。また,



**Fig. 6** Inversion of the *MAT* intervening region is essential for homothallism.

(A) Schematic of the strategy for *IR2* deletion on the A-type chromosome.

(B) *IR2Δ* cells are defective for the inversion. Logarithmically growing wild-type (HPH22i) and *IR2Δ* (HPH833) cells in YPDS medium (+N, nutrient plus) were transferred to YPDS (+N → +N) or MEMA (+N → -N, nutrient minus) and incubated for 20 hrs. Genomic DNA samples were prepared and inversion was detected by two PCR reactions, A and Ai, using the primer sets Primer\_D/Primer\_A and Primer\_E/Primer\_A, respectively.

(C) Cells of the A-type strain carrying the *IR2Δ* allele are incapable of mating with each other and with *ste2Δ*. Wild-type, *ste2Δ*, *ste3Δ* and *IR2Δ* cells were treated as described in Fig. 3A. Shown is the average of three independent matings. Error bars indicate SD.

(D) Model of homothallism in *O. polymorpha*. Adopted from Maekawa & Kaneko (2014).

*IR2Δx IR2Δ* でも接合子は形成されなかった (Fig. 6C). これらの結果から *O. polymorpha* の接合型変換は *MAT* 間領域の逆位によってのみ引き起こされることが明らかになった (Fig. 6D).

## 考 察

### *O. polymorpha* の接合型遺伝子

欠変異株の表現型の解析から、4つの遺伝子 (*a1*, *a2*,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) が有性生殖で必須の役割を果たしていることが明らかになった。*a2*,  $\alpha 1$  は各々 **a** 型、 $\alpha$  型細胞の接合に必須であり、*a1* 及び  $\alpha 2$  は減数分裂・胞子形成に必須である (Fig. 7A). **a** 型遺伝子特異的な遺伝子発現は接合型遺伝子の制御を受けず、デフォルトが 'ON' である *S. cerevisiae* とは異なっており、*C. albicans* と似た接合型遺伝子の機能を持っていると言える。各々の接合型遺伝子による転写制御の標的遺伝子については今後明らかにしていく予定である。

### *MAT* の転写抑制機構

2つの *MAT* 遺伝子座のうち、ORFフリー領域近傍に位置している遺伝子座の転写は厳密に抑制されている。*S. cerevisiae* のサイレントな接合型遺伝子座は Sir 蛋白質によるヘテロクロマチン化により転写抑制されることが知られているが、*O. polymorpha* には Sir2 ホモログは存在するものの、Sir1, Sir3, Sir4 ホモログは見つからず、ヘテロクロマチン結合蛋白質である HP1 (Heterochro-

matin Protein 1) もない (Haber & George, 1979; Lorentz *et al.*, 1994; Rine & Herskowitz, 1987; Rine *et al.*, 1979). これらのことから、*S. cerevisiae* とは異なる分子機構により *MAT* の転写が抑制されていると考えられた。Wolfeらのグループは *MAT* に隣接した ORF フリー領域がセントロメア特異的ヒストン (CENP-A) を含むヌクレオソーム構造を取っており、セントロメア構造が *MAT* のサイレンス化を担っていると提唱している (Hanson *et al.*, 2014).

### *O. polymorpha* のホモタリズム機構

これまでに知られている子囊菌酵母のホモタリズムは接合型変換に依存している。「カセットモデル」として広く知られる *S. cerevisiae* や *S. pombe* 接合型変換機構は最も解析が進んでおり、分子機構は合計3つの接合型遺伝子配列によって構成されている。興味深いことに、*S. cerevisiae* と *S. pombe* の共通祖先はヘテロタリックであり、接合型遺伝子座を一つだけ持っていたと考えられている。系統関係を考慮すると、現象や分子機構の構成はよく似ているものの、2つの酵母の接合型変換機構は進化的には各々独立に生じたものであることが分かる。*O. polymorpha* のゲノム中には *MAT* 配列が2つあり、*S. cerevisiae* 及びその近縁種に見られる3つの *MAT* を持つゲノム構成の進化過程の過渡的な状態を保持していると考えられる (Fig. 7B). 今後は、*O. polymorpha* における IR 間の DNA 組換えの分子機構とその分子制御機構の解明を目指す。

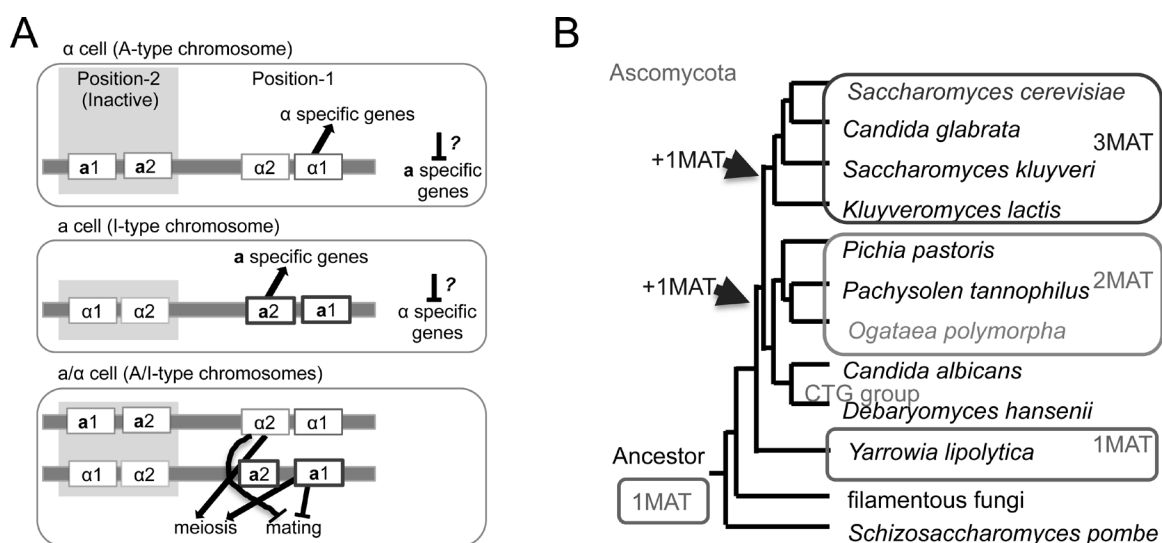


Fig. 7 Model of mating type regulation in *O. polymorpha*.

(A) Function of mating type genes in establishing mating type identity. (B) Evolution of the mating type switching system in yeast.

## 要 約

子囊菌酵母の共通祖先は接合型遺伝子 (*MAT*) 座を一つだけ持つヘテロタリックであったと考えられる。一方、*S. cerevisiae* 及びその近縁種は3つの *MAT* と *HO* エンドヌクレアーゼをコアとする接合型変換機構によるホモタリズムを進化させてきた。*S. cerevisiae* とは進化的に離れており、ホモタリックであるメタノール資化酵母 *O. polymorpha* の全ゲノム配列解析を行なったところ、*S. cerevisiae* に見られる接合型変換機構を構成するゲノム構成を持っていなかった。*O. polymorpha* は2つの *MAT* 遺伝子座を同じ染色体上に持つが、転写発現は一方のみに限定されている。転写制御は染色体上の位置に依存しており、両 *MAT* を含む染色体領域の逆位に依存して発現する *MAT* を変換するという新規の接合型変換機構をもつことが明らかになった。2つの *MAT* 遺伝子をもつゲノム構成は、3つの *MAT* 遺伝子による接合型変換機構が進化する過渡的な状態を反映していると考えられる。

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 口頭発表

- 1) 前川裕美, 金子嘉信. 2015. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の新規な接合型変換機構. 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, 12月, 神戸.
- 2) 前川裕美. メタノール資化酵母における新規な接合型変換機構. 第80回酵母研究会・第3回 NBRP 酵母シンポジウム合同講演会, 9月, 奈良.
- 3) 前川裕美, 金子嘉信. 2015. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の接合型変換機構. 酵母遺伝学フォーラム 第48回研究報告会, 9月, 広島.
- 4) Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2015. Chromosomal inversion-based mechanism of mating type switching in *Hansenula polymorpha*. 28th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove CA, USA.
- 5) 前川裕美, 金子嘉信. 2014. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の性決定と接合型変換機構. 第37回日本分子生物学会年会, 11月, 横浜.
- 6) Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*, Experimental Approaches to Evolution and Ecology using Yeast & other Model Systems, EMBO Conference Series, EMBL Heidelberg, Germany (poster presentation).
- 7) 前川裕美, 金子嘉信. 2014. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の性決定とホモタリズムの機構. 酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会, 9月, 東京.
- 8) 前川裕美, 金子嘉信. 2014. メタノール資化酵母の接合型遺伝子座の構造と転写解析. 第8回ゲノム微生物学会年会, 3月, 東京.

## 原著論文

- 1) Maekawa, H., & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. PLoS Genet **10**: e1004796.

## 謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄附講座助成を受けて行なわれたものであり、ここに感謝の意を表します。本研究への大阪大学大学院工学研究科原島峻教授（現：崇城大学）並びに村中俊哉教授のご支援とご協力に深く感謝いたします。さらに、当寄附講座に在籍した皆さんに感謝します。

## 文 献

- Barsoum, E., Martinez, P. & Astrom, S.U. 2010. Alpha3, a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes Dev.* **24**: 33-44.
- Burkholder, A.C., & Hartwell, L.H. 1985. The yeast *a*-factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the *STE2* gene. *Nucleic Acids Res.* **13**: 8463-8475.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C. & Wolfe, K.H. 2004. Evolution of the *MAT* locus and its *HO* endonuclease in yeast species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 1632-1637.
- Haber, J.E. 2012. Mating-type genes & *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33-64.
- Haber, J.E. & George, J.P. 1979. A mutation that permits the expression of normally silent copies of mating-type information in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **93**: 13-35.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G. & Sprague, G.J. 1986. Evidence the yeast *STE3* gene encodes a receptor for the peptide pheromone *a* factor: Gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 1418-1422.
- Hansen, H. & Hollenberg, C.P. 1996. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). In K. Wolf, ed. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 293-311.
- Hanson, S.J., Byrne, K.P. & Wolfe, K.H. 2014. Mating-type switching by chromosomal inversion in methylotrophic yeasts suggests an origin for the three-locus *Saccharomyces cerevisiae* system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: E4851-E4858.
- Herman, A. & Roman, H. 1966. Allele specific determinants of homothallism in *Saccharomyces lactis*. *Genetics* **53**: 727-740.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. *et al.* 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962.
- Lorentz, A., Ostermann, K., Fleck, O. & Schmidt, H. 1994. Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci

- in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from. *Gene* **143**: 139-143.
- Lu, S.F., Tolstorukov, I.I., Anamnart, S., Kaneko, Y. & Harashima, S. 2000. Cloning, sequencing, and functional analysis of *H-OLE1* gene encoding delta9-fatty acid desaturase in *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 499-509.
- Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLoS Genet* **10**: e1004796.
- Poggeler, S. 2007. *MAT* and its role in the homothallic Ascomycete *Sordaria macrospora*. In J. Heitman, J. Kronstad, J. Taylor, and L. Casselton, eds. *Sex in Fungi* (American Society of Microbiology), p. 171-188.
- Ravin, N.V., Eldarov, M.A., Kadnikov, V.V., Beletsky, A.V., Schneider, J., Mardanova, E.S., Smekalova, E.M., Zvereva, M.I., Dontsova, O.A., Mardanov, A.V. *et al.* 2013. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* **14**: 837.
- Reedy, J.L., Floyd, A.M. & Heitman, J. 2009. Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *Candida* pathogenic species complex. *Curr. Biol.* **19**: 891-899.
- Rine, J., & Herskowitz, I. 1987. Four Genes Responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**: 9-22.
- Rine, J., Strathern, J.N., Hicks, J.B. & Herskowitz, I. 1979. A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics* **93**, 877-901.
- Saraya, R., Krikken, A.M., Kiel, J.A., Baerends, R.J.S., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research* **12**: 271-278.
- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Method. Enzymol.* **194**: 3-21.
- van Zutphen, T., Baerends, R.J., Susanna, K.A., de Jong, A., Kuipers, O.P., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* **11**: 1.



# メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* の接合型変換に関わる転写制御

前川 裕美<sup>1)</sup>

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

## Transcriptional regulation of the mating type switching in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*

Hiromi Maekawa<sup>1)</sup>

Yeast Genetic Resources Laboratory, Graduate School of Engineering, Osaka University  
Yamadaoka 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

*Saccharomyces cerevisiae* and its closely related yeasts undergo mating type switching by replacing DNA sequences at the active mating type locus (*MAT*) with one of two silent mating type cassettes. Recently, a novel mode of mating type switching was reported in methylotrophic yeast, including *Ogataea polymorpha*, which utilizes chromosomal recombination between inverted-repeat sequences flanking two *MAT* loci. The inversion is highly regulated and occurs only when two requirements are met: haploidy and nutritional starvation. However, the links between information on ploidy and nutritional condition and the mechanism associated with mating type switching are not understood. Here we investigated the roles of transcription factors involved in yeast sexual development, such as mating type genes and the conserved zinc finger protein Rme1. We found that co-presence of *MATa1* and *MATa2* was sufficient to prevent mating type switching, suggesting that ploidy information resides solely in the mating type locus. Additionally, *RME1* deletion resulted in a reduced rate of switching, and ectopic expression of *O. polymorpha RME1* overrode the requirement for starvation to induce *MAT* inversion. These results suggested that mating type switching in *O. polymorpha* is likely regulated by two distinct transcriptional programs linked to the ploidy and transmission of the starvation signal.

Key words: mating type switching, methylotrophic yeast, chromosomal inversion, *RME1*, nutritional starvation

### 緒 言

他の生物と同様に、酵母は外界の栄養状態などの変化を感知し、菌糸形成や有性生殖などの環境適応プログラムを持っている。多くの酵母種では生存が脅かされるような厳しい環境条件に置かれると、接合・減数分裂を経て、様々なストレスに強い耐性を示す胞子を形成する。ホモタリック (Self-fertile) な有性生殖サイクルを持つ種は、同種かつ接合型の異なる細胞と出会うことなく胞子を形成することができる有利さを持つと考えられる。これまでに、我々はメタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* の新規接合型変換機構を明らかにし、報告した

(Hanson *et al.*, 2014; Maekawa & Kaneko, 2014)。カセットモデルとして知られる *Saccharomyces cerevisiae* の接合型変換機構では、転写活性のある接合型遺伝子座 *MAT* に加えて、サイレントな2つの *MAT* 配列 (*HMLa*, *HMRα*) を必要とする (Haber, 2012)。これに対して *O. polymorpha* は **a** 型 (*MAT2*) と  $\alpha$  型 (*MAT1*) の接合型遺伝子座を各々一つ持っており、同一染色体上の両遺伝子座を両端とする染色体領域の逆位により接合型が変換される (Hanson *et al.*, 2014; Maekawa & Kaneko, 2014)。*S. cerevisiae* と *O. polymorpha* での接合型変換は制御機構も異なると考えられ、*O. polymorpha* では栄養飢餓条件下でのみ起こるのが特徴的である。また、減数分裂には *MATa*, *MATα* が共存する必要があるため、二倍体細胞では接合型変換は抑制されていると予想される。これらのことから、一倍体細胞が栄養源飢餓下におかれたときに特異的に発現する遺伝子の中に、接合型変換を引き起

E-mail: hmaekawa@agr.kyushu-u.ac.jp

<sup>1)</sup> 現 九州大学大学院農学研究院

共同研究者：山本勝良 (大阪大学大学院工学研究科)

す重要な因子が含まれる可能性を考え、遺伝子発現プロファイルを変化させる転写因子に注目した。

## 実験方法

### 酵母菌株及び培養

*O. polymorpha* NCYC495 又は CBS4732 由来の研究室株を用いた (Lu *et al.*, 2000). 遺伝子欠失やタグ付加などのゲノム配列操作、酵母の培養、ゲノム DNA の精製は *S. cerevisiae* で標準的な用いられる方法により行なった (Janke *et al.*, 2004; Saraya *et al.*, 2012; Sherman, 1991). 富栄養条件としてはロイシン、ウラシル、アデニンを添加した酵母完全培地 (ロイシン、ウラシル、アデニンを各 200mg/l 含有する 1% イーストエクストラクト, 2% ペプトン, 2% グルコース培地), 接合誘導培地として MEMA 培地 (2.5% マルトース, 0.5% モルトエクストラクト培地) を用いた。培養は 30°C で行なった。

### MAT 逆位の PCR による検出

ゲノム DNA 10ng を鋳型とし、PRIME STAR Max (タカラバイオ社) を用いて PCR 反応を行なった。プライマーとして、Primer A (5'-ATAAGTACTCACAATCGAGGC-3', 5'-AGGAACAGGTTTCAGTACTGG-3') または Primer D (5'-ATAAGTACTCACAATCGAGGC-3', 5'-GATGGTAATGACTCTGTAGC-3') を用いた。21-23 サイクルの PCR 反応の後、0.8% アガロース電気泳動で解析した。

### 接合率アッセイ

*leu1-1* 又は *ura3-1* の遺伝型を持つ酵母菌株は、YPDS 培地を用いて 30°C で培養した。PBS で洗浄後、同量の菌体を MEMA プレート上に置いたニトロセルロース膜上で混合し、30°C で 24 時間培養した。ニトロセルロース膜上の細胞を PBS に懸濁し、適当な倍率で希釈したものをロイシンを添加した合成培地 (SD+Leu), ウラシルを添加した合成培地 (SD+Ura), 無添加の合成培地 (SD) プレートに蒔き 37°C で 2 日間培養した。コロニー数をカウントし、次の計算式の値を接合率とした (Maekawa & Kaneko, 2014)。

$$(\text{接合率}) = \frac{(\text{SD プレートのコロニー数}) \times \text{希釈倍率}}{\{(\text{SD+Leu と SD+Ura プレートのコロニー数のいずれか小さい方}) \times \text{希釈倍率}\} \times 100}$$

### RNA 精製

*O. polymorpha* 株を 30°C で YPDS 培地中で対数増殖後期まで培養し、一部を集菌し +N サンプルとした。残り

の細胞は洗浄した後、MEMA 培地で 10 時間培養した (-N サンプル)。得られた菌体からホットフェノール法により RNA 得た。更に genomic DNA eliminator column 及び RNeasy columns (Qiagen) を用いてゲノム DNA を除去し、total RNA とした (Maekawa & Kaneko, 2014)。

### RNA-seq 解析

TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (イルミナ社) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、HiSeq 2500 (イルミナ社) を用いて 100base 両末端解析を行ない、約 4 億リードを得た。得られたリード配列を用いて、100 万マッピングフラグメント当たりの、エキソン 1kbp 当たりのリード数 (FPKM) を算出した。cDNA ライブラリー作製、シーケンシング及びデータ解析はタカラバイオ株式会社に委託した。

## 結果と考察

接合型遺伝子は MAT 逆位には必須ではない

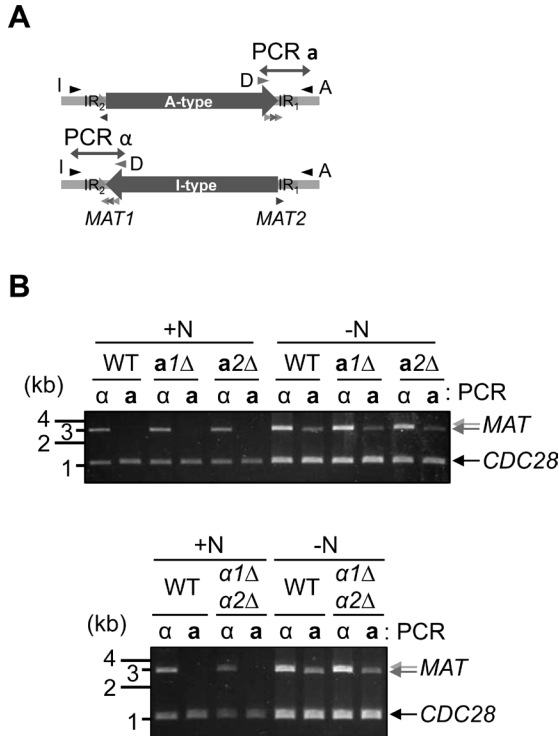
まず、接合型変換の誘導に接合型遺伝子が関与しているかを調べた。MATa, MATα は a1 と a2, α1 と α2 の各々 2 つの遺伝子をコードしている。a1Δ, a2Δ, α1Δ, α2Δ 株を作製し栄養飢餓培地で培養したところ、全ての株で野生型と同程度の MAT 逆位が起こっていた (Fig 1)。このことから、接合型遺伝子の機能は接合型変換に必須ではないことが分かった。

二倍体細胞では接合型変換は抑制される

減数分裂・孢子形成の進行には a1 と α2 の機能が必要であることが明らかになっている (Maekawa & Kaneko, 2014)。a/α 二倍体細胞で接合型変換が起こると減数分裂不能になる可能性があることから、二倍体細胞では MAT 逆位は抑制されている可能性が考えられる。二倍体細胞中の 2 本の MAT 遺伝子座を持つ染色体のうち、一本の IR 配列を欠失させて MAT 逆位不能にした細胞を用いて二倍体細胞の接合型変換能を調べたところ MAT 逆位が起こらなくなっていた (Fig 2A)。

次に、A(α) 型一倍体細胞の URA3 遺伝子座に MATa を挿入し、a 型と α 型遺伝子が共発現している一倍体細胞を作製した。この細胞は、栄養飢餓下で培養しても MAT 逆位は起こらなかった (Fig 2B)。I(a) 型一倍体細胞に MATα を挿入した細胞でも同じ結果であった (Fig 2C)。更に、各遺伝子の効果を調べたところ、a1 と α2 が同一細胞内で発現すると MAT 逆位が抑制された (Fig 2B & 2C)。このことから、二倍体における接合型変換抑制には、ゲノム DNA 量ではなく MATα と MATa が共に発現することが倍数性の情報として働いていることが分かった。





**Fig. 1** Mating type genes are not required for the *MAT* inversion.  
(A) Schematic of the primer designs for PCR reactions specific to I(a)- or A(α)-type chromosomes (*MAT* PCR analysis). (B) I(a)- or A(α)-type of *MAT1* chromosome was determined by PCR reactions described in (A). PCR reactions to detect I(a)- or A(α)-type chromosomes are designated as a and α, respectively. Genomic DNA samples were prepared from the wild-type strain and deletion mutants for *MATa1*, *MATa2*, or *MATα* before (+N) and after incubation on MEMA (-N).

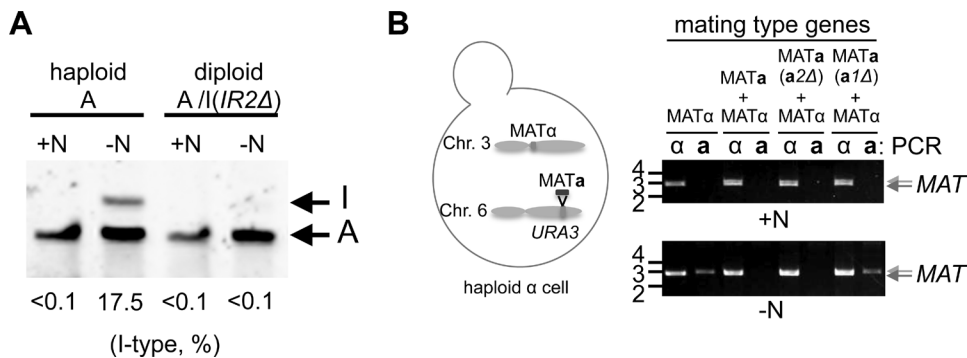
接合型変換は栄養源飢餓下での細胞分裂を終える時期に誘導される

接合型変換は栄養源が枯渇した後、どのようなタイミングで誘導されるだろうか？この点を明らかにするために野生型細胞を栄養飢餓条件下で培養し、経時的に細胞数の変化、分裂期細胞の割合、*MAT* 逆位の有無を測定した (Fig 3). 出芽した細胞の割合は飢餓後2.5時間までは高く維持され、その後ゆっくりと低下した (Fig 3A). 細胞数の増加が止まる6時間後に初めて *MAT* 逆位が検出された (Fig 3B). その後、24時間まで培養を続けても *MAT* 逆位頻度の顕著な上昇は見られなかった。さらに、飢餓条件に移すと同時にノコダゾールを添加して分裂中期で細胞周期の進行を停止させたところ、*MAT* 逆位の誘導が遅れることが分かった (Fig 3C). これらのことから、栄養飢餓下で細胞周期を停止するまでの間の細胞分裂過程の進行が *MAT* 逆位に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

接合の誘導に必須の役割を果たす転写因子 Rme1 は接合型変換にも重要である

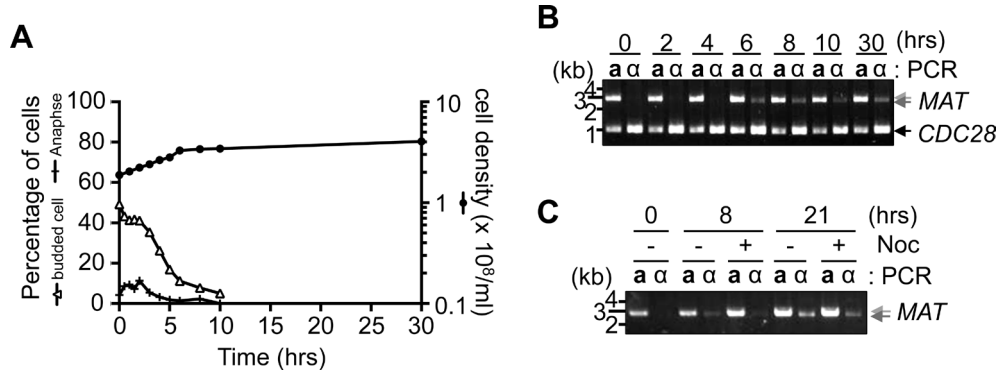
他の出芽酵母における研究から、栄養飢餓下での接合の誘導に関与する転写因子の候補として Zinc フィンガー蛋白質 Rme1 が挙げられる (Barsoum *et al.*, 2010; 2011; Booth *et al.*, 2010). *O. polymorpha* の *RME1* 遺伝子を欠失させたところ、完全な不撻ではないものの、野生型と比べて接合率が著しく低くなることが分かった (Fig 4A). また、*rme1Δ* 細胞での接合型変換をしらべたところ、*MAT* 逆位の頻度が野生型の 1/3-1/2 程度に低下していた (Fig 4B).

Rme1 蛋白質が *MAT* 逆位の誘導に直接的に関与する



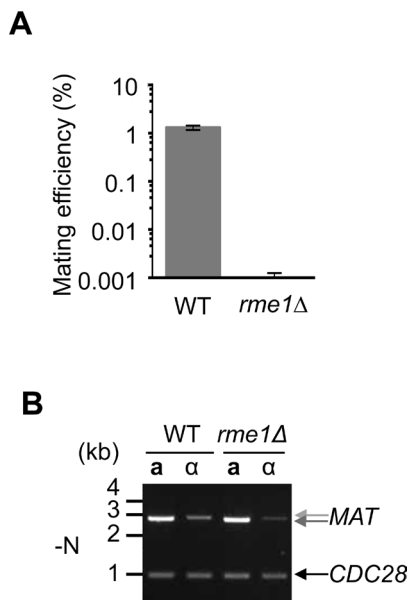
**Fig. 2** a1-α2 inhibits the *MAT* inversion.

(A) *MATα* haploid cells and *MATα/MATa(IR2Δ)* diploid cells were grown in YPD medium (+N) and transferred to MEMA medium (-N). Genomic DNA samples were prepared and digested with *EcoRI* and subjected to Southern blot analysis using a probe specific for *MATα* sequence. (B) Genomic DNA was prepared from strains with the indicated genotype, and the mating type was determined by *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. Left panel of B: Schematic of haploid cells expressing both *MATa* and *MATα*. +N: cells grown in YPD medium, -N: cells incubated in MEMA medium for 16 hrs.



**Fig. 3** Mating type switching occurs after cessation of cell division under starvation condition.

(A) CBS4329 cells were grown in YPDS medium and transferred to NaKG medium. Samples were collected at different intervals and cell density was measured using a hemacytometer. The remaining of samples were fixed and stained with DAPI to determine anaphase cells and budding index. (B) Genomic DNA was prepared from samples collected in (A) and subjected to *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. *CDC28*-specific primers were added to PCR reactions as controls for the amount of input DNA. (C) I(a)- or A( $\alpha$ )-type of CBS4329 cells grown in YPDS medium were incubated in NaKG medium containing either dimethyl sulfoxide or nocodazole for 8 hrs. Genomic DNA was prepared and subjected to *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A.



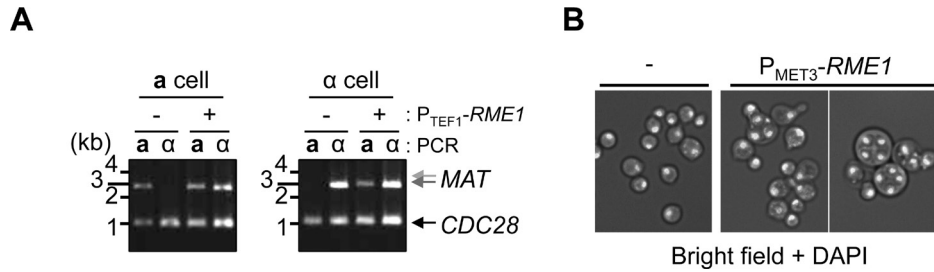
**Fig. 4** Rme1 is required for mating and *MAT* inversion.

(A) Mating is severely reduced in *rme1Δ* cells. Wild-type and *rme1Δ* strains of *ura3-1* and *leu1-1* genotypes were combined on MEMA mating medium and incubated at 30°C. After 24 hrs, cells were spread on SD plates to select for Leu+Ura+ diploids. Colony number was counted after a 2 days incubation at 37°C. The average of three independent matings is shown. Error bars indicate SD. (B) *MAT* inversion was reduced in *rme1Δ*. Genomic DNA was prepared from strains with the indicated genotype and the mating type was determined by *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. -N: incubated in MEMA medium for 16 hrs. *CDC28*-specific primers was added to all PCR reactions as controls for the amount of input DNA.

かを調べるために、野生型細胞中で *RME1* 遺伝子を高発現させたところ、栄養増殖中でも *MAT* 逆位が起こっていることが分かった (Fig 5A). *RME1* 高発現株では、野生型細胞では有性生殖が誘導されない YPDS 培地上でも接合管と似た細胞の変形や胞子様の構造体が観察された (Fig 5B). これらの結果から、*O. polymorpha* では接合と接合型変換は協調的に制御されており、Rme1 が重要な役割を果たすことが示唆された。

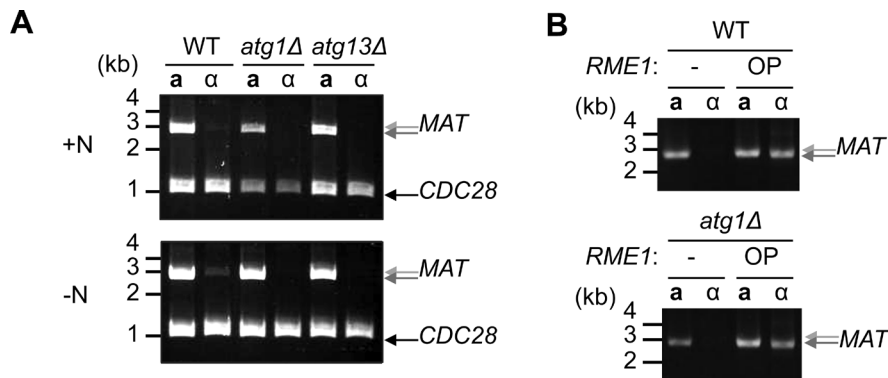
Rme1 蛋白質は DNA 結合能があると予想されることから、染色体の *MAT* 周辺領域に直接結合することにより DNA 組換えを促進する可能性と下流の遺伝子の転写を誘導させる可能性が考えられる。栄養飢餓下での蛋白質発現にはオートファジーが重要である。オートファジーに必須の Atg1 のホモログが *O. polymorpha* のゲノム中にも存在していることから、*atg1Δ* 株を作製したところ、*MAT* 逆位は不能であった (Fig 6A). しかし、*RME1* 高発現細胞で見られる栄養増殖中の *MAT* 逆位は正常であった (Fig 6B). このことから、Rme1 は接合型変換の誘導に転写因子として働いていると考えられる。

以上、Rme1 が *MAT* 逆位を促進するのに対して、*a1-a2* が抑制することを示した。 *a1-a2* の機能として、*RME1* の発現を抑制している可能性が考えられる。しかし、一倍体細胞と同様に、*MATα* と *MATa* を共発現している疑似二倍体細胞 ( $\alpha+a$  型) でも、栄養飢餓により *RME1* 遺伝子の転写は誘導されていた (Fig 7A). このことから、二倍体での *MAT* 逆位の抑制は Rme1 機能の下流で起こると考えられる。現在の Rme1 及び *a1-a2* による *MAT* 逆位制御のモデルを Fig 7B に示す。栄養飢餓下で Rme1 により転写誘導される標的遺伝子及び



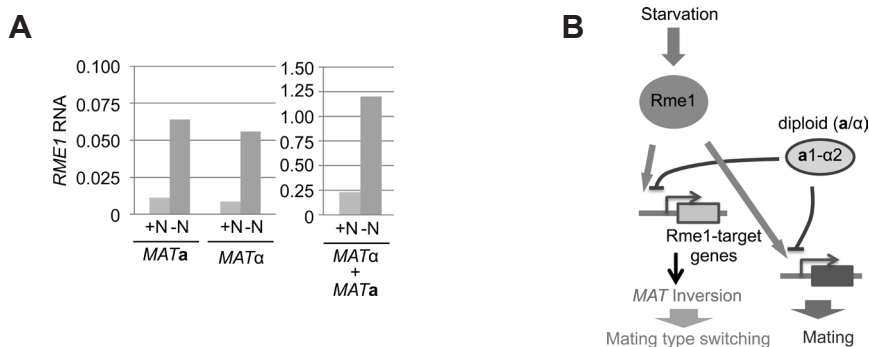
**Fig. 5** *RME1* overexpression induces the *MAT* inversion in mitotically growing cells.

(A) *RME1* was expressed in I(a)- and A(α)-type wild-type strains using a strong constitutive *TEF1* promoter. Cells were grown in SD medium supplemented with adenine, leucine, and uracil, and genomic DNA was subjected to *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. (B) Wild-type cells carrying P<sub>MET3</sub>-*RME1* were grown on SD plate supplemented with adenine, leucine, and uracil for 3 days at 30°C. Cells were fixed with ethanol and stained with DAPI. Mating projection-like morphology and spores were evident only in cells carrying P<sub>MET3</sub>-*RME1*.



**Fig. 6** *MAT* inversion is autophagy dependent.

(A) Autophagy mutants are *MAT* inversion deficient. Wild-type, *atg1Δ*, and *atg13Δ* cells were grown in YPDS medium (+N), transferred to MEMA medium and incubated for 20 hrs (-N). Genomic DNA was subjected to *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. (B) Atg1 is dispensable for *REMI*-induced *MAT* inversion. Wild-type and *atg1Δ* cells carrying P<sub>TEF1</sub>-*RME1* were grown in YPDS medium (+N), transferred to MEMA medium and incubated for 20 hrs (-N). Genomic DNA was subjected to *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. *CDC28*-specific primers were included in the reaction as control for input DNA.



**Fig. 7** a1-α2 functions independently of *RME1* expression.

(A) a1-α2 does not repress *RME1* mRNA levels. A(α)-type haploid cells and I(a)-type haploid cells in the presence or absence of *MATα* the exogenous *URA3* locus were grown in YPDS (+N), then shifted to MEMA medium and incubated for 16 hrs (-N). RNA was prepared and subjected to RNA-seq analysis. Relative amount of *RME1* RNA is shown. (B) Model of the regulation of the mating type switching and mating in *O. polymorpha*.

**a1- $\alpha$ 2**による転写抑制の標的となる遺伝子の中には、**MAT** 逆位の促進に働く遺伝子と接合過程に必要とされる遺伝子が含まれると考えられる。**Rme1**と**a1- $\alpha$ 2**が同じ標的遺伝子(群)の転写を制御するかどうかは現在不明であり、今後の解析により明らかにしていきたい。

#### 一倍体特異的遺伝子を同定する試み

接合型変換に重要な遺伝子のいくつかは、接合型変換が起こる一倍体細胞では栄養源飢餓により遺伝子発現が上昇するが、接合型変換が抑制されている二倍体では顕著な発現上昇が見られないことが予想される。そこで、**a**型、 $\alpha$ 型一倍体細胞、疑似二倍体である $\alpha$ +**a**型細胞の+N及び-N条件下での全遺伝子発現をRNA-seq法を用いて解析した。

$\alpha$ +**a**細胞においては、ゲノム配列から推定される5174遺伝子のうち1920遺伝子については、栄養源飢餓による転写量の増減が1.4倍以下であった。この1920遺伝子のうち、 $\alpha$ 細胞と**a**細胞のいずれにおいても栄養源飢餓条件下で転写量が2倍以上に増加するのは16遺伝子のみであった。これら是一倍体特異的に栄養源飢餓により転写誘導される遺伝子であり、**CMY1-CMY16**(Candidate Molecule Yamamoto)と名付けて解析を進めた(Fig 8A)。CMY遺伝子を破壊した株を作製し、接合型変換が起こるかどかをPCR法により調べた。**CMY2**, **CMY5**, **CMY6**, **CMY8**, **CMY11**, **CMY12**遺伝子を破壊した株では接合型変換の低下は見られなかった(Fig 8B)。他の**CMY**遺伝子についても同様の解析を行なう予定である。更に、栄養源飢餓条件下での一倍体における転写量が疑似二倍体の2倍以上である遺伝子群を解析した。ここでは、栄養源飢餓による転写量の変化の有無は問わないものとした。この絞り込みにより107遺伝子を得た。機能未知の候補遺伝子のうち、違いの大きい3つの遺伝子を**CMY13**, **CMY14**, **CMY15**遺伝子とした(Fig 8C)。これらの候補遺伝子の遺伝子破壊株の解析を行なったが、栄養源飢餓条件下で誘導される接合型変換の著しい低下は見られなかった(Fig 8D)。今後は、他の候補遺伝子についても同様の解析を進めていく予定である。

## 要 約

*O. polymorpha*における接合型変換、即ち2つの**MAT** 遺伝子座間での染色体逆位は栄養源飢餓条件により誘導されるが、これは接合可能な一倍体細胞に限られており、二倍体細胞では抑制されている。一倍体でも**a1**と $\alpha$ 2遺伝子が共に発現する細胞では**MAT** 逆位は誘導されず、

細胞の倍数性ではなく**MAT** 遺伝子座のheterozygosityが接合型変換能の有無を規定することが分かった。また、栄養源飢餓シグナルによる制御として、様々な出芽酵母で進化的に保存された転写因子**Rme1**が関与することを見いだした。*O. polymorpha*において**Rme1**は接合に必須であるが、接合型変換においても重要な役割を果たしており、特に**RME1** 遺伝子の高発現細胞では富栄養条件下でも**MAT** 逆位が起こることから、**Rme1**は接合型変換機構を栄養状態と結びつけていると考えられる。これらの結果から、*O. polymorpha*は接合型変換と接合を共に**Rme1**の制御下におくことにより、接合に至る可能性のある時のみ接合型変換を行うシステムを構築していることが明らかになった。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

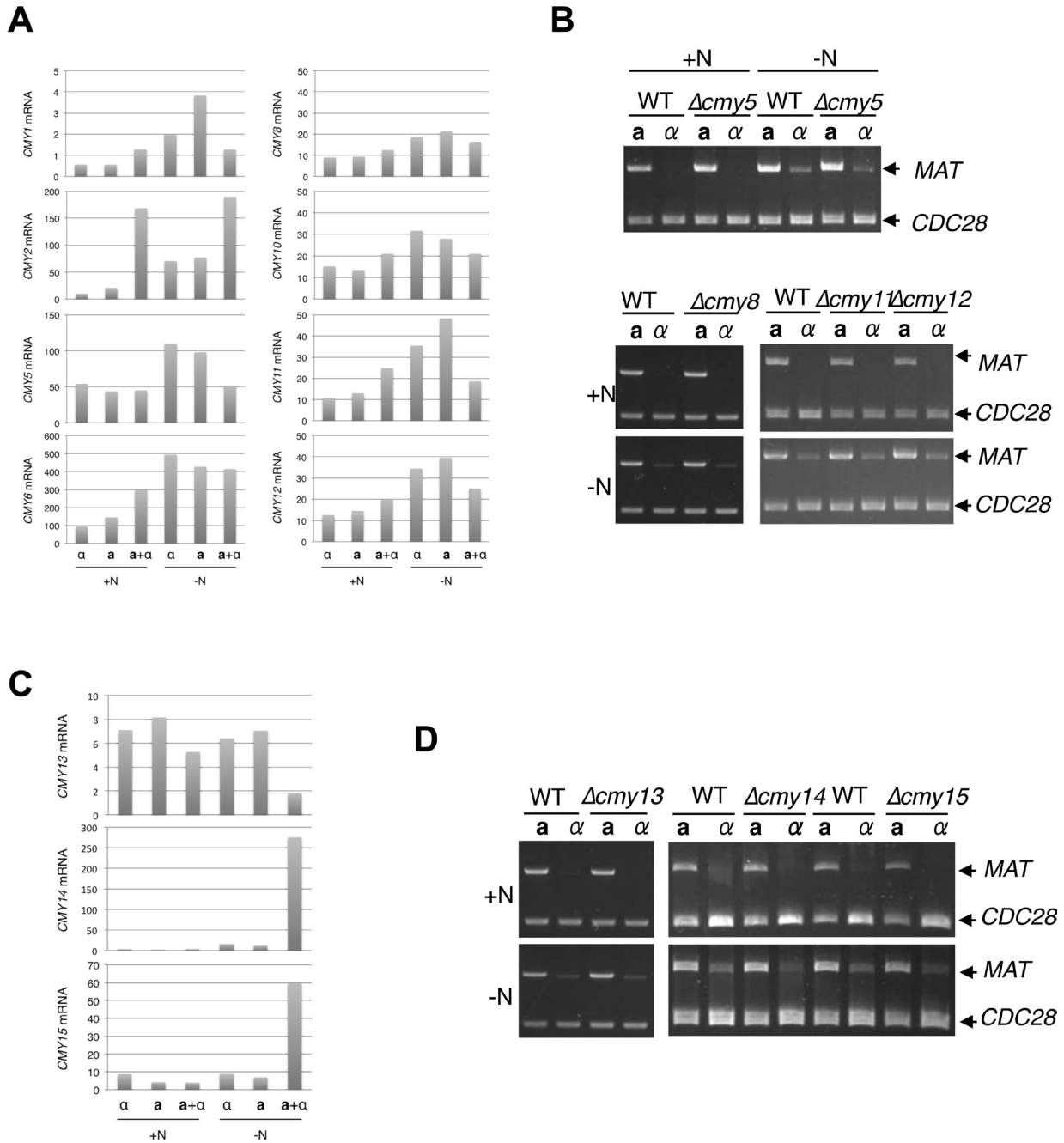
- 1) Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2015. Chromosomal inversion-based mechanism of mating type switching in *Hansenula polymorpha*. 28th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove CA, USA.
- 2) 前川裕美, 金子嘉信. 2015. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の接合型変換機構, 酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会, 9月, 広島.
- 3) 山本勝良, 金子嘉信, 前川裕美. 2016. メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* における接合型変換の制御, 酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会, 9月, 兵庫.
- 4) Yamamoto, K., Kaneko, Y., & Maekawa, H. 2016. Regulation of mating-type switching in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, 14th International Congress on Yeasts, Awaji, Japan.

### 原著論文

- 1) Yamamoto, K., Tran, T.N.M., Takegawa, K., Kaneko, Y. & Maekawa, H. 2017. Regulation of mating type switching by the mating type genes and **RME1** in *Ogataea polymorpha*. *Sci Rep.* 7(1)16318

## 謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄附講座助成を受けて行なわれたものであり、ここに感謝の意を表します。本研究への大阪大学大学院工学研究科原島峻教授(現: 崇城大学)、村中俊哉教授のご支援とご協力に深く感謝いたします。さらに、当寄附講座に在籍した博士研究員、技術補佐員、事務職員の皆さんに感謝します。特に、山本勝良博士研究員には実験の遂行と本稿執筆補助、Fig 8の作成を行なって頂いたことを記して感謝の意を表します。



**Fig. 8** RNA-seq analysis.

(A) The mRNA levels of the *CMY* genes in haploid  $\alpha$ , a, or a+ $\alpha$  cell in the RNA-seq analysis. Fragments per kilo base of exon model per million mapped reads (FPKM) was calculated and presented as mRNA level.  $\alpha$ , haploid  $\alpha$  cell; a, haploid a cell, a+ $\alpha$ , haploid a+ $\alpha$  cell; +N, cell grown in YPDS; -N: incubated in MEMA medium for 10hrs. (B) *MAT* inversion was unaffected in *cmy5* $\Delta$ , *cmy8* $\Delta$ , *cmy11* $\Delta$ , and *cmy12* $\Delta$  cells. Genomic DNA was prepared from strains with the indicated genotype and the mating type was determined by *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. +N: cells grown in YPDS medium, -N: incubated in MEMA medium for 16 hrs. *CDC28*-specific primers was added to all PCR reactions as controls for the amount of input DNA. (C) The mRNA levels of the haploid specific genes in the RNA-seq analysis. FPKM was presented as mRNA level.  $\alpha$ , haploid  $\alpha$  cell; a, haploid a cell, a+ $\alpha$ , haploid a+ $\alpha$  cell; +N, cell grown in YPDS; -N: incubated in MEMA medium for 10 hrs. (D) *MAT* inversion was unaffected in *cmy13* $\Delta$ , *cmy14* $\Delta$ , and *cmy15* $\Delta$  cells. Genomic DNA was prepared from strains with the indicated genotype and the mating type was determined by *MAT* PCR analysis as shown in Fig. 1A. +N: cells grown in YPDS medium, -N: incubated in MEMA medium for 16 hrs. *CDC28*-specific primers was added to all PCR reactions as controls for the amount of input DNA.

## 文献

- Barsoum, E., Martinez, P. & Astrom, S.U. 2010. Alpha3, a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes Dev.* **24**: 33-44.
- Barsoum, E., Rajaei, N., & Astrom, S.U. 2011. RAS/cyclic AMP and transcription factor Msn2 regulate mating and mating-type switching in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* **10**: 1545-1552.
- Booth, L.N., Tuch, B.B. & Johnson, A.D. 2010. Intercalation of a new tier of transcription regulation into an ancient circuit. *Nature* **468**: 959-963.
- Haber, J.E. 2012. Mating-type genes and *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33-64.
- Hanson, S.J., Byrne, K.P. & Wolfe, K.H. 2014. Mating-type switching by chromosomal inversion in methylotrophic yeasts suggests an origin for the three-locus *Saccharomyces cerevisiae* system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: E4851-E4858.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., *et al.* 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962.
- Lu, S.F., Tolstorukov, I.I., Anamnat, S., Kaneko, Y. & Harashima, S. 2000. Cloning, sequencing, and functional analysis of *H-OLE1* gene encoding delta9-fatty acid desaturase in *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 499-509.
- Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLoS Genet* **10**: e1004796.
- Saraya, R., Krikken, A.M., Kiel, J.A., Baerends, R.J.S., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research* **12**: 271-278.
- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Method. Enzymol.* **194**: 3-21.

# リン酸シグナル伝達経路の主要調節因子は メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* で保存されている

金子嘉信

大阪大学大学院工学研究科酵母リソース工学寄附講座

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

## Main regulatory components of the phosphate signal transduction pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*

Yoshinobu Kaneko

Yeast Genomic Resources Laboratory, Graduate School of Engineering, Osaka University  
Yamadaoka 2-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan

To gain better understanding of the diversity and evolution of the gene regulation system in eukaryotes, the phosphate signal transduction (PHO) pathway in non-conventional yeasts has been studied in recent years. Here we characterized the PHO pathway of *Ogataea polymorpha*, which is genetically tractable and distantly related to *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, in order to get more information for the diversity and evolution of the PHO pathway in yeasts. We generated several *pho* gene-deficient mutants based on the annotated draft genome of *O. polymorpha* BY4329. Except for the *Oppho2*-deficient mutant, these mutants exhibited the same phenotype of repressible acid phosphatase (APase) production as their *S. cerevisiae* counterparts. Subsequently, *Oppho80* and *Oppho85* mutants were isolated as suppressors of the *Oppho81* mutation and *Oppho4* was isolated from *Oppho80* and *Oppho85* mutants as the sole suppressor of the *Oppho80* and *Oppho85* mutations. To gain more complete delineation of the PHO pathway in *O. polymorpha*, we screened for UV-irradiated mutants that expressed APase constitutively. As a result, three classes of recessive constitutive mutations and one dominant constitutive mutation were isolated. Genetic analysis showed that one group of recessive constitutive mutations was allelic to *OpPHO80* and that the dominant mutation occurred in the *OpPHO81* gene. Epistasis analysis between *Oppho81* and the other two classes of recessive constitutive mutations suggested that the corresponding new genes, named *PHO51* and *PHO53*, function upstream of *OpPHO81* in the PHO pathway. Taking these findings together, we conclude that the main components of the PHO pathway identified in *S. cerevisiae* are conserved in the methylotrophic yeast *O. polymorpha*, even though these organisms were separated from each other before duplication of the whole genome. This finding is useful information for the study of evolution of the PHO regulatory system in yeasts.

Key words: PHO pathway, *O. polymorpha*, regulatory gene, phosphate homeostasis, diversity

### 緒 言

環境変化に適応し、様々な条件で生存するために、微生物はシグナル伝達の複雑な経路を進化させてきた。PHO経路として知られるパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のリン酸シグナル伝達経路は真核生物におけるリン

酸恒常性を維持する遺伝子発現調節系として詳細に研究されてきた (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012; Oshima, 1997; Yadav *et al.*, 2016)。無機リン酸 (Pi) はすべての生物に不可欠な栄養素であるため、PHO経路は他の真核生物でも程度の差はあれ共通に保存されていると考えられ、遺伝子発現調節系の多様性と進化を研究するための良いモデルとなると思われる。*S. cerevisiae* のPHO経路において、高リン酸条件下ではサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (サイクリン-CDK) 複合体 Pho80-Pho85 によってリン酸化された転写活性化因子 Pho4 は

E-mail: kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

共同研究者：原島 俊 (崇城大学生物生命学部)、

中西洋一 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

エクスポーチン Msn5 によって核から細胞質に排出される。その結果、酸性ホスファターゼ (APase) 遺伝子 *PHO5* や高親和性 Pi トランスポーター遺伝子 *PHO84* のようなリン酸抑制性遺伝子は発現されない。反対にリン酸濃度が十分に低い場合、Vip1 により合成される inositol heptakisphosphate (イノシトール7リン酸, IP7) によって活性化される CDK 阻害因子 (CKI) Pho81 が Pho80-Pho85 複合体の活性を阻害し、リン酸化されない Pho4 が核内にとどまり、もう1つの転写活性化因子 Pho2 との協働でリン酸抑制性遺伝子を発現させる (Kaffman *et al.*, 1994, 1998a, b; Lee *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1994)。最近、YTH ドメインを含む Pho92 が、*PHO4* mRNA の安定性を調節して、リン酸およびグルコース代謝に関与することも報告されている (Kang *et al.*, 2014)。PHO 経路を構成する多くの因子についての詳細はかなり明らかにされているが、リン酸シグナル自体がどのように感知されるかについては不明なままである。

最近、真核生物における遺伝子発現調節系の多様性と進化についての知見を得るために、いくつかの酵母で PHO 経路が研究されている。例えば、*Candida glabrata* では PHO 経路の多くの調節因子が保存されているが、*CgPHO2* はリン酸抑制性遺伝子の発現には必要ない (Kerwin & Wykoff, 2009)。また、*C. glabrata* は *S. cerevisiae* の APase 遺伝子 *PHO5* の相同遺伝子を持たず、その代わりに機能的に置き換わる別のタイプのリン酸抑制性酸性ホスファターゼ *CgPMU2* が存在する (Orkwis *et al.*, 2010)。一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の PHO 経路には、*ScPHO81*、*ScPHO2* および *ScPHO4* に対する相同遺伝子はなく、*ScPHO80* と *ScPHO85* の相同遺伝子は PHO 経路に関与していない。さらに、APase 遺伝子 (*SpPho1*) の転写活性化因子 SpPho7 は、ScPho4 転写活性化因子のヘリックス-ループ-ヘリックス型とは異なる亜鉛フィンガー型転写活性化因子である (Henry *et al.*, 2011)。さらに、この分裂酵母 PHO 経路では SpPho7 を介したリン酸とアデニンの両方からの発現調節が見られる (Estill *et al.*, 2015)。

PHO 経路は、1960 年代から糸状菌 *Neurospora crassa* および *Aspergillus nidulans* においても研究されている。*N. crassa* の PHO 経路では、*ScPHO4*、*ScPHO80*、*ScPHO85* および *ScPHO81* にそれぞれ対応する遺伝子 *nuc-1*、*preg*、*pgov* および *nuc-2* が同定されている (Kang & Metzberg, 1990; Littlewood *et al.*, 1975; Toh-e & Ishikawa, 1971)。一方、*A. nidulans* では、*ScPHO80* および *ScPHO4* に相同な遺伝子は PHO 経路に関与するが、*ScPHO81* と *ScPHO85* に相同な遺伝子は関与しない (Wu *et al.*, 2004)。担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* の PHO 経路に関する最近の研究では、*CnPHO4*、*Cn-*

*PHO80*、*CnPHO85* および *CnPHO81* は PHO 調節遺伝子であることが報告されている (Toh-e *et al.*, 2015)。したがって、*S. cerevisiae* から系統的に離れた真菌でも PHO 経路自体は保存されているが、PHO 経路の主要調節因子であるサイクリン-CDK-CKI 複合体は常に保存されているわけではなさそうである。

メタノール資化酵母 *O. polymorpha* は系統関係的には *S. cerevisiae* と分裂酵母あるいは糸状菌との間に位置しており (Dujon, 2010; Dujon *et al.*, 2004)、約 10 億年前には *S. cerevisiae* との共通の祖先から分岐したと考えられている。*S. cerevisiae* のゲノム中には複数の遺伝子で構成される相同領域対が 55 カ所も存在することから、およそ 1 億年前に *S. cerevisiae* 祖先種で全ゲノム重複が生じ、その後のゲノムの再編成とサイズ削減によって *S. cerevisiae* と *C. glabrata* を含むその近縁種が進化してきたと考えられている (Wolfe & Shields, 1997)。*O. polymorpha* はこの全ゲノム重複以前に *S. cerevisiae* や *C. glabrata* と系統的に分岐したと考えられる。*O. polymorpha* ではすでに APase 遺伝子として *OpPHO1* が同定されているが (Phongdara *et al.*, 1998)、PHO 経路に関する研究はなされていない。本研究では、*O. polymorpha* における PHO 経路の解明を行った。比較ゲノム解析と古典遺伝学的手法の組み合わせで、PHO 経路の *OpPHO81*、*OpPHO80*、*OpPHO85* および *OpPHO4* 遺伝子を同定した。さらに、構成的 APase 生産性 (Pho<sup>c</sup> 表現型) を示す突然変異体を分離し、3 つの劣性突然変異群および 1 つの優性突然変異群に分類できた。3 つの劣性 Pho<sup>c</sup> 変異の 1 つは *OpPHO80* の対立遺伝子で、優性変異は *OpPHO81* の対立遺伝子であった。*OpPHO81* 突然変異と残りの 2 つの劣性変異の上位下位試験の結果、両方の遺伝子とも PHO 経路の *OpPHO81* の上流で機能することがわかった。つまり、PHO 経路におけるこれらの調節遺伝子の遺伝学的役割は、*S. cerevisiae* の対応する遺伝子と同じであった。*O. polymorpha* は系統的には全ゲノム重複以前に *S. cerevisiae* から分岐しているが、PHO 経路の主要調節因子は *O. polymorpha* において保存されていることが明らかとなった。

## 実験材料と実験方法

### 菌株、プラスミド及び培地

使用した酵母菌株およびプラスミドを Table 1 に示す。BY4329 を APase 変異体分離のための野生型株として使用した。*OpPHO81* 突然変異の抑圧変異体の分離には NY-1 を用いた。*O. polymorpha* 遺伝子破壊体は、ゼオシン耐性遺伝子またはハイグロマイシン耐性遺伝子または *OpURA3* 遺伝子を用いて構築した。遺伝子の破壊は



Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or description	Source
<i>O. polymorpha</i>		
BY4329	<i>leu1-1</i>	NBRP <sup>a</sup>
BY4330	<i>ura3-1</i>	NBRP <sup>a</sup>
KYC638	<i>ura3-1 leu1-1</i>	Lab stock
KYC1389	<i>pho80-2 ade11-1</i>	This study
KYC1390	<i>pho85-8 ura3-1</i>	This study
KYC1404	<i>pho85-8 leu1-1</i>	This study
NY-1	<i>pho81Δ::URA3 ade11-1 ura3-1</i>	This study
H76-1B	<i>pho81Δ::URA3 leu1-1 ura3-1</i>	This study
HPH27-3	<i>pho80Δ::zeo ura3-1</i>	This study
YZS216	<i>pho85Δ::hphNT leu1-1 ade8-1</i>	This study
HPH7-26	<i>pho4Δ::zeo ura3-1</i>	This study
HPH26	<i>pho2Δ::zeo ura3-1</i>	This study
YZS28	<i>pho4::pREMI-Z leu1-1</i>	This study
YZS135	<i>pho4-1 ura3-1</i>	This study
<i>S. cerevisiae</i>		
BY22357	<i>MATα pho3 pho81Δ::LEU2 leu2 ura3 trp1 his3</i>	NBRP <sup>a</sup>
Plasmid		
N3	<i>OpPHO81</i> in pUC19	This study
BYP5153	<i>ScPHO81</i> in YEp13	NBRP <sup>a</sup>
BYP7151	pBP-G2; TEF1-PGK1 bidirectional promoter	Partow <i>et al.</i> , 2010
YZ3	<i>OpPHO81</i> ORF in BYP7151	This study
YZ6	<i>ScPHO81</i> ORF in BYP7151	This study
YZ14	<i>OpPHO4</i> in pFL26	This study
YZ77	<i>OpPHO80</i> in pFL26	This study
YZ79	<i>OpPHO85</i> in pFL26	This study
pAP4	<i>OpPHO81<sup>c</sup></i> allele of AP4 in pUC19	This study
pAP5	<i>OpPHO81<sup>c</sup></i> allele of AP5 in pUC19	This study
pC12	<i>OpPHO81<sup>c</sup></i> allele of C12 in pUC19	This study
pC51	<i>OpPHO81<sup>c</sup></i> allele of C51 in pUC19	This study

<sup>a</sup> National BioResource Project -Yeast, <http://yeast.lab.nig.ac.jp/yeast/>

PCRによって確認した。プラスミド YZ3 および YZ6 を構築するために、PCR増幅した *OpPHO81* ORF および *ScPHO81* ORF をそれぞれ *Bam*HI と *Hind*III で切断したプラスミド BYP7151 に In-Fusion Cloning キット (タカラバイオ, Japan) を用いて連結した。プラスミド YZ14 は *OpPHO4* ORF + 500bp 上流および 300bp 下流配列を PCR により増幅し、pFL26 の *Sma*I 切断部位に挿入して作製した。*OpPHO80*-と *OpPHO85*-発現プラスミド (YZ77 と YZ78) も同様に構築した。*OpPHO81<sup>c</sup>* 遺伝子の配列解析のために、各 *OpPHO81<sup>c</sup>* 遺伝子を PCR で増幅し、pUC19 の *Bam*HI-*Hind*III ギャップにクローニングした。酵母菌株は、200mg/L のアデニンを含む 50g/L の Difco YPD broth [Becton, Dickinson and Company (BD), USA] 培地 (YPAD)、最少合成培地 [SD; 組成は 6.7g/L Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (BD), 20g/L Glucose]、または必要に応じて適切なアミノ酸を追加した

高リン酸および低リン酸合成培地で増殖させた (Sherman, 1991; Toh-e *et al.*, 1973) *O. polymorpha* の交雑および胞子形成は 30°C で 0.5% 麦芽エキス-2.5% マルトース (MEMA) 平板培地上で誘導した。薬剤耐性選択のために、平板培地にハイグロマイシン B (150 μg/ml, 和光純薬) またはゼオシン (Zeocin 100 μg/ml, Invitrogen, USA) を添加した。大腸菌 DH5α はプラスミド保持を選択する薬剤入り LB ブロス (Miller, 1972) 中で培養し、プラスミド DNA 調製に使用した。平板培地には 2% 寒天を添加した。別段の記載がない限り、酵母と細菌の培養は 37°C で行った。

#### 遺伝解析と形質転換

二倍体細胞は、MEMA 平板培地上で互いに相補的な栄養要求性突然変異を有する株を交雑することによって作製した。30°C で 1 日間交雑培養した後、SD 平板培地に移し、二倍体細胞のみを原栄養体として選択した。胞

子形成のために、得られた二倍体細胞を新しいMEMA平板上で30℃、2日間培養した。形成した四分子をSporePlayマイクロマニピュレーター (Singer Instruments, UK) で解剖した。酵母形質転換はFrozen-EZ Yeast Transformation IIキット (Zymo Research, USA) を用いて行った。大腸菌形質転換のために、ECOS Competent *E. coli* DH5 $\alpha$  (ニッポンジーン, Japan) を指定の方法に従って使用した。

#### ドラフトゲノム解析と遺伝子注釈

BY4329のドラフトゲノム配列を決定し、日本DNAデータバンクにBioProject IDがPRJDB3035として登録した (Maekawa & Kaneko, 2014)。ドラフト配列の予測コーディング配列 (CDS) データはIn silico Molecular Cloning (IMC) バージョン5.1 (インシリコバイオロジー, Japan) と3つの酵母アミノ酸データベース (*S. cerevisiae*, *O. parapolymorpha* および *S. pombe*) 由来のクエリアミノ酸配列を用いて調べた。遺伝子アノテーションは、予測CDSデータをクエリとしてNCBI nr データベース内のBLASTXプログラムで使用して行った。PHO経路の構成因子と注釈された候補遺伝子について、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) のBLASTP解析プログラムを使用して、対応する *S. cerevisiae* 遺伝子との配列類似性を再確認した。

#### 酸性ホスファターゼ突然変異体の分離

一晚培養した培養液を滅菌水で10,000倍に希釈し、0.1mlをYPAD平板培地に広げた。Spectrolinker (トミー精工, Japan) を用いて、平板培地上の細胞に紫外線 (20または25J/m<sup>2</sup>) を照射した。28℃で2日間培養した後、出現したコロニーをコロニー活性染色法 (Toh-e *et al.*, 1973) によりAPase生産を調べた。線状DNA断片のランダムな組み込み法 (van Dijk *et al.*, 2001) も *O. polymorpha* のAPase変異体を得るために使用した。具体的には、プラスミドpREMI-Z (阪井康能博士からの分与) をBamHIで線状化し、*O. polymorpha* 細胞に導入した。得られたゼオシン耐性形質転換体のAPase表現型をコロニー活性染色法により調べて変異体を分離した。pREMI-Z挿入の座位は、各形質転換体から回収されたプラスミドを配列解析することによって決定した。

#### 酸性ホスファターゼ活性測定

APase活性はToh-e *et al.* (1973) の方法に従って、細胞懸濁液を酵素液として用いて測定した。1単位の酵素活性は、35℃で1分間に1 $\mu$ molの

-

ニトロフェノールを遊離させる酵素の量として定義した。

#### 定量RT-PCR解析

全RNAをvan Zutphen *et al.* (2010) の方法に従って単離し、DNase I処理後、さらにRNeasy Mini Plus Kit (Qiagen, Germany) を用いて精製した。試薬会社のプロトコールに従い、1 $\mu$ gの全RNAからSuperScript III逆転写酵素 (Invitrogen) を用いてcDNAを合成し、1 $\mu$ lのcDNA反応混合物を定量PCR反応に使用した。PCR産物はTaqMan MGB遺伝子発現キット (Applied Biosystems, USA) を用いてStepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems, USA) で測定した。アクチン遺伝子*OpACT1*の発現に対して相対値を算出した。

## 結 果

#### メタノール資化酵母でのPHO経路構成遺伝子の保存性

BY4329の注釈付きドラフトゲノム配列 (Maekawa & Kaneko, 2014) に基づいて、*O. polymorpha* における *S. cerevisiae* PHO経路の調節因子と相同な遺伝子を調べた。相同遺伝子間のアミノ酸同一性を推定するためにBLASTP解析をさらに行った。その結果、Table 2に示すようにScPHO経路構成遺伝子に対応する *O. polymorpha* のオルソログと考えられるAPase (*OpPHO1*), CKI (*OpPHO81*), サイクリン (*OpPHO80*), CDK (*OpPHO85*), 転写活性化因子 (*OpPHO2*と*OpPHO4*), イノシトールピロリン酸合成経路酵素 (*OpPLC1*, *OpARG82*, *OpIPK1*, *OpKCS1*, *OpVPI1*) の各遺伝子を抽出できた。したがって、*O. polymorpha* は *S. cerevisiae* と同様なPHO経路を持つと考えられた。なお、BY4329のPho1は、以前に報告された *O. polymorpha* のPho1 (ATCC34438; Phongdara *et al.*, 1998) と95%の同一性であった。E値から判定すると、転写活性化因子OpPho4が最もScPho4と相同性が低かったが、アミノ酸長がScPho4より長いCgPho4と同様にC末端DNA結合ドメインが最も保存されている (Fig. 1)。Kerwin & Wykoff (2009) は、CgPho4がCgPho2を必要とせず、単独でAPase遺伝子を活性化できる原因としてScPho4よりアミノ酸長が長く、サイズが大きくなっていることが重要であると考えている。したがって、ScPho4よりサイズが大きいOpPho4も単独でPHOプロモーターの発現を活性化できる可能性がある。

PHO経路の中心的な発現調節システムは、*PHO4*, *PHO80*, *PHO81* および *PHO85* によってコードされた4つの調節因子から構成されている (Ljungdahl & Daiguan-Fornier, 2012)。そこで、以下の研究ではこれら *O. polymorpha* の4つの遺伝子が *S. cerevisiae* 遺伝子と同じ役割をPHO経路で果たすかどうかを調べた。

**Table 2** Sequence similarity of components of the PHO pathway between *O. polymorpha* and *S. cerevisiae*

Gene <sup>a</sup>	<i>Op</i> relative to <i>Sc</i> <sup>b</sup>		Length of protein, residues	
	Amino acid identity (%)	Expectation value	<i>Sc</i>	<i>Op</i>
<i>PLC1</i>	194/478 (40%)	5.0e-131	869	897
<i>ARG82</i>	115/276 (41%)	1.4e-61	355	324
<i>IPK1</i>	76/268 (28%)	1.5e-12	281	271
<i>KCSI</i>	110/224 (49%)	8.0e-82	1050	788
<i>VIP1</i>	634/942 (67%)	0	1146	1103
<i>PHO81</i>	157/447 (35%)	2.5e-119	1178	1128
<i>PHO80</i>	85/171 (49%)	1.5e-38	293	293
<i>PHO85</i>	195/305 (63%)	1.1e-104	302	320
<i>PHO4</i>	33/85 (38%)	1.5e-10	312	577
<i>PHO2</i>	89/225 (39%)	1.5e-49	559	439
<i>PHO1</i>	155/443 (34%)	2.7e-69	467	442

<sup>a</sup> *O. polymorpha* genes except for *PHO1* were designated corresponding to the *S. cerevisiae* gene nomenclature. *PHO1* gene has been already named by Phongdara *et al.* (1998).

<sup>b</sup> Amino acid identity indicates the percentage of amino acid identity between the two species, and the number of amino acids over which the identity was evaluated by BLASTP alignment.

Sc_Ph04/1-312	1	MGRTTSEGIHGFVDDLEPKSSILDKVGDFITVNTK--RHDGREDFNEQNDEL---NSQENHNSSENGNENEN	67
Cg_Ph04/1-533	1	MGEQVEDMDKLYETPIDMQTTIPDQVDNYLHMVNSGLQHDEKEDEHREHEDAIDGGASLNMHLYNINDTLNGV	73
Op_Ph04/1-583	1	MTSLMP-----ASAMSKQSSYTDSPADESHLSNS-----HPPNAE-----NSLGTHGHQE--SLEHS	50
Sc_Ph04/1-312	68	EQDSLALDDLDRAF-----ELVEGMDMDWMMPSHAHH-----	99
Cg_Ph04/1-533	74	STDNGHFDMDVLDLHFGPTLTTDDDDPTKMAELQHT--TI-HHGHLDVNGNRSDSLFSPFD-----	128
Op_Ph04/1-583	51	DLSEMNFESMDLQW-----SEFTNLHEIQHLDHMI-HHQHAAQANPANDSPHRHEDYSSFASHNNDHEQIT	115
Sc_Ph04/1-312	100	-----SHAT-----TATIKPRLLYSPLIHTQS-----	121
Cg_Ph04/1-533	129	-----SPLVHDTFSLSEARNSIQLTNEGSTSAITPFLSGKNHYDDHGNSINSQSFNYHNR	183
Op_Ph04/1-583	116	DPNNYQHPPQMFHRDYPVDQRTETAHATAVAVRPNDVFTPLVSPAV--TPELHAVNPPYGTGYQGGQDENVHKK	186
Sc_Ph04/1-312	122	-----AVPVTISENL-----VATATSTTSANKVTKNKS-----	150
Cg_Ph04/1-533	184	NSSLSKVSGKFPIS-SHAL-----TSTNQEQQHWNTSSRRASNSSRSRKRVL	230
Op_Ph04/1-583	187	VG-----FSPLT-SHALEFQSSRFPSQVNSAASFRQKRRDEKSTMSFPVSGDDGARRTSYKRSKTPNGT	250
Sc_Ph04/1-312	151	-----SSPYLN--KR--RGKPGPDSATS-----LFELPDSV----	177
Cg_Ph04/1-533	231	P-----SGNSSVSSTSNKVIKNSPYMNASSR--RLQKTIISNGNSKRDEWDEFMFLSPSSSLAND	287
Op_Ph04/1-583	251	PLFGPANPNFGQQQPGPSARMKQSPVKPSPFVSGARRSYRSRNSYSQGS----QNFDDMLPEAATSND	318
Sc_Ph04/1-312	178	-----IPTPKPKPKPKQ--YPKVILPSNSTR-----	201
Cg_Ph04/1-533	288	LTTGNDENMDISLPAGHSPTKEYNSYKPVILPSHAAENESMETDNYERASLLEDSQPDETQNNPNQNNPHSN	360
Op_Ph04/1-583	319	-----LMLPPSNPPAKE-EDFSAMELPSRSYS-----QEAPGNKNTANMDTAN	360
Sc_Ph04/1-312	202	--RVSP-----VTAKTS-----SSAEGVVVASESPVIAPHGSSH-----	233
Cg_Ph04/1-533	361	GSSISP-----VGKNS-----VMLASGSPVLPKQNSSNLIQTPTYSSKRKFVFKSPAD	407
Op_Ph04/1-583	361	PSAATPAAMMSFALAKLSAKNSPRMIKADNVLNKPNHNHNSAQSPPVILPSSSSFLLDQDNQQLPAIVPPLHI	433
Sc_Ph04/1-312	234	-----SRSLSKRRSSGALVDDD-----KRESHKHAEE	259
Cg_Ph04/1-533	408	ISSTEQTAEASNDASNDKSKDKKQKPSSSGPNKLR--RTNTGGSIGRVRSDSASQNSDYQRKKEVHKYAE	479
Op_Ph04/1-583	434	NGASKSSRSSSLKTSPLIQNDDMQPSQSPGMYTAKARSNSGGSSKSSQTD-----RKMTHKLAE	495
Sc_Ph04/1-312	260	QARRNRLAVALHELASLIPAENKQQNVAAPSATTVEAACRYIRHLQ-----QNVS-----	311
Cg_Ph04/1-533	480	QERRNRLNNAISDLNSLLPQDWR--DAVTVPSKAITAELACKYIRTL-----EELEQYK-----	532
Op_Ph04/1-583	495	QRRNRNMVAIQDLEKIIPDVLK--NEVAVPSKATTVELSSKYIQLQKENKGLQQVVALQLELERLSGAPH	566
Sc_Ph04/1-312		-----T	312
Cg_Ph04/1-533		-----K	533
Op_Ph04/1-583	567	SQESISPFPRVDGDRHE	583

**Fig. 1** Amino acid sequence alignment of Pho4 proteins in three yeast species.

The amino acid sequences of the Pho4 protein in *S. cerevisiae* (Sc\_Ph04), *C. glabrata* (Cg\_Ph04) and *O. polymorpha* (Op\_Ph04) were aligned by Clustal Omega. The known phosphorylation sites of ScPho4 are indicated by boxes.

*OpPHO81* は CDK 阻害因子である

まず, *OpPHO81* を *OpURA3* 断片の挿入により破壊した。得られた遺伝子破壊株は低リン酸条件下でも APase 生産能を示さず, *PHO1* 転写物も増加しなかった (Table 3)。これは *Scpho81* 破壊と同じ表現型である。したがって, *OpPHO81* は *O. polymorpha* の PHO 経路の転写レベルでの正の調節因子であると考えられる。*OpPHO81* 機能が *ScPHO81* 機能と互換性があるかどうかを調べるために, *S. cerevisiae* での *OpPHO81* 発現プラスミド (YZ3) を作製して *S. cerevisiae* BY22357 (*Scpho81Δ*) を形質転換した。得られた形質転換体を高リン酸培地で前培養し, 初期 OD<sub>660</sub> が 0.1 になるように高リン酸および低リン酸培地に植菌し, 培養 23 時間後に APase 活性を測定した。Table 4 に示すように, *OpPHO81* 遺伝子は *Scpho81Δ* 突然変異体の APase 非生産性表現型を *ScPHO81* 遺伝子と同程度のレベルに回復させたことから, *OpPho81* が CDK 阻害因子であることが支持された。さらにサイクリン-CDK 複合体が *O. polymorpha* の PHO 経路においても機能していることも示唆された。

*OpPHO80* と *OpPHO85* は酸性ホスファターゼ発現制御に関与している

*OpPHO80* と *OpPHO85* の欠失変異は, *S. cerevisiae* での遺伝子欠失変異と同じ表現型である Pho<sup>c</sup> 表現型を示した (Table 3)。*S. cerevisiae* では *pho80* および *pho85* 変異は *pho81* 変異に対して上位の変異であることが知られているので (Toh-e *et al.*, 1973; Ueda *et al.*, 1975), UV 突然変異誘発によって *Oppho81Δ* 株からの抑圧突然変異体の分離を試みた。約 23,000 コロニーを, 高リン酸および低リン酸平板培地の両方で APase 活性についてスクリーニングし, Pho<sup>c</sup> 表現型を示す 3 つのクローン (M1, M8 および M11) を得た (Fig. 2A)。それぞれのクローンを H76-1B (*Oppho81Δ*) と交雑し, 得られた交雑二倍体の APase 表現型を調べたところ, いずれの交雑二倍体も APase 活性を示さなかった。すなわちすべて Pho<sup>c</sup> 表現型を有していた。これは分離株の抑圧変異が劣性であることを示している。次に, 各交雑二倍体を孢子形成させ, 子囊解剖した。それぞれ調べた 9~16 個の四分子はほぼすべてが 2 Pho<sup>c</sup> : 2 Pho<sup>-</sup> 分離を示し,

**Table 3** APase production of *pho* mutants in high- and low-phosphate media

Strain	Relevant genotype	APase activity (mU/ml/OD <sub>660</sub> )		Relative <i>PHO1</i> transcript level <sup>a</sup>	
		High-Pi	Low-Pi	High-Pi	Low-Pi
BY4330	wild type	0.5 ± 0.1*	17.3 ± 0.8*	0.1 ± 0.01*	10 ± 1.7*
H76-1B	<i>pho81Δ</i>	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.7
HPH27-3	<i>pho80Δ</i>	23.8 ± 0.3	27.2 ± 1.1	16.5 ± 4.4	32.8 ± 10.2
M1	<i>pho81Δ pho80-101</i>	16.1 ± 1.0	23.3 ± 1.5	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
YZS216	<i>pho85Δ</i>	11.6 ± 0.3	16.0 ± 0.4	7.4 ± 0.9	18.7 ± 2.5
M8	<i>pho81Δ pho85-8</i>	14.4 ± 1.0	23.2 ± 1.4	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
HPH7-26	<i>pho4Δ</i>	0.5 ± 0.04	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.06
HPH26	<i>pho2Δ</i>	0.6 ± 0.1	13.9 ± 0.6	0.4 ± 0.01	9.9 ± 0.9
YZS153	<i>pho51-7</i>	13.3 ± 0.8	21.0 ± 1.3	4.5 ± 0.7	8.7 ± 1.0
AP3	<i>pho53-3</i>	7.9 ± 0.7	21.6 ± 1.3	2.7 ± 0.3	7.2 ± 0.5

<sup>a</sup> Transcripts of *PHO1* were quantified by RT-qPCR. *PHO1* expression of the wild-type cells grown in low-Pi medium was set as 10. Expression levels of *PHO1* in each mutant are presented as relative ratios to that of the wild type strain under low-Pi condition.

<sup>b</sup> Measurement not determined.

\* Standard deviation (n=3)

**Table 4** Expression of the *OpPHO81* gene complements the *pho81* mutation in *S. cerevisiae*

Strain	APase activity (mU/ml/OD <sub>660</sub> )	
	High-Pi	Low-Pi
<i>Scpho81Δ</i> + vector (BYP7151)	0.6 ± 0.04*	1 ± 0.1*
<i>Scpho81Δ</i> + <i>OpPHO81</i> (YZ3)	2.3 ± 0.2	15 ± 0.9
<i>Scpho81Δ</i> + <i>ScPHO81</i> (YZ6)	2.8 ± 0.2	23 ± 2

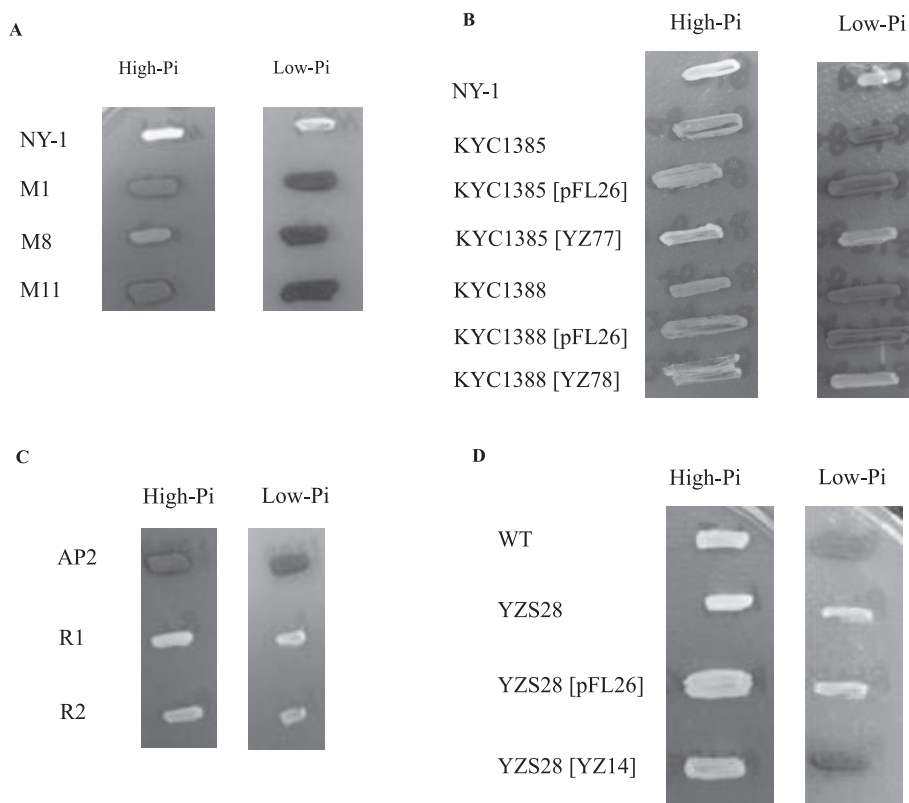
\* Standard deviation (n=3)

抑圧変異がそれぞれ単一の核性遺伝子に生じていることがわかった。3つの分離株と Pho<sup>c</sup> 表現型を示す *Op-pho80* および *Op-pho85* 突然変異体の中で相補性試験を行った。その結果、M1とM11の突然変異は *Op-pho80* 変異と相補せず、M8の突然変異は *Op-pho85* 変異と相補しなかった。さらに、M1およびM8の抑圧変異は、それぞれ *OpPHO80* (YZ77) および *OpPHO85* (YZ78) 発現プラスミドによって相補された (Fig. 2B)。M1 (*pho81Δ pho80-101*) および M8 (*pho81Δ pho85-8*) 突然変異体は、各遺伝子の欠失突然変異体と同レベルの APase 生産能を示した (Table 3)。したがって、*O. polymorpha* においてもサイクリン-CDK-CKI 複合体が、*S. cerevisiae* と同様の様式で APase 発現を調節する可能性が高いと考えられる。

*Op-pho80* と *Op-pho85* 変異の抑圧変異遺伝子 *Op-pho4* の取得

次に、*Op-pho4Δ* および *Op-pho2Δ* 変異体を作製した。予想どおり、*Op-pho4Δ* 変異体は低リン酸条件下で Pho<sup>c</sup> 表現型を示した (Table 3)。しかし、*Op-pho2Δ* の APase 生産は *Cg-pho2Δ* の場合 (Kerwin & Wykoff, 2009) と同様に野生型と同じであった (Table 3)。

*S. cerevisiae* の場合、*pho4* 変異は *pho80* 構成性変異の抑圧変異となり、PHO 経路では *PHO4* は *PHO80* の下流で働いている。そこで、*OpPHO80* の下流で働く遺伝子を確認するため、*Op-pho80* 突然変異体 (AP2; *Op-pho80-2 leu1*) の抑圧変異をプラスミド pREMI-Z のランダム組込み変異法 (van Dijk *et al.*, 2001) によってスクリーニングした。しかし、理由は不明であるが、この方法は AP2 ではうまく機能せず、形質転換後に多くの偽陽性ゼ



**Fig. 2** Colony staining assay of APase production in *O. polymorpha* mutants.

APase activity was determined by a colony-staining assay in high-Pi and low-Pi media. A, Strains M1, M8, and M11 were isolated by screening mutants obtained after UV mutagenesis of NY-1 (*pho81Δ*). B, Suppressor mutants KYC1385 and KYC1388 were derived from the original suppressor mutants M1 and M8, respectively, and both carried the *pho81Δ* mutation. They were transformed with either the control plasmid (pFL26), or the *OpPHO80* (YZ77) or *OpPHO85* (YZ78) expression plasmid. C, Strains R1 and R2 were isolated by screening mutants obtained after random integration of pREMI-Z into AP2 (*pho80*). D, Suppressor mutant YZS28 was derived from the original suppressor mutant R1, and carried the *PHO80+* gene and the inserted pREMI-Z fragment. YZS28 was subsequently transformed with pFL21 (control) or YZ14 (*OpPHO4*) plasmid.

オシン耐性コロニーが得られた。そこで、APase 活性を試験する前に、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のゼオシンを追加した新鮮な YPAD 平板培地上に最初の形質転換体をコロニーレプリカ法で複写して、ゼオシン耐性 (Zeo<sup>R</sup>) 株を再選択した。調べた約 9,100 のゼオシン耐性形質転換体の中から、2 つの Pho<sup>-</sup> 抑圧突然変異体 (R1 および R2) を単離した (Fig. 2C)。この抑圧突然変異体の各々と KYC1389 (*Op-pho80-2 ade11*) との交雑二倍体は、Pho<sup>C</sup> 表現型を示し、2 株の抑圧突然変異が劣性であるがわかった。さらに、各二倍体の 25 個の四分子は、2 Pho<sup>C</sup> Zeo<sup>S</sup> : 2 Pho<sup>-</sup> Zeo<sup>R</sup> の分離を示し、また、2 つの抑圧突然変異は互いに相補せず、核性の同一遺伝子の変異であることがわかった。

抑圧変異体 R1 の *EcoRI* 消化ゲノム DNA から回収したゼオシン耐性プラスミド DNA の塩基配列分析から、pREMI-Z 断片が *OpPHO4* のプロモーター (ATG 開始コドンの 52bp 上流) に挿入されていることが明らかになった。野生型 *OpPHO4* 遺伝子が R1 の抑圧変異を相補するかどうかを調べるために、R1 の抑圧変異を有する株 (YZS28) を *OpPHO4* 発現プラスミド (YZ14) で形質転換した。得られた形質転換体は Fig. 2D に示すように野生型の Pho 表現型を示した。したがって、分離した *Oppho80* 変異の 2 つの抑圧変異遺伝子は *Oppho4* 変異遺伝子であると結論した。

KYC1390 (*Oppho85-8 ura3*) の UV 突然変異処理によって *Oppho85* 突然変異の抑圧変異体の単離を試み、約 18,000 の生存コロニーから 6 つの抑圧変異体 (YZS66, YZS69, YZS72, YZS73, YZS77 および YZS85) を得た。各抑圧変異体と KYC1404 (*Oppho85-8 leu1*) との交雑二倍体はすべて Pho<sup>C</sup> 表現型を示し、抑圧変異はすべて劣性変異であった。YZS73 または YZS72 と KYC1404 との交雑二倍体からの 20 または 30 個の四分子の Pho 表現型は 2 Pho<sup>C</sup>:2 Pho<sup>-</sup> のパターンで分離していた。さらに、6 つの抑圧変異体間の相補性試験の結果、すべての抑圧変異は同一遺伝子の突然変異であることが明らかになった。YZS73 を野生型株 BY4330 に戻し交配して、*Oppho85* 突然変異をもたない Pho<sup>-</sup> クローン (YZS135) を作製した。YZS135 は、YZS28 (*Oppho4 :: pREMI-Z*) の Pho<sup>-</sup> 表現型を相補することができず、抑圧変異遺伝子が *OpPHO4* 遺伝子の変異遺伝子であることが確認できた。変異解析と抑圧変異体分離の結果から、低リン酸条件下で APase 遺伝子 (*PHO1*) の発現に必要な転写活性化因子を *OpPHO4* がコードし、*OpPho80* と *OpPho85* が *OpPho4* の機能を負に調節すると考えられた。

#### 酸性ホスファターゼ構成性突然変異体の分離

*O. polymorpha* の PHO 経路、特に *OpPHO81* の上流で働いている遺伝子をさらに探索するために、Pho<sup>C</sup> 表現型

を示す突然変異体のスクリーニングを実施した。野生型株 BY4329 を UV 照射処理して、YPAD 平板培地に出現したコロニーを高リン酸平板培地に移し、37°C で 1 日培養した後、コロニー活性染色法により APase 生産を調べた。約 25,000 コロニー中、明瞭に Pho<sup>C</sup> 表現型を示す 38 の構成性突然変異体を得られた。次に、得られた 38 個の Pho<sup>C</sup> 突然変異体を野生型株 BY4330 と交配し、得られた交雑二倍体を高リン酸平板培地で培養し、コロニー染色により APase 活性を調べた。38 の突然変異体のうち 4 つは優性構成性変異であり、他のものは劣性の構成性変異であった。

劣性構成性変異体について、先に述べた優性劣性試験で作製した雑種二倍体を無作為に選び、胞子形成させ、子囊解剖した。YPAD 平板培地で 2+ : 2- の APase 生産能の分離を示す四分子の中で、適当な Pho<sup>C</sup> 表現型胞子クローンを選択し、他の劣性構成性変異体との相補性試験を行った。その結果、劣性構成性変異体は 3 つの相補性グループに分けられ、そのうちの 1 つは *OpPHO80* の変異であった (11 株)。残りの 2 つの相補性グループは新しい遺伝子変異であり、*pho51* および *pho53* と命名した。3 つの相補性グループのうち、*pho51* 突然変異体が最も多く分離された (21 株)。

4 つの優性構成性変異体 (AP4, AP5, C12, C51 と命名) についても、野生型株 BY4330 と交雑した後、四分子分析を行った。その結果、高リン酸平板培地での四分子の Pho 表現型は 2+ : 2- 分離し、4 つの優性変異はすべて単一遺伝子の変異であることがわかった。*S. cerevisiae* の場合、*ScPHO81<sup>C</sup>* 変異が優性構成性変異として報告されている (Creasy *et al.*, 1993; Ogawa *et al.*, 1995)。したがって、4 つの優性構成性変異体のいずれかは *OpPHO81<sup>C</sup>* 変異の可能性があると考えた。それぞれの優性構成性変異体と NY-1 (*Oppho81 $\Delta$* ) との交雑二倍体を作製し、四分子分析を行った。各交雑二倍体について調べた 8-12 個の四分子の Pho 表現型は、高リン酸および低リン酸平板培地の両方で 2+ : 2- 分離パターンを示し、すべて両親型の四分子で、野生型組換え体を含む四分子は観察されなかった。この結果から 4 つの優性構成性変異体はすべて *OpPHO81<sup>C</sup>* 変異体であると結論した。

*ScPHO81<sup>C</sup>* の 4 種類の対立遺伝子は Pho81 タンパク質の N 末端領域に変異をもつと報告されている (Creasy *et al.*, 1993; Ogawa *et al.*, 1995)。今回得られた *OpPHO81<sup>C</sup>* 遺伝子の変異点を同定するために、4 種の突然変異体の *PHO81<sup>C</sup>* 遺伝子領域を PCR 増幅してクローニングし、それらの塩基配列を決定した。注目すべきことに、各 *OpPHO81<sup>C</sup>* 対立遺伝子の突然変異点はすべて異なり、N 末端 (AP4 の S144F) だけでなく、最小ドメイン (C12 の Y614 N, C51 の F618L) や C 末端 (AP5 の N968T) にも変異点が存在していた (Fig. 3)。

メタノール資化酵母におけるリン酸シグナル伝達経路

Sc_Ph081	1	MKFGKYLEARQLELAEYNSHFIDYKALKKLIKQLAIPTLKASSDLDLHLTLD----	DIDEKIIH	60
Cg_Ph081	1	MKFGKYLEARQVLEAEYNTHFIDYKALKKLMKQLATVPMINDDDLNASKNLINVDIDFNEASVY		64
Op_Ph081	1	MKFGKYLAAARQLELPEYSGYFINYKALKKLINALVANNSND-----		41
Sc_Ph081	61	QRLQENKAFFFKLERELEKVNQYGLARESDLRKIFNHLHSKYKDYKINGKLN--	SNQATSFKN	122
Cg_Ph081	65	RSLQANKASFFFKLERELEKVNLYYVDKESELKVKLDVIVSKMNDYRSSGRLN--	SKQAVVYKN	126
Op_Ph081	42	QSLQDKKGSFFFRLELEKVNNFYLEKESELKFRDLILIEKKNKALSDGRLDNVTKNSIAFVT		105
Sc_Ph081	123	LYAFAFKFKQKDLRNLEQYVELNKTGFSKALKKWKRSQSHDKDFYLATVVSQPIFTRDGLPKL		186
Cg_Ph081	127	ISAVIKKFLKDVNRNLEQYVELNRTGFAKVLKWKDRSHSNEKEFYLATVVSQPIFTRTEVARL		190
Op_Ph081	106	LYDGFKKFKSCLDRLEQFVELNETGFTKVLKWKDRSKSRTKELYLSTAVNVQPVFHRDEIEEL		169
Sc_Ph081	187	NDETLHILLELNDIDNNRRADIQSSTFTNDDDDNNTSNNKHNNNNNNNNNNNNNNNNIL		250
Cg_Ph081	191	SDEALNLLVDLNDLVEYVSGNGVNSPSTALPGSSSSNAVAISMGGKNSNNTKARRSSSS---		251
Op_Ph081	170	SDLVANNLMELEAKVEGGSFVRYETKEHNKVDGELPRGDRESDELYTDFYEITAQANQNS---		230
Sc_Ph081	251	HNNYELTTSKISENQLLEHLFQASSSLDMEMEIENWYKEILNIATVKDVQRKHALLRNFRETKI		314
Cg_Ph081	252	-----TGSEKGFVKLVGFSSTDLDEIEYWIQDIINISTLKDDQRRLATISNFVPTKV		304
Op_Ph081	231	-----KEEQVSKLHEWANQVLSKLSPSDKR-----FTISKV		261
Sc_Ph081	315	FTYLLQNSSESFHKNVFSLLKECLTTLFLLLVASPLDDNSLHIFYKSNQDHDLSYCEDDQVF		378
Cg_Ph081	305	LPRLELLQNNQK--EQIEKECITKLFSLLDSDNLVDECLSVVYLACEQYIDFNHIDEDAEIF		366
Op_Ph081	262	FLLLIPN-----LQIPDEALQYFYDNFKEFIDFSLVDDLN---		296
Sc_Ph081	379	SRKNVFHEAASCPEKSRFLILDEALTTSKLSKETVQKLLNAQDIHSRVPLHYAAELGKLEFVHS		442
Cg_Ph081	367	SNVNLFHEACACSTAPRSFLLYEALKFNKITSADLNLMNMKDIHGRIPLHHAEEQKTEFEVL		430
Op_Ph081	297	-GRCTLHEAASCKTDRVGIQVLCLENNIDP-----TLKDVTRGTRCLHYITELGRDLDL		350
Sc_Ph081	443	LLITN-----LLEDVDPIDSDSKTPLVLAITNNHIDVVRDLITGGANASPIEKPILDYKSNVI		501
Cg_Ph081	431	ILESN-----LVMDLIDPQDRKTPILALESNIDKAVKLLQHG-----SNAYP		475
Op_Ph081	351	VLDYAPRIKPLESLIDVDNESISPLMAIINNHSVSEVILLKHGAN-----AFPQQ		402
Sc_Ph081	502	SSTKVQFDPLNVACKFNHDAAKLLEIRSKQNADNAKNSSQHLQPLFKKNTGLCTLHIVA		565
Cg_Ph081	476	NAQDKVLDPLSVACKKGNFEAVKLLIDFLGDKIEGSLDK-----MELLHIVS		523
Op_Ph081	403	SDLKPTYLPLNVACKTGNLEVVQLLLNQASTPAEAKAKGLLTKS-----FQSAEGLLPLHIVA		461
Sc_Ph081	566	KIGGDPQLIQLLIRYGADPNEIDGFNKWTPIFYAVRSGHSEVITELLKHNARLDIEDDNGHSPL		629
Cg_Ph081	524	KNSSSALAEELISKGANVNYGDKFLGRTPLFYAVMNGKDNIVSLLRCNASIDVMDDEGYTPL		587
Op_Ph081	462	SAG-HDDLIPLLLEYGADINQTDKLNKWTPIFYSVTKGYASTTKKLIIEFGANFDIKDEDDGNPL		524
Sc_Ph081	630	FYALWESHVDVNLAI	LQRPLN-----LPSAPLINEINSQSSTQRLNTIDLTPNDDKFDLDIQ	685
Cg_Ph081	588	FYTIWESDVKVLNAM	LPSIKS-----IKQKKIHSDDLQPKKLTLPNNDLDDLSSSINDLT	643
Op_Ph081	525	YYALWEGNVGVANVM	IESLKASAAAAAGLPPRKELELAPPQAPTLSYTKNVMSPMVPPNRDDL	588
Sc_Ph081	686	D-----SIPDFALPPPIIPLRKYGHNFLEKKIFIKLKLKRPGLSE	IKLTQDNGIIMSSSPGR	741
Cg_Ph081	644	DS-----FENIPAFSLPPPIIPLRKYGHNFLEDKIYVVKVFKAGTES	ITLENDNDSLIN-APGR	701
Op_Ph081	589	SLSEISNVMDIPDELELPPPIIPLRKYGHNFLEKRIFLKLSFYTNRRS	IRLNPDT--FLTSIPGR	650
Sc_Ph081	742	ITLSSNLPEIIPRNVLIPVRSGEINNFCCKIDSETNDEEDDDEISEDHDDGEIIFQVDSIDDFSM		805
Cg_Ph081	702	IMLSSGSSDIIPRNVLIPVGGTSTAVDDDLDEE-----GEIIFYPDTLENFSI		750
Op_Ph081	651	ITISCKNDLIPRNLLLPVLDNDK-----SITFQDTDFDGFAL		688
Sc_Ph081	806	DFEIPFSFGTRIIAKTTAMPFLFKKVAINS---IATMNLPLFDTRLNNGISLTLDYQIIFPYP		865
Cg_Ph081	751	QFDVFPPTGNRLIARTVTPPSFLLSSSMNG---TNSLKIPLVDLKLVSIGTSLVSEYQVIQPSF		810
Op_Ph081	689	EFEFLPFTFGRTRIIAKGTLPSSLLQTKCPGVSGLSGDIEVPLVDLRLRSIGMLRFNVEIVYPYS		752
Sc_Ph081	866	GNPLKIINYPEYWKSTG----SDLMTSSKDGNFVTSSSLNGSFISVLVLCALNDEITIVAAPKY		924
Cg_Ph081	811	GTSLKVTECEPEYWKSTNEEKEPQNSEPSKIDNGYITETSLCGSFETIKIYYLNDGRVASKEMF		874
Op_Ph081	753	GRPLEISMPTYWKSSS-----AAATVKSISFVTASSLSGEYRVRVKVYLSDGTPLVCPSPWQ		810
Sc_Ph081	925	VEFKGTKILLNDLTKEQLEKVVDD-----YDFGKIDGSFDEVTLKQYLSRVVPLRSLE		978
Cg_Ph081	875	VTVNGAKILLMDLTTEQLQAILQS-----SLFIDNEMINTSNDLKILLCKGVDFDKTLDD		929
Op_Ph081	811	ITFNDVVLVSCSDFDQLSRLLYSAGAFEDLCAQLREVKNLSDDLKLEDIMAKLYIPELFLQ		874
Sc_Ph081	979	VIPGSAQLVIRVYFP-----TDKEIDTIPIKISPFININQFIDKLLLIIF		1023
Cg_Ph081	930	LIPSSIKLNIQICFP-----TAEIIVSIPVRSPLIAVDKLNINLLEMIF		974
Op_Ph081	875	IVAVEVSLNLEIFYPVSFELSFFNMKCYSVSAYNLVAKCSADLSPTTNDVMNMYIDLILNDVF		938
Sc_Ph081	1024	EHERFLRHSGSGSMRQIVFSSCNWEACSIILNWKQPNFPVLLQMKNLLR---DSTTGKFGVGDTP		1083
Cg_Ph081	975	SNERYLKSTTN-HSRSLVFSGCCWEVCATLNWKQPIFPVFLKFDNLVSVYDPESSTECYKYDTA		1037
Op_Ph081	939	THVRGLRVQGN-RNRSLLILSSDNAMVCTIILNWKQPNYPVFNINGIKYFNFDTHRFEPCTANGFP		1001
Sc_Ph081	1084	NCLKELAVNPQK-----MSYLNTELINIHMTMVQFAMNNLLGVTLPEYV		1127
Cg_Ph081	1038	HHILDLVQNQEE-----YKKL-IKKIDIFGMVKFAIKSHLLGLLPEKL		1080
Op_Ph081	1002	TGSVDVSEAEKPDLKIDNIDSINKDSVVYLNLDLQYQDKLTRSIKLGTAFATTNNLGIIVPNSV		1065
Sc_Ph081	1128	LKICPSLARIKQNGLLLIASVGE-----NDQIPADGGYSGIYACELLFENNIDM		1178
Cg_Ph081	1081	LHICDVTVDVSIKRGKLLVLSFSDSP-----INEAEKELNANGVSDEDEIIFLKSGLDKNLML		1137
Op_Ph081	1066	LSICPDLVKSRSNGLLVLVASKNDDETHAEFGGLEKSRDHDIIVNGLRFNLDLSEFKDAIDM		1128

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Pho81 proteins in three yeast species.

The amino acid sequences of the Pho81 protein in *S. cerevisiae* (Sc\_Ph081), *C. glabrata* (Cg\_Ph081) and *O. polymorpha* (Op\_Ph081) were aligned by Clustal Omega. The minimum domain of ScPho81 is denoted by a box. The mutation point in each *Op-PHO81<sup>C</sup>* mutant is indicated by an asterisk.

*PHO51* と *PHO53* は PHO 経路での *PHO81* の上流で働く

PHO 経路における *PHO51* および *PHO53* 遺伝子の位置を決定するために, *Oppho81* 変異と *pho51* 変異あるいは *pho53* 変異との上位下位の関係を調べた. *pho51* 変異が *Oppho81* 変異に対して上位である場合, *pho51* *Oppho81* 二重変異体は  $\text{Pho}^c$  表現型を示す. 逆の場合, すなわち, *Oppho81* 変異が *pho51* 変異に対して上位である場合, 二重変異体は低リン酸条件下でも  $\text{Pho}^c$  表現型を示すはずである. そこで, NY-1 (*Oppho81*) および C5 (*pho51*) を交雑して四分子分析を行った. Table 5 に示すように, 四分子は低リン酸条件下で APase 生産の 2+:2- 分離パターンのみを示したが, 高リン酸条件下で 1+:3- (テトラ型) や 0+:4- (非両親型) が観察され, *Oppho81* 変異が *pho51* 変異に対して上位であることがわかった. *pho53* 変異 (AP3) でも, *Oppho81* 変異体との交雑二倍体の四分子分析は *pho51* 変異と同様の  $\text{Pho}$  表現型分離パターンを示した. したがって, *Oppho81* 変異との上位下位試験の結果は, PHO 経路において *PHO51* と *PHO53* の両方が *OpPHO81* の上流で作用することを示唆している.

## 考 察

*S. cerevisiae* では PHO 経路における調節遺伝子機能について多くの情報が数十年にわたり蓄積されており, PHO 経路は遺伝子発現調節ネットワークを研究するための最良のモデル系の1つである. 本研究では, 1億年以上前に *S. cerevisiae* から分岐したメタノール資化酵母 *O. polymorpha* (Dujon *et al.*, 2004) に焦点をあて, その PHO 経路を遺伝学的に解明した. 比較ゲノム解析および突然変異体分析によって, *O. polymorpha* の PHO 経路には4つの遺伝子 (*OpPHO81*, *OpPHO80*, *OpPHO85* および *OpPHO4*) が関与していることを確認した. *Op-*

*PHO81* 遺伝子は *S. cerevisiae* の *pho81* 変異を相補し, *S. cerevisiae* と同様の優性の構成性 *OpPHO81<sup>c</sup>* 変異が単離された. *Oppho81* 変異と *Oppho80* 変異あるいは *Oppho85* 変異との上位下位関係も *O. polymorpha* の PHO 経路において保存されていた. さらに, *Oppho4* 変異は *Oppho80* 変異と *Oppho85* 変異の両方に対して上位であった. そして, 各調節遺伝子の突然変異体における高リン酸条件および低リン酸条件の両方で APase 遺伝子 (*PHO1*) の発現を定量的リアルタイム PCR で調べた結果, *O. polymorpha* の APase 生産も PHO 経路によって転写レベルで調節されていることを確認できた (Table 3). したがって, 子囊菌酵母の進化過程における全ゲノム重複以前に *S. cerevisiae* と分岐したにもかかわらず, PHO 経路の主要な調節因子は *O. polymorpha* においても保存されていることが明らかになった.

*O. polymorpha* の PHO 経路を明らかにしたことで, リン酸飢餓応答システムの進化的過程を推論することができる. PHO 経路の主要コア部分は, 子囊菌門のいくつかの種において保存されているか, または部分的に保存されている. 例えば, Kerwin & Wykoff (2009) によれば, サイクリン-CDK-CKI ( $\text{Pho80-Pho85-Pho81}$ ) 複合体は *S. cerevisiae* とゲノム重複以降に分岐した系統的に近い *C. glabrata* において保存されている. また, アカパンカビ *N. crassa* のリン酸飢餓応答でも, *PHO4*, *PHO80*, *PHO85* および *PHO81* に対応する4つの調節遺伝子 *nuc-1*, *preg*, *pgov* および *nuc-2* が働いている (Kang & Metzberg, 1990; Littlewood *et al.*, 1975; Toh-e & Ishikawa, 1971). *S. cerevisiae* の経路と同様に, NUC-2 タンパク質は PREG-PGOV 複合体の機能を阻害し, それにより Pi 欠乏条件下で NUC-1 の核内への移行を促進する (Gras *et al.*, 2009). 一方, コウジカビの一種 *A. nidulans* では, AnPho80 と AnPho4 はそれぞれ PHO 経路において期待される負の役割および正の役割を果たしているが,

**Table 5** Epistasis analysis between the *Oppho81* mutation and the *pho51* or *pho53* mutation

Cross	Segregation of APase phenotype in tetrad					
	High-Pi	----	+---	++--	+++--	
	Low-Pi	++++	+++--	++--	+++--	
<i>Oppho81</i> × <i>pho51</i> (C5)		1	23	5	0	0
<i>Oppho81</i> × <i>pho80</i> (AP2)		0	0	9	25	5
<i>Oppho81</i> × <i>pho53</i> (AP3)		2	10	0	0	0

The phenotype was confirmed by staining assay. + and - indicate, respectively, ability and inability to produce APase. C5, AP2 and AP3 are mutants of *PHO51*, *PHO80* and *PHO53*, respectively, whose  $\text{Pho}^c$  phenotype was confirmed to be tightly linked to the mutations by tetrad analysis.



Pho81 と Pho85 の最も可能性のあるホモログは PHO 経路に関与していない (Wu *et al.*, 2004). *S. cerevisiae* とは最も古く進化的に分岐している分裂酵母 *S. pombe* は *PHO81* のホモログを持たず、*PHO80* と *PHO85* のホモログは APase 生産の調節に関与していないようである (Henry *et al.*, 2011). さらにもっと古い時代に分岐した系統的に遠い関係にある担子菌門の日和見病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* では PHO 経路の主要コア調節因子が保存されていることがわかっている (Toh-e *et al.*, 2015). したがって、真菌の共通祖先には PHO 経路の主要コア調節因子サイクリン-CDK-CKI 複合体と転写活性化因子が存在していた可能性が高いと思われる。しかし、いくつかの種は進化の過程でこれらの構成要素を他のタイプのシステムに変更したと考えられる。

*pho51* および *pho53* 変異体の Pho<sup>c</sup> 表現型は *OpPHO81* 遺伝子機能に依存するため、PHO 経路での *PHO51* および *PHO53* の作用位置は *OpPHO81* の上流に位置すると推測される。現在、*PHO51* は *O. polymorpha* YCp 型ベクターを利用した *O. polymorpha* ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングおよび Iida *et al.* (2014) が報告した全ゲノム配列のバイオインフォマティクス分析によってイノシトール 1,3,4,5,6-ペンタキスリン酸 2-キナーゼ遺伝子 *IPK1* であることがわかっている (未発表) が、*PHO53* 遺伝子の機能は不明のままである。*S. cerevisiae* で報告されている劣性構成性変異となる *PHO81* の上流に位置する遺伝子には次のような遺伝子がある：リン酸輸送系の機能に必要とされる *PHO84*, *PHO86* および *PMA1* (Ueda *et al.*, 1975; Lau *et al.*, 1998)；イノシトールピロリン酸の合成に関与する *PLC1*, *ARG82* および *KCS1*；アデニル酸キナーゼをコードする *ADK1* (Auesukaree *et al.*, 2005)。したがって、*PHO53* はリン酸輸送またはイノシトールピロリン酸合成に関与するタンパク質をコードしている可能性が高い。さらに、アセチル-CoA カルボキシラーゼをコードする *ACC1* または Rpd3L ヒストン脱アセチル化酵素複合体の成分をコードする *PHO23* のいずれかの破壊も構成的 APase 活性を示し、*PHO81* 依存性であることが報告されている (Lau *et al.*, 1998)。したがって、*PHO53* は、同様の細胞機能に関与するタンパク質の遺伝子かもしれない。これら *PHO51* (*IPK1*) と *PHO53* の詳細な分析は、*O. polymorpha* だけでなく、他の酵母においても PHO 経路のより深い理解につながるだろう。さらに、*S. cerevisiae* の PHO 経路のイノシトールピロリン酸にまつわる未解決の問題に手がかりを与えるかもしれない。

すでに紹介したように *S. cerevisiae* では、ScPho81 CKI によってリン酸濃度に応じた ScPho80-ScPho85 複合体のキナーゼ活性の調節が行われる (Ogawa *et al.*,

1995; Schneider *et al.*, 1994)。ScPho81 CKI は ScPho80-ScPho85 と常に会合している (Schneider *et al.*, 1994)。小分子リガンド IP7 は、この ScPho80-ScPho85-ScPho81 複合体と非共有結合的に相互作用し、基質となる転写活性化因子 ScPho4 が ScPho85 キナーゼの活性部位へ接近することを妨げる (Lee *et al.*, 2007, 2008)。ScPho81 の「最小ドメイン」(Fig. 3 参照) と呼ばれるドメインは、ScPho4 標的への ScPho80-ScPho85 のキナーゼ活性および IP7 との相互作用の両方を阻害するために必要である (Ogawa *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2008)。ScPho80 には ScPho4 および ScPho81 に結合するための 2 つの領域がある (Huang *et al.*, 2007)。ScPho81 と OpPho81 のアミノ酸配列の整列結果は、最小ドメインが両 Pho81 タンパク質でよく保存されていることを示している (Fig. 3)。したがって、OpPho81 は ScPho81 と同様に OpPho80-OpPho85 複合体に結合でき、IP7 によって活性化される可能性がある。実際、*OpPHO81* 遺伝子は Table 4 に示すように、*S. cerevisiae pho81Δ* 細胞において CKI として機能することができる。一方、*OpPHO81<sup>c</sup>* 対立遺伝子の突然変異点は N 末端に位置するだけでなく最小ドメインおよび C 末端にも存在する。変異型 Pho81<sup>c</sup> は野生型 Pho81 より Pho80-Pho85 キナーゼとの強い結合をもたらし、野生型 Pho81 と競合して高リン酸条件下でも Pho80-Pho85 キナーゼ活性を阻害すると考えられる。今後のタンパク質構造データおよび詳細な生化学分析を用いた、IP7 および Pho81 による Pho80-Pho85 キナーゼ調節の詳細なメカニズムの解明が期待される。

以上をまとめると、*S. cerevisiae* で同定された PHO 経路の主要調節因子は進化の過程で全ゲノム重複が生じる前に分岐したメタノール資化酵母 *O. polymorpha* でも保存されていた。さらに、CKI-サイクリン-CDK 調節システムは、酵母の PHO 経路の基本的なタイプであるようである。

## 要 約

真核生物における遺伝子発現調節系の多様性および進化のより良い理解を得るために、近年複数の酵母でリン酸シグナル伝達 (PHO) 経路が研究されている。本研究では、酵母における PHO 経路の多様性および進化についての情報を得るために、*Saccharomyces cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* からは系統的に離れていて遺伝学的に扱いやすい *Ogataea polymorpha* の PHO 経路を調べた。*O. polymorpha* BY4329 の注釈付きドラフトゲノム情報を利用して、いくつかの *pho* 遺伝子欠損突然変異体を作製した。*Oppho2* 欠損突然変異体を除いて、これらの突然変異体は対応する *S. cerevisiae* 突然変異体

と同じ抑制性酸性ホスファターゼ (APase) 生産性を示した。次に, *Oppho80* および *Oppho85* 突然変異体が *Oppho81* 突然変異の抑圧変異体として単離でき, さらに *Oppho4* 変異体が *Oppho80* および *Oppho85* 突然変異の抑制変異体として得られた。 *O. polymorpha* の PHO 経路のより完全な構成因子を網羅するために, UV 照射処理によって APase を構成的に発現する突然変異体を分離し, 遺伝解析を行った。その結果, 3 種類の劣性構成的変異および 1 つの優性構成的変異が得られた。そして, 劣性構成的突然変異の 1 つは *Oppho80* の対立遺伝子であり, 優性突然変異が *Oppho81* の対立遺伝子であることがわかった。 *Oppho81* 変異と 2 つの未知の劣性構成的変異 (*pho51* と *pho53* と命名) との間の上位下位試験は, *PHO51* と *PHO53* が PHO 経路の *Oppho81* の上流で機能することを示唆した。これらの結果をまとめると, *S. cerevisiae* で同定された PHO 経路の 4 つの主要構成因子は, 全ゲノム重複が生じる前に分岐したメタノール資化酵母 *O. polymorpha* においても保存されていると結論できる。この知見は酵母における PHO 経路の進化の研究に有用な情報となる。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 金子嘉信. 2012. 酵母におけるリン酸シグナル応答機構の進化—メタノール資化酵母の場合, シンポジウム酵母の生存戦略から学ぶ—環境応答機構と産業利用—, 第 65 回日本生物工学会大会, 9 月, 広島。
- 2) 結川直哉, 中塚比呂記, 周 瑩, 中西洋一, 前川裕美, 金子嘉信, 原島 俊. 2012. Genetic identification of the component genes in the phosphate signal transduction pathway in *Hansenula polymorpha*. 第 35 回日本分子生物学会年会, 12 月, 福岡。
- 3) Zhou, Y., Yuikawa, N., Nakatsuka, H., Maekawa, H., Harashima, S. & Kaneko, Y. 2013. PS11-11 Genetic identification of the component genes in the phosphate signal transduction pathway of *Hansenula polymorpha*. 26th International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology, August, Frankfurt, Germany.

### 原著論文

- 1) Zhou, Y., Yuikawa, N., Nakatsuka, H., Maekawa, H., Harashima, S., Nakanishi, Y. & Kaneko, Y. 2016. Core regulatory components of the PHO pathway are conserved in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **62**: 595-605.

## 保存機関に寄託した微生物株

*Opataea polymorpha* KYC638 (BY19512), KYC1389 (BY19536), KYC1390 (BY19537), KYC1404 (BY19538),

NY-1 (BY19539), H76-1B (BY19540), YZS216 (BY19541), YZS28 (BY19542), YZS135 (BY19543) を NBRP 酵母遺伝資源センター (分担機関; 大阪大学工学研究科生命先端工学専攻) に寄託した。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成で行われたもので, ここに感謝の意を表します。そして, 本研究は博士研究員の周 瑩さん, 大学院博士前期課程の中塚比呂記さんと結川直哉さんの協力のもとに実施しました。また, プラスミド pREMI-Z は阪井康能京都大学教授から, 一部の菌株とプラスミドは National BioResource Project Japan (YGRC/NBRP) から分与してもらいました。あらためて感謝します。

## 文 献

- Auesukaree, C., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y. & Harashima, S. 2005. Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**: 25127-25133.
- Creasy, C.L., Madden, S.L. & Bergman, L.W. 1993. Molecular analysis of the *PHO81* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1975-1982.
- Dujon, B. 2010. Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 512-524.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G. *et al.* 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.
- Estill, M., Kerwin-Iosue, C.L. & Wykoff, D.D. 2015. Dissection of the PHO pathway in *Schizosaccharomyces pombe* using epistasis and the alternate repressor adenine. *Curr. Genet.* **61**: 175-183.
- Gras, D.E., Silveira, H.C., Peres, N.T., Sanches, P.R., Martinez-Rossi, N.M. & Rossi, A. 2009. Transcriptional changes in the nuc-2A mutant strain of *Neurospora crassa* cultivated under conditions of phosphate shortage. *Microbiol. Res.* **164**: 658-664.
- Henry, T.C., Power, J.E., Kerwin, C.L., Mohammed, A., Weissman, J.S., Cameron, D.M. & Wykoff, D.D. 2011. Systematic screen of *Schizosaccharomyces pombe* deletion collection uncovers parallel evolution of the phosphate signal transduction pathway in yeasts. *Eukaryot. Cell* **10**: 198-206.
- Huang, K., Ferrin-O'Connell, I., Zhang, W., Leonard, G.A., O'Shea, E.K. & Quioco, F.A. 2007. Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol. Cell* **28**: 614-623.
- Iida, N., Yamao, F., Nakamura, Y. & Iida, T. 2014. Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole-genome sequence. *Genes Cells* **19**: 517-527.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Robert, T. & O'Shea, E.K. 1994. Phosphorylation of the transcription factor Pho4 by a cyclin-CDK complex, Pho80-Pho85. *Science* **263**: 1153-1156.
- Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., Huang, L.S. & O'Shea,

- E.K. 1998a. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**: 482–486.
- Kaffman, A., Rank, N.M. & O’Shea, E.K. 1998b. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* **12**: 2673–2683.
- Kang, H.-J., Chang, M., Kang, C.-M., Park, Y.-S., Yoon, B.-J., Kim, T.-H. & Yun, C.-W. 2014. The expression of *PHO92* is regulated by Gcr1, and Pho92 is involved in glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **60**: 247–253.
- Kang, S. & Metzberg, R.L. 1990. Molecular analysis of *nuc-1+*, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5839–5848.
- Kerwin, C.L. & Wykoff, D.D. 2009. *Candida glabrata* PHO4 is necessary and sufficient for Pho2-independent transcription of phosphate starvation genes. *Genetics* **182**: 471–479.
- Lau, W.-T. W., Schneider, K.R. & O’Shea, E.K. 1998. A genetic study of signaling processes for repression of *PHO5* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**: 1349–1359.
- Lee, Y.S., Huang, K., Quioco, F.A. & O’Shea, E.K. 2008. Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat. Chem. Biol.* **4**: 25–32.
- Lee, Y.S., Mulugu, S., York, J.D. & O’Shea, E.K. 2007. Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science* **316**: 109–112.
- Littlewood, B.S., Chia, W. & Metzberg, R.L. 1975. Genetic control of phosphate-metabolizing enzymes in *Neurospora crassa*: relationships among regulatory mutations. *Genetics* **79**: 419–434.
- Ljungdahl, P.O. & Daignan-Fornier, B. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**: 885–929.
- Maekawa, H. & Kaneko, Y. 2014. Inversion of the chromosomal region between two mating type loci switches the mating type in *Hansenula polymorpha*. *PLOS Genet.* **10**: e1004796.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Ogawa, N., Noguchi, K., Sawai, H., Yamashita, Y., Yompakdee, C. & Oshima, Y. 1995. Functional domain of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 997–1004.
- Orkwis, B.R., Davies, D.L., Kerwin, C.L., Sanglard, D. & Wykoff, D.D. 2010. Novel acid phosphatase in *Candida glabrata* suggests selective pressure and niche specialization in the phosphate signal transduction pathway. *Genetics* **186**: 885–895.
- Oshima, Y. 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **72**: 323–334.
- Partow, S., Siewers, V., Bjorn, S., Nielsen, J. & Maury, J. 2010. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**: 955–964.
- Phongdara, A., Merckelbach, A., Keup, P., Gellissen, G. & Hollenberg, C.P. 1998. Cloning and characterization of the gene encoding a repressible acid phosphatase (*PHO1*) from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 77–84.
- Schneider, K.R., Smith, R.L. & O’Shea, E.K. 1994. Phosphate-Regulated inactivation of the kinase Pho80-Pho85 by the CDK inhibitor Pho81. *Science* **266**: 122–126.
- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Meth. Enzymol.* **194**: 3–21.
- Toh-e, A. & Ishikawa, T. 1971. Genetic control of the synthesis of repressible phosphatases in *Neurospora crassa*. *Genetics* **69**: 339–351.
- Toh-e, A., Ohkusu, M., Li, H.M., Shimizu, K., Takahashi-Nakaguchi, A., Gono, T., Kawamoto, S., Kanasaki, Y., Yoshikawa, H. & Nishizawa, M. 2015. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* **80**: 19–30.
- Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S. & Oshima, Y. 1973. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **113**: 727–738.
- Ueda, Y., Toh-e, A. & Oshima, Y. 1975. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **122**: 911–922.
- van Dijk, R., Faber, K.N., Hammond, A.T., Glick, B.S., Veenhuis, M. & Kiel, J.A. 2001. Tagging *Hansenula polymorpha* genes by random integration of linear DNA fragments (RALF). *Mol. Genet. Genomics* **266**: 646–656.
- van Zutphen, T., Baerends, R.J., Susanna, K.A., de Jong, A., Kuipers, O.P., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* **11**: 1.
- Wolfe, K.H. & Shields, D.C. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708–713.
- Wu, D., Dou, X., Hashmi, S.B. & Osmani, S.A. 2004. The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. *J. Biol. Chem.* **279**: 37693–37703.
- Yadav, K.K., Singh, N. & Rajasekharan, R. 2016. Responses to phosphate deprivation in yeast cells. *Curr. Genet.* **62**: 301–307.



# 平成27年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成27年 4 月～平成29年 3 月



混合栄養生物としての能力を持つ放線菌の  
系統的分布範囲と生理特性の解明、  
および独立栄養に着目した新規な  
放線菌系統群の探索

菅野 学

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門  
manabu-kanno@aist.go.jp

目的：近年の膨大なゲノム情報の探索結果から、一酸化炭素および水素の好氣的酸化に関わる遺伝子を持つ微生物株の多くが放線菌に属することが明らかとなった。放線菌の多くは、異なる環境に適応するために従属栄養性と独立栄養性の両方の基礎代謝様式を備えた混合栄養生物の可能性がある。本研究は、混合栄養生物としての能力を持つ放線菌の系統的分布範囲や生理特性を明らかとし、さらに環境中から新規な放線菌系統群を分離することを目的とした。

方法：まず、公共データベースの登録ゲノム情報から、放線菌の炭酸固定および一酸化炭素酸化、水素酸化に関わる各遺伝子（リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼの大サブユニットの遺伝子 *cbbL*、一酸化炭素デヒドロゲナーゼの大サブユニットの遺伝子 *coxL*、高親和性水素酸化酵素の大サブユニットの遺伝子 *hhyL*）の保有情報を系統的に万遍なく調査した。属レベルでゲノムが未解読の放線菌系統に関しては、国内菌株保存機関から各属の基準種の基準株の抽出 DNA から縮重プライマーを用いて PCR 試験を行った。次に、複数の *Streptomyces* 株のゲノム解読と、ガス消費能の試験、独立栄養条件での生育試験を行った。さらに、気相に二酸化炭素、一酸化炭素、水素を充填して無機栄養のみを添加した集積ボトル中で土壌試料を 60 日間馴養して集積株の分離と分子生態解析を行った。

結果・考察：2016 年秋の時点で *Actinomycetales* 目に属する 310 属のうち、ゲノム配列が既に解読されている 212 属とゲノム未解読の 54 属を調べた結果、系統的に偏りなく、*Streptomyces* 属、*Mycobacterium* 属、*Rhodococcus* 属、*Pseudonocardia* 属、*Amycolatopsis* 属、*Actinoplanes* 属等

を含む約 20 以上の属で炭酸固定遺伝子が検出された。*cbbL*、*coxL*、*hhyL* の全遺伝子を持つ *Streptomyces thermocarboxydovorans* において、一酸化炭素や大気水素の消費と、有機物の無い環境での二酸化炭素濃度に応じた菌体増殖を確認した。また、*Streptomyces* 属では、栄養に乏しい環境で胞子の状態で存在するときに高親和性水素酸化活性が確認され、これら菌株は有機物以外の大気成分からも炭素源やエネルギー源を獲得する機構を持つ可能性が示唆された。無機ガスの馴養処理によって、採取時の試料や通常大気下での馴養試料とは異なる微生物叢への集積は見られたものの、独立栄養の希少系統群を効率的に獲得するには至らず、平板培養の条件にさらなる工夫が必要と考えられた。

主に人工培地上での従属栄養のふるまいを中心に発展したこれまでの放線菌研究に対して、本取組みは混合栄養生物として放線菌を捉えなおす研究の端緒と位置づけられ、環境中の放線菌の素顔を解き明かすべく今後の進展が期待される。

コメツキモドキ酵母栽培共生系の  
進化と酵母の拮抗菌抵抗性の関係

土岐 和多瑠

京大大学生態学研究センター、  
現名古屋大学大学院生命農学研究所  
tokiw@agr.nagoya-u.ac.jp

目的：宿主が共生生物を育てて食べる栽培共生は多くの生物で見られる。中でも社会性昆虫と菌の栽培共生は最も発達しており、農耕と称され、多くの研究がなされてきた。一方、非社会性昆虫と菌の栽培共生は例が少なく、共生の実態解明や進化プロセスを扱った研究はごくわずかにとどまる。

ニホンホホビロコメツキモドキ *Doubledaya bucculenta* (鞘翅目オオキノコムシ科コメツキモドキ亜科) (以下ホホビロ) のメス成虫は、枯れた竹に孔を開け、空洞内に産卵すると同時に酵母 *Wickerhamomyces anomalus* を接種する。孵化した幼虫は、酵母を空洞全体に広げて農園

を作り、酵母を食べて成長し、空洞内で羽化する。農園には、幼虫の成長や酵母の増殖に負の影響を及ぼす非共生菌がしばしば侵入する。そのため、その増殖を抑えることは非常に重要である。面白いことに、酵母は抗菌活性を示し、幼虫が空洞全体に酵母を広げることで非共生菌の蔓延を防ぐ。

本研究は、コメツキモドキ-酵母栽培共生系の進化と酵母の拮抗菌抵抗性の関係を明らかにすることを目的とし、ホホビロ-酵母栽培共生系において、(1)農園で酵母のモノカルチャーが成立しているか、(2)酵母の拮抗菌抵抗性は共生系の維持に必須かを調べた。さらに、ホホビロとその近縁種において、(3)共生酵母の拮抗菌抵抗性の強さが異なるかを調べた。

方法：(1)2016年6月および9月に、宮崎県川南町にてホホビロ個体の存在するメダケ節間を採取し、空洞より菌の分離培養およびメタゲノム解析を行った。(2)ホホビロの農園由来の非共生菌4種 (*Arthrinium* 属菌1種, *Fusarium* 属菌2種, 未同定糸状菌1種)と酵母2種 (*W. anomalous*, パン酵母)をPDA培地上で対峙培養し、非共生菌の増殖の程度を調べた。同町産のホホビロ卵を無菌化して、孵化幼虫を得。前述の非共生菌と *W. anomalous* を与えて飼育した。(3)ホホビロと同系統の *D. ruficollis* および別系統に属する *D. ustulata* の共生酵母を用い、上記 *Arthrinium* 属菌と対峙培養して拮抗菌抵抗性を調べた。

結果・考察：(1)いずれの調査時期、実験方法においても *W. anomalous* が圧倒的に優占しており、モノカルチャーがほぼ達成されていることが強く示唆された。(2) *W. anomalous* は、パン酵母と比べて、いずれの非共生菌に対しても強い拮抗菌抵抗性を示した。孵化幼虫に非共生菌と *W. anomalous* を与えて飼育したところ、非共生菌の増殖が抑えられた。*Fusarium* 属菌を単独で餌として与えた場合と比較し、*W. anomalous* とともに与えた場合は生存率が著しく増加した。これらのことから、酵母の拮抗菌抵抗性は、本共生系の維持に極めて重要であることが強く示唆された。(3)拮抗菌抵抗性の強さは、*W. anomalous* > *D. ustulata* 共生酵母 > *D. ruficollis* 共生酵母

であった。*D. ustulata* 共生酵母は *W. anomalous* に近縁で、*D. ruficollis* 共生酵母は *Metschnikowia* 属酵母に近縁であった。これらのことは、*Doubledaya* 属の複数の系統で *W. anomalous* あるいはそのごく近縁な種が共生生物として採用されており、これは拮抗菌抵抗性の強さとコメツキモドキ-酵母栽培共生系の進化が密接に関係することを示唆する。

### ヒト腸内からの難培養性微生物の単離と その分類およびバイオリソース整備

坂本光央

理化学研究所バイオリソースセンター  
sakamoto@riken.jp

目的：近年のメタゲノムのアプローチにより検出されたヒト腸内の微生物のその多くがこれまでに未培養あるいは未同定の微生物(難培養微生物)である。本研究では、ヒト腸内から難培養性の微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行うことを目的とした。

方法：健康成人5名(30代男性・女性各1名, 40代男性1名・女性2名)から糞便を提供してもらい実験を実施した。菌株を分離するために、種々の血液寒天培地などを使用し、嫌気条件下で培養した。また、メンブランフィルター法の適用も試みた。分離された菌株の16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列(5'末端側:約500bp)を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。

結果・考察：5名から1,691株(サンプル1:322株, サンプル2:360株, サンプル3:212株, サンプル4:368株, サンプル5:429株)を分離した。*Bacteroides* 属や *Bifidobacterium* 属に属する菌種も数多く分離されたが、近年、宿主との健康の関連性について注目されている *Akkermansia muciniphila* のような既知種ではあるがユニークな菌種も分離された。分離株は総合で61種の分類群に分けられ、一人当たり26種(19種から33種)が検出された。該当菌株は理化学研究所バイオリソース



センター微生物材料開発室 (JCM) に寄託し、バイオリソースの整備を行った。また、16S rRNA 遺伝子配列の類似度の比較から新菌種であると考えられる 36 菌株も分離された。健康成人 1 名の糞便から中心がくぼんだ特徴的なコロニー形態を示す菌株 2 株が分離された。分離株 2 株はいずれも、偏性嫌気性、無芽胞のグラム陽性球桿菌であり、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、*Lachnospiraceae* 科内に既存の属とは独立したクラスターを形成した。最も近縁な菌種は *Eubacterium contortum* JCM 6483<sup>T</sup> であった (塩基配列の類似度が 95%)。この結果は *hsp60* 遺伝子配列の解析からも支持された。分離株 2 株と *E. contortum* JCM 6483<sup>T</sup> の主要な菌体脂肪酸 (>10%) は C<sub>18:1</sub> ω9c, C<sub>16:0</sub> および C<sub>18:1</sub> ω9c dimethyl acetal (DMA) であったが、分離株 2 株の菌体脂肪酸組成中の割合では C<sub>18:1</sub> ω9c が一番多いのに対して *E. contortum* JCM 6483<sup>T</sup> は C<sub>18:1</sub> ω9c DMA が一番多かった。また、分離株 2 株は *E. contortum* JCM 6483<sup>T</sup> と比較して硫化水素を産生し、エスクリンを加水分解する点などで異なっていた。分離株はグルコースからの代謝産物として酢酸を産生した。分離株 2 株はその特徴的なコロニー形態、16S rRNA 遺伝子、*hsp60* 遺伝子配列の解析結果、主要な菌体脂肪酸などから既知種とは異なっていると考えられた。以上の結果より、この 2 分離株を新属・新菌種 *Faecalimonas umbilicata* (基準株 EGH7 = JCM 30896) として命名提案した。現在、その他の新種候補株に対しても詳細な検討を行っている。

植物工場に発生する植物病原性  
*Plectosphaerella* 属菌の分類学的  
および植物病理学的研究

宇佐見 俊 行

千葉大学大学院園芸学研究科  
usami@faculty.chiba-u.jp

目的：植物工場では、植物の生育に影響を与える様々な因子を制御できるため、季節にかかわらず高品質の農産物を安定生産できる。また、栽培環境を衛生的に管理す

ることで、植物病害の発生を防ぐことができるとも言われている。ところが 2011 年に、日本国内の閉鎖型植物工場 (湛液型水耕栽培) で栽培されているレタスに、茎の基部が黒く変色して腐敗する病害が発生した。本病害は世界で初めて確認されたもので、その病原菌が *Plectosphaerella pauciseptata* とされたことから、プレクトスフェレラ腐敗病と命名された。その後、国内の異なる 3 県にある太陽光利用型植物工場においても本病害が発生した。本病害は、植物工場という新たな栽培環境に発生する新しい植物病害と考えられる。しかし、本病害を引き起こす病原菌に関する知見は極めて限られている。そこで、本病害を引き起こす *Plectosphaerella* 属菌の系統的範囲や生理的性質を明らかにし、防除のための基盤情報を得るために研究を行った。

方法：国内 3 県の太陽光利用型植物工場における罹病レタスおよびその水耕液から、病原菌を分離した。そして、分離された病原菌の形態的特徴を観察するとともに、PCR により rDNA-ITS 領域を増幅して塩基配列を決定した。また、国内で分離された *Plectosphaerella* 属の様々な分離株 (レタス以外からの分離株を含む) を、レタスの一品種であるサンチュの葉に接種して病原性を調査した。同様に、*P. pauciseptata* の 1 菌株を様々なレタス品種に接種し、病原性を調査した。さらに、pH を 4-8 に調整した PSA 平板培地に各菌株を植菌して培養し、コロニー直径を計測した。

結果・考察：国内 3 県に発生した罹病レタスおよびその水耕液からは、フィアライド上に単胞もしくは 2 胞の紡錘形の分生子を擬頭状に形成する *Plectosphaerella* 属菌と思われる糸状菌が高率に分離された。これらを形態および遺伝的特徴より同定したところ、当初病原菌として報告されていた *P. pauciseptata* のほか、*Plectosphaerella cucumerina* および *Plectosphaerella plurivora* が含まれることが明らかとなった。水耕液から分離された糸状菌は、そのほとんどが *Plectosphaerella* 属菌と、同じくレタスに腐敗性病害を引き起こす *Gibellulopsis nigrescens* であった。このように、植物工場の水耕栽培では、栽培植物を加害して増殖する植物病原菌が優占的に増殖する傾

向にあった。これは、衛生的に管理される植物工場では、病原菌の増殖を抑える競合的微生物が少ないためと思われる。一方、*Plectosphaerella* 属の様々な菌株をレタスに接種した結果、*P. pauciseptata*, *P. cucumerina*, *P. plurivora* のほか、*Plectosphaerella delsorboi* や、新種の可能性のあるカラー斑点病菌などの幅広い系統がレタスに病原性を示した。さらに、レタスの様々な品種に対する接種試験では、いずれの品種も等しく感受性を示した。以上の結果より、*Plectosphaerella* 属の幅広い菌が様々なレタス品種を加害する可能性が明らかとなった。また、*P. pauciseptata*, *P. cucumerina*, *P. plurivora* の菌株は pH が低くなるにつれて PSA 平板上のコロニー直径が小さくなる傾向が認められ、特に pH 4 では生育が顕著に抑制された。従って、水耕液の pH を調整することで本病害を防除できる可能性が示された。

### 水田土壌の微好気性鉄酸化細菌の特性 および生態に関する研究

渡 邊 健 史

名古屋大学大学院生命農学研究科  
watanabe@agr.nagoya-u.ac.jp

目的：水田土壌の鉄酸化反応は非生物的反応が主反応と考えられ、生物的鉄酸化反応はこれまでほとんど考慮されてこなかった。本研究では、水田土壌より初めて分離した微好気性鉄酸化細菌の特性を解明するとともに、水田土壌中の微好気性鉄酸化細菌の群集構造を解析し、生物的鉄酸化反応の理解に向けた知見を得ることを目的とした。

方法：愛知県農業総合試験場の水田(安城)より採取した土壌より分離した微好気性鉄酸化細菌 An22 株の生理的性質を解析した。また、安城および東北農業研究センター大仙研究拠点内の水田の土壌中の微好気性鉄酸化細菌の群集構造を解析した。最初に湛水条件で鉄が十分に還元するまで前培養した土壌をガラスチューブに移し、窒素雰囲気下、暗所で静置培養した。その際、わずかに酸素透過性を示す合成ゴム栓で密閉することで徐々に微好気

条件を作り出し、土壌表面に鉄酸化物を沈着した細菌コロニーを形成させた。そのコロニーを接種源として、試験管の底に沈めた硫化鉄により酸素と二価鉄の対称濃度勾配を形成させた軟寒天無機塩培地で培養し、至適部位にて鉄酸化物の形成とともに増殖した菌を純化して An22 株を得た。群集構造解析には、湛水前、湛水後、中干し中、再湛水後および落水後に採取した土壌を供試した。還元状態の指標として土壌中の活性二価鉄量を測定するとともに土壌より DNA を抽出し、*Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした qPCR、PCR-DGGE 解析を行った。

結果・考察：An22 株は還元鉄を酸化して生育する湾曲した桿状のグラム陰性細菌であり、ルビスコ活性を持つ独立栄養細菌であった。12-37°C、pH 5.2-6.8 の範囲で生育し、水田環境での生育に適していると考えられた。主な菌体脂肪酸組成は C<sub>16:0</sub>、C<sub>16:1</sub>、C<sub>18:1</sub>、キノン種は Q-10 と Q-8 であった。16S rRNA 遺伝子は *Gallionellaceae* 科の微好気性鉄酸化細菌に最も近縁であったが、既知菌株との相同性の低さ(<95%)やその他の特性を考慮すると、An22 株は新規分類群に属すると考えられた。培地中では溶存酸素濃度が 4 μM 以下の部位でバンド状に生育したことから、水田土壌中でも酸化還元境界層で働くことが示唆された。

群集構造解析の結果、土壌 1g 当たり 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> コピーの 16S rRNA 遺伝子が検出され、水稲栽培期と非栽培期を区別すると、一部圃場を除いて土壌中の活性二価鉄量とコピー数の間に有意な負の相関関係が見られた。また DGGE 解析により、微好気性鉄酸化細菌である *Gallionella* や "*Sideroxydans*", An22 株に近縁な菌を含む多様な菌が生息することが示唆され、その群集構成は湛水や中干しに伴い大きく変化した。以上より、水田土壌中の鉄酸化反応には多様な *Gallionellaceae* 科の微好気性鉄酸化細菌が関与し、土壌の酸化還元状態の変化に伴い反応に関与する菌の群集構成が変化することが示唆された。

### プロファージによる細菌細胞分化における 遺伝子再構築機構の獲得と進化

佐藤 勉

法政大学生命科学部  
t-sato@hosei.ac.jp

目的：溶原性ファージは自らのDNAを宿主ゲノムに組み込むタイプのファージである。このファージが宿主ゲノムの遺伝子をコードする領域に組み込まれるとその遺伝子が破壊され、機能が失われる。我々は、枯草菌のSPβプロファージ及び欠損プロファージにより分断されている *spsM* 遺伝子及び *sigK* 遺伝子が、細胞が分化する胞子形成期にそれぞれ異なるセリン型の部位特異的組換え酵素（LSR）により再構築されることを見出した。本研究は、このようなプロファージによる遺伝子再構築機構の獲得過程の解明を目指した。

方法：プロファージなどの介在因子によって遺伝子が分断されたゲノムを持つ細菌を公共ゲノムデータベースを用いて調べ、その遺伝子と介在配列の特徴を解析した。特に転写調節因子をコードする胞子形成遺伝子 *gerE* の再構築を行う *Bacillus cereus* の *gin* (*gerE* intervening) element 上の部位特異的組換え遺伝子ユニットに着目し、表現型、転写、精製酵素による *in vitro* 組換え実験を行なった。また、遺伝子内の標的部位 (*attB*) に溶原化するファージの特徴を調べるために、枯草菌を用いた特定の標的部位に溶原化するファージスクリーニング系 (*Pxyl-attB-mazF*) を構築し、ファージの探索を行なった。ファージが溶原化した細胞は細胞毒素 MazF による致死を回避できることから選択が可能である。さらに、従来の標的部位とは異なる遺伝子内の部位に挿入したプロファージによる当該遺伝子の再構築を調べるため、SPβファージを用い *attB*<sub>SPβ</sub> を持たない宿主にSPβを溶原化させ、新たに獲得した secondary *attB* site の位置をシーケンシングにより解析した。

結果・考察：有胞子細菌の様々な胞子形成遺伝子が可動性因子により分断されていることが示された。このうちの1つ *B. cereus* の *gerE* は、約28kbのファージ関連遺

伝子を持たない介在配列 *gin* によって分断されていることが示された。また、*gin* 上の遺伝子がコードする GirC (487 aa) が胞子形成期の *gerE* 再編成に関与する LSR であること、この部位特異的組換えの補助因子として BCE\_4620 (42 aa) が必要であることを明らかにした。従って有胞子細菌の遺伝子再編成は LSR が介する組換えを用いている点では共通性を持つが、菌種によって対象遺伝子と介在配列が異なることが示された。一方、異なる溶原性ファージが同じ標的部位を認識する可能性も示唆された。このため環境中から特定の標的部位に溶原化するファージのスクリーニング系 (*Pxyl-attB-mazF*) を用いて、環境中から新規 SPβ 様ファージを得た。さらに、SPβ を *attB* を持たない宿主に溶原化させ、胞子形成関連遺伝子である *htrC*、*ylhN* を含む計18ヶ所の部位への挿入を確認した。これらの溶原化株は正確なファージの切り出しと遺伝子再構築ができないが、今後実験室進化系を組むことにより、正確な遺伝子再構築を行うまでの進化過程を追うことが可能となった。

### 浅海性無脊椎動物の体液に棲みつく 新奇ヘリコバクターの 分類学的・生態学的性状の解明

中川 聡

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

目的：浅海性無脊椎動物の体内を満たす体液（血リンパ）は、貪食能を有する体腔細胞や様々な抗菌物質の宝庫であることから、当然のように無菌的であると考えられてきた。しかし、我々は様々な浅海性無脊椎動物の体液を調査し、特異な種類の微生物が普遍的に検出されることを見出してきた。本研究では、特にヒトデ類の体液中に発見したヘリコバクター近縁微生物に注目し、培養法と分子生物学的手法を用いて、その分類学的、生理生態学的、進化的性状を解析した。

方法：ヒトデ類の血リンパ中における培養可能な微生物の密度・多様性を解析するため、ヘリコバクター選択培

地（海水ベースあるいは血リンパそのものをベースに用いた）をはじめとする数種類の寒天培地を用いて、アネロバックによる好気条件下かつ複数の温度で培養を行った。形成されたコロニーを純化後、分離株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行った。さらに、試料から培養を経ずに直接抽出したDNAを用いて、次世代シーケンサーによる16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析やメタゲノム解析を行った。加えて、これらの結果に基づき、特徴的な微生物について定量PCRやFISH法、電子顕微鏡観察、宿主の飼育実験によって、それらの存在量・局在性・形態等を解析した。

**結果・考察：**まず培養法を用いた解析では、合計250株以上の微生物株を取得し、分離株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行ったが、残念ながら分離株の中にヘリコバクター近縁微生物は含まれていなかった。しかし系統学的に特徴的な複数の新規微生物株（少なくとも新種もしくは新属）を取得することに成功するなど、本培養実験により、多様かつ培養可能な微生物群が浅海性無脊椎動物の体液中に棲息していることが明らかとなった。次に次世代シーケンサーを用いた解析を実施し、ヒトデ類の体液中に棲息する微生物の群集構造を解析した。微生物群集構造は、試料の採取地点やヒトデの種類、さらには個体差の影響を受け、大きく変化することが明らかとなった。試料のなかから、注目してきたヘリコバクター近縁微生物を多く含むものを選択し（リードの割合で最大97%以上がヘリコバクター近縁種となる試料を見出し、定量PCRでも確認した）、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法および電子顕微鏡観察により、当該微生物がらせん状の形態を有することを見出した。さらにメタゲノム解析を実施した結果、標的としていたヘリコバクター近縁微生物のゲノム情報がある程度取得することに成功した。本微生物は、“人類に最も蔓延した胃癌原因菌”として活発に研究されてきたヘリコバクターの進化に関する新しい知見を提供しうる存在であることから、データを詳細に解析しているところである。

担子菌アンズタケ類の生物学的特性解明：  
特に、種分類、生態的分化ならびに  
菌根構造について

山田明義

信州大学農学部  
akiyosh@shinshu-u.ac.jp

**目的：**アンズタケ類は、アンズタケ目カノシタ科に所属するアンズタケ属（*Cantharellus*）とクロラッパタケ属（*Craterellus*）で構成され、以前はアンズタケ科とされていた。このうちアンズタケ属は、2016年時点で約130種が有効種とされている。アンズタケ類は、外生菌根性で汎世界的であり、食用きのことしてはシャントレルとも呼ばれる。日本産アンズタケ類の有効種は13種と考えられるが、分類学的研究は過去30年あまり殆ど進展がなく、菌根に関する研究も殆ど知られていない。本研究は、日本国内のアンズタケ類に関する種分類と生態解明を目的とした。また、アンズタケ属の基準種である *Cantharellus cibarius* Fr. が日本産アンズタケに対して1908年以来一貫して充てられている点について、分子系統学的観点から精査することも本研究の目的とした。

**方法：**日本各地よりアンズタケ属とクロラッパタケ属の300点を超える子実体を収集しrDNA ITS2領域の分子系統解析を行った。また、子実体直下の菌根を採取し形態観察と分離操作を行った。

**結果・考察：**アンズタケ属で15クレード、クロラッパタケ属で9クレードを識別した。これは、日本産アンズタケ属既知種の約2倍、クロラッパタケ属では約1.5倍に相当する。このうちアンズタケ（*Cantharellus cibarius* s.l.）と同定されてきた子実体標本を精査した結果、それらは4種を含む複合種と判断され、アンズタケが最初に記載された長野県内の標本を基準に *Cantharellus anzutake* として新種記載した（論文投稿中）。この *Cantharellus anzutake* は、北海道渡島半島から沖縄県久米島まで分布していた。また、近年の研究から欧州固有種と考えられてきた *Cantharellus cibarius* s.s. が、北海道の北部と東部にも分布することを明らかにした。日本産ク

クラッパタケ属のクラッパタケには、これまで *Craterellus cornucopioides* が充てられてきたが、今回収集したクラッパタケ標本には孢子サイズのやや異なる3つの分子クレードが存在し、いずれも北米の *Craterellus flallux* に近縁な種であると考えられた。また、アキロウスタケにも3クレードが存在し、そのいずれもが、従来アキロウスタケに充てられてきた *Cantharellus cinereus* との相同性が低かった。これまでに確認したアンズタケ類の外生菌根は、黄土～橙色系のやや明るい色彩の菌鞘を形成することが多く、菌糸には多数の油滴が確認された。特に *Cantharellus anzutake* では、菌根から純粋培養株を得ることが比較的容易であった。得られた菌株の一部については、菌根合成法によりアカマツとの外生菌根形成を確認した。他の菌種では子実体と菌根の双方で分離培養に成功しなかったが、クラッパタケとトキクラッパタケでは、外生菌根チップを接種源としてマツ実生根系に外生菌根を再形成させることに成功した。

### 珪藻 DNA メタバーコーディング解析 による河川湖沼水質評価法の開発

佐藤 晋也

福井県立大学海洋生物資源学部  
ssato@fpu.ac.jp

目的：河川や湖沼の水質評価法には、物理化学的方法と生物学的な方法がある。前者が季節や日変動に左右されるのに対し、後者は調査水域の水質の平均的な情報を得ることができるという利点がある。珪藻は水質指標生物としてその有用性が確かめられており、その出現の有無や頻度にもとづき水質が評価されてきた。しかしその種同定には分類学的知識や経験といった専門性が要求され、また作業者の習熟度により得られる結果が変動するという欠点もある。本研究では次世代シーケンサーの使用によりこうした問題を回避し、誰にでも迅速かつ正確な同定が行える方法を開発することを目的とする。ただし、現段階では本邦産珪藻の種名と塩基配列情報が正しく整備された情報が極端に不足していることから、本研

究ではまずリファレンスデータベースの作成を試みた。また実際に次世代シーケンサーにより大規模データを取得し、網羅的な珪藻種同定法の確立へ向けた方法やその問題点の検討を行った。

方法：福井県の北川、南川、中池見湿地を調査区とし、それぞれ複数地点からサンプル採集を行った。サンプル中に含まれる珪藻類を顕微鏡下でキャピラリーピペットを用いて一細胞ずつ単離し、それらの培養、DNA抽出、*rbcl* 遺伝子の全長配列決定を行い独自のリファレンスデータベースを作成した。次にサンプル中の全DNA(環境DNA)の *rbcl* 3'末端領域をバーコード配列とし、次世代シーケンサーにより環境DNAに含まれるバーコード配列を網羅的に決定するDNAメタバーコーディング法により種組成を調べた。また各サンプルについて顕微鏡下で計数を行い、配列情報との比較も行った。

結果・考察：本研究で作成した単離培養株のうち半数程度のみ種名を決定することができた。また遺伝的に異なるが形態的には区別のできない「隠蔽種」の存在が複数の種で検出された。特に *Gomphonema parvulum* や *Achnanthes minutissimum* などの形態種からはこれまでも隠蔽種の存在が報告されていたが、本研究により更に新奇の隠蔽種が見つかった。次世代シーケンサーによる網羅的配列解析と顕微鏡による種組成計数との結果を比較した結果、必ずしも両者の結果は一致しなかった。例えば多くのサンプルにおいて *Achnanthes* 属は顕微鏡計数では大量に出現するにも関わらず次世代シーケンサー解析では極端に少なく見積もられた。一方 *Eolimna* 属由来の配列は次世代シーケンサーでは多くみられるものの、顕微鏡による計数では過少評価されがちであった。これは種によりDNA抽出効率の違いやPCR増幅効率等が異なり、また顕微鏡観察においてサイズが極めて小さい細胞は見落とされやすいためと考えられた。今後種組成が既知の集団を用い、DNA抽出および顕微鏡観察の条件を検討する必要がある。

### 有害元素代謝機構の多様性解析から 解き明かす微生物エネルギー代謝の進化

濱 村 奈津子

九州大学大学院理学研究院  
nhamascb@kyushu-u.org

目的：周期表第15族のヒ素とアンチモンは地殻の構成元素であり、原始地球から現在にいたるまで自然界に広く存在している有害元素である。あらゆる生物種の中で唯一微生物はこれら有害元素への耐性のみならず、エネルギー源として利用するより積極的な代謝機構も発達させてきた。特に微生物のヒ素代謝機構は多系統群に共有されており、嫌氣的な原始の地球でドメインに分化する以前に起源するエネルギー代謝ではないか、との仮説が提唱されている。しかし、これまでヒ素以外の有害元素の生物利用に関する知見は限られており、ヒ素と同族元素であるアンチモンの微生物利用についても未解明な部分が多い。そこで本研究では、原始の地球で生命体のエネルギー源となり得るアンチモンに着目し、微生物進化に関わる有害元素の影響に関する基礎的知見を得るために、新規アンチモン代謝菌群の分離培養による同定に取り組み、有害元素代謝機構の多様性分布を明らかにすることを目的とした。

方法：本課題では多様なアンチモン代謝菌群を探るため、高濃度アンチモンで汚染した鉱山土壌を接種源とし、酸素条件や炭素源等の異なる集積培養を実施した。アンチモン変換活性を示すコンソーシアを取得後、直接プレート法や希釈混合培養法を用いて分離培養した。得られた新規アンチモン代謝細菌群については分子系統学的に同定するとともに、アンチモンおよびヒ素の酸化還元代謝活性を誘導結合プラズマ発光分光分析法により測定した。

結果・考察：集積培養の結果、嫌気下で5価アンチモンを3価へと還元するコンソーシアを取得した。アンチモン還元の際に5価アンチモンの減少にともなって生成する3価アンチモンが溶液中からは検出されず、還元されたアンチモンは三酸化アンチモンとして析出することが

示された。本コンソーシアの構成細菌群を16S rDNA配列により同定したところ、ヒ素やその他金属の還元菌と系統的類似度の高い *Firmicutes* 門とともに、アンチモン酸化および還元菌として知られている *Sinorhizobium* に近縁な配列が検出された。さらに、その他の代謝機構として、嫌気下でアンチモン酸化を司る細菌の分離培養に成功した。この新規アンチモン酸化菌は、同族元素であるヒ素の酸化は行わないことから、これまでに報告のあるヒ素およびアンチモン酸化細菌とは異なる代謝機構を有すると考えられる。以上より、本研究では世界的にも数株の報告例のみである嫌氣的アンチモン酸化および還元細菌群の培養に成功し、アンチモン代謝機構は系統的・生理的に多様な細菌群に分布していることを明らかにした。また本成果は、有害元素の生物利用に関する新しい知見を提供するとともに、アンチモン生物変換を利用したバイオメタル生成や浄化技術への応用も期待できる。

### アルミニウム耐性とアルカロイド産生能から読み解く植物根内共生菌の多様性と共生関係の生態学的意義

広 瀬 大

日本大学薬学部  
hirose.dai@nihon-u.ac.jp

目的：菌類と植物根の共生関係は陸上生態系において普遍的にみられるが、本研究ではコアツツジ科植物をモデル系とした調査・実験を行った。コアツツジ科植物は *hair root* と呼ばれる細かい根を発達させることにより、その根圏でエリコイド菌根菌や根内生菌（以下、両者を合わせて根内生菌とよぶ）と共生関係を築いている。次世代シーケンサーの普及により根内生菌の多様性の実態は解明されつつあるが、根内生菌の多様性パターンと共生関係の機能との関連性に関しては殆ど分かっていない。本研究では、根内生菌のアルミニウム (Al) 毒性に対する耐性能と産生する二次代謝産物（特にアルカロイド）に着目し、生理生態学的特性と多様性パターンの関連性を探ることを最終的な目的とした。

方法：日本国内全域を網羅する47地点でコアツツジ科植物の根を採取，根内共生菌の分離を行った．各分離菌株は形態観察と28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列から種同定を行った．また各採取地土壌のpHと水溶性Al濃度の測定を行い，土壌環境の多様性を評価した．

根内共生菌のAl毒性に対する耐性能は，分離培養した2048株のうち228株を用い，pH3，Al<sup>3+</sup>濃度100mMに調整した栄養培地上での生育状態により評価した．さらに248菌株については二次代謝産物に関する化学分析を行った．PDB培地で液体培養後，酢酸エチルで抽出し，UPLCにより二次代謝産物のプロファイリングを行うと共に，ドラーゲンドルフ呈色反応によるアルカロイド産生能を評価した．

結果・考察：Al毒性に対する耐性能に関する実験の結果，各地で優占するズキンタケ綱において供試した株の29%でAl存在下でも良好な成長がみられることが明らかになった．また*Rhizoscyphus ericae*，*Phialocephala fortinii*，*Oidiodendron maius*に関しては同種内の株間で耐性能に相違があることも明らかになった．土壌分析の結果，鹿児島県野間岳で低pH（平均3.76）かつ高いAl濃度（平均137mg/100g d.w.）を示したが，この採取地で分離された菌株の中にはAl耐性のあるものが多数見られた．ツツジ科植物の多くはAl集積植物でないことが知られており，Al耐性のある根内共生菌によるAl毒性の緩和が行われている可能性がある．これらの事は，土壌中のAl濃度が根内共生菌の多様性パターンに影響を及ぼしていることを示唆している．

ドラーゲンドルフ呈色反応が陽性となった株は43菌株となり，分類群としては根内で優占することの少ないフンタマカビ綱で頻度が高かった．しかし，陽性株の系統的な偏りは比較的低く，同一属内であっても陽性株と陰性株が混在する傾向がみられた．これら陽性株のうち特に明瞭な呈色がみられた3株に関して化合物の同定を試みた．しかし，分子サイズが大きいため現在のところ未だ同定に至っておらず，分析は現在も進めている．今後それらの化合物の同定が終わり次第，既に完了しているUPLCプロファイルを利用して各菌株における対象

化合物の産生の有無を評価し，根内共生菌の多様性パターンとの関連性を議論する予定である．

MqsR-YgiT toxin-antitoxin system による  
バイオフィーム制御機構および  
バイオフィーム薬剤耐性機構の解明

山口良弘

大阪市立大学複合先端研究機構  
yamaguchi@ocarina.osaka-cu.ac.jp

目的：近年，原核生物において細胞死を制御するToxin-antitoxin (TA) system の存在が明らかとなってきた．MqsRは大腸菌のバイオフィーム形成促進因子として同定されたMqsR-YgiT TA system のtoxinである．予備実験において，MqsR-YgiT TA system によるバイオフィーム制御機構の存在が示唆された．本研究では，YgiTによるバイオフィーム形成促進機構，MqsRによるバイオフィーム内細胞死誘導機構さらにMqsR-YgiT TA system によるバイオフィームの薬剤耐性機構を解明し，バイオフィーム形成及び細胞死に係るTA system の役割を明らかにすることを目指した．

方法：*Escherichia coli* (大腸菌) MG1655  $\Delta$ araBAD/mqsR-ygiT( $\Delta$ 2) を作製し実験に用いた．運動性は軟寒天培地を用いて，バイオフィームはクリスタルバイオレット溶液で染色し測定した．Curli線毛の発現は，コンゴレッド寒天培地で培養後のコロニーの色から定性的に評価した．MqsRによるRNA分解は合成RNAを基質とし質量分析計で解析した．

結果・考察：MqsR，YgiTおよびMqsR-YgiTによる大腸菌の遊泳運動への影響を調べた．その結果，YgiTおよびMqsR-YgiTの発現は遊泳運動を増加させた．次にYgiTおよびMqsR-YgiTのバイオフィーム形成への影響を解析した結果，YgiTおよびMqsR-YgiTはバイオフィーム形成を促進した．ここで，バイオフィーム形成促進に関与する遊泳運動以外の因子としてcurli線毛に着目し解析した．その結果，YgiTおよびMqsR-YgiTの発現は大腸菌のcurli線毛量を減少させることが示唆された．

そこで、*curli* 線毛発現制御因子である *csgD* 欠損株を用いて YgiT 誘導後のバイオフィーム形成を解析した結果、YgiT によるバイオフィーム形成促進は消失した。よって、YgiT は *csgD* の発現を抑制することで運動性およびバイオフィーム形成を促進することが明らかとなった。現在、YgiT による *csgD* 発現抑制機構について実験を進めている。

MqsR によるバイオフィーム内細胞死を解明するために、MqsR の配列特異性について合成 RNA を用いて *in vitro* で解析した。その結果、MqsR は RNA の GCU 配列のみならず GCC および GCA 配列も GCU と同程度に認識・切断した。MqsR 切断配列を持たない遺伝子は大腸菌では 2 つしか存在しないことから、MqsR は細胞死を引き起こすことが示唆された。質量分析により MqsR による RNA 切断部位は 5'-OH および 3'-リン酸基を生じることを見出した。さらに MqsR は一本鎖 RNA を特異的に分解し、二本鎖 RNA および tRNA は分解しないことも見出した。

### 非天然マクロラクタム化合物の 微生物発酵生産

宮 永 顕 正

東京工業大学大学院理工学研究科  
miyanaga.a.aa@m.titech.ac.jp

目的：マクロラクタム抗生物質は、放線菌によって生産される環状アミド構造を有するポリケタイド化合物であり抗菌性や抗腫瘍性を有する化合物が多数知られている。その合成においては、アデニル化酵素により各化合物に特有の  $\beta$ -アミノ酸開始基質が選択され、ポリケタイド骨格に組み込まれる。例えば、*Streptomyces* sp. ML694-90F3 が生産するインセドニンとは 3-アミノブタン酸部位を、*Streptomyces scabrisporus* JCM11712 が生産するヒタチマイシンは  $\beta$ -フェニルアラニン部位を、*Streptomyces halstedii* HC34 が生産するビセニスタチンは 3-アミノイソブタン酸部位を有している。本研究では、この  $\beta$ -アミノ酸部位を別の  $\beta$ -アミノ酸に入れ替えた非天然

型のマクロラクタム化合物を生産することを目的とした。方法：インセドニンとヒタチマイシンとビセニスタチン生産菌の  $\beta$ -アミノ酸生成酵素遺伝子の破壊株に対して、それぞれ非天然型の  $\beta$ -アミノ酸を投与して培養を行った。培養抽出物を解析することにより、目的の非天然型化合物が生産されているかを調べた。

結果・考察：インセドニン生産菌に関しては、生合成遺伝子クラスター中のグルタミン酸 2,3-アミノムターゼ遺伝子 *idnL4* の破壊株を作製し、アデニル化酵素 *IdnL1* が認識できる 3-アミノ脂肪酸を投与して培養した。その結果、3-アミノペンタン酸を取り込んだインセドニン類縁体を生産させることに成功した。ヒタチマイシン生産菌に関しても、同様にフェニルアラニンアミノムターゼ遺伝子 *hitA* の破壊株に、アデニル化酵素 *HitB* が認識できる  $\beta$ -フェニルアラニン類縁体を投与して培養を行った。その結果、フェニル基のオルト位、メタ位、パラ位をそれぞれフッ素に置換した化合物を投与した際に、これらを取り込んだヒタチマイシン類縁体を生産した。また、メタ位がメチル基、あるいはプロモ基に置換された  $\beta$ -フェニルアラニン類縁体を投与した際にもヒタチマイシン類縁体の生産が確認された。また、ビセニスタチン生産菌に関しては、グルタミン酸ムターゼ遺伝子の破壊株にインセドニン生合成に関わるアデニル化酵素遺伝子 *idnL1* を導入し、インセドニンの開始基質である 3-アミノブタン酸を投与して培養を行った。その結果、3-アミノブタン酸を開始基質部位に含むビセニスタチン類縁体を生産することが明らかになった。本研究の結果から、マクロラクタム抗生物質の  $\beta$ -アミノ酸開始基質部位は入れ替え可能であることが分かった。今後はさらなる非天然マクロラクタム化合物生産を試みる予定である。



## 大腸菌の菌外膜ベシクル生産促進機構の解明

尾 島 由 紘

大阪大学大学院基礎工学研究科,  
現 大阪市立大学大学院工学研究科  
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

目的：菌外膜ベシクルは、主にグラム陰性菌の外膜から遊離した直径20～250nm程度の細胞外小胞で、毒性因子やシグナル物質の運搬または不要物質の排出などに関与するとされている。近年、ベシクルのドラッグデリバリーシステムへの応用などが報告されており、ベシクル生産機構の解明や過剰生産株の構築は重要である。先行研究において、大腸菌にセルロース合成関連遺伝子である *bcsB* を過剰発現すると、ベシクル生産量が促進されることを明らかにしており、本研究ではその促進機構の解明を目的として検討を行った。

方法：大腸菌野生株と *bcsB* 過剰発現株をグルコース含むLB培地を用いて、37℃で24時間培養することでベシクルを生産させ、超遠心分離により回収した。得られたサンプルはポリアクリルアミド電気泳動を行い、細胞外膜タンパク質 OmpA, OmpC の量を基準としてベシクル生産量を評価した。また透過型電子顕微鏡を用いた観察により、得られたベシクルの写真から見かけの平均粒径分布を算出した。さらにDNAマイクロアレイ解析により、野生株と *bcsB* 過剰発現株の網羅的な遺伝子発現の比較を行い、ベシクル生産の促進機構について考察した。

結果・考察：*bcsB* 過剰発現株では、ベシクル生産量は約3倍に増加した。ベシクル平均粒径は、野生株が130nm、*bcsB* 過剰発現株では56nmとなり、*bcsB* を発現させることで小さくなる傾向が確認された。さらにDNAマイクロアレイ解析から、膜ストレス応答性である Cpx 関連遺伝子 (*cpxA*, *cpxP*) やペリプラズムプロテアーゼ (*degP*) などの発現量が、*bcsB* 過剰発現株において大幅に増加していることがわかった。他の研究グループにより、膜ストレス負荷が微生物のベシクル生産を誘引するとの報告があるため、*bcsB* 過剰発現によってベシクル生産が促進した理由として、本来大腸菌細胞内で発現量

の少ない内膜貫通タンパク質である *BcsB* を過剰発現したことにより、膜ストレス応答が誘因され、それに伴ってベシクル生産が促進されたと考察した。

一方で、*bcsB* 過剰発現によるベシクル生産の促進に付随して、フロックと呼ばれる数mm程度の自己凝集体が形成されることを明らかにした。フロックはプロテアーゼ感受性であることから主構成成分はタンパク質であると考えられ、フロックに含まれるタンパク質を質量分析により解析したところ、細胞外膜タンパク質 OmpA と OmpC が高い割合で検出され、ベシクル生産促進との関連性が示唆された。大腸菌のベシクル生産が促進または抑制されると報告のある欠損株（それぞれ、 $\Delta degP$ ,  $\Delta dsbA$ ）を用いて試験したところ、ベシクル生産量とフロック形成の間に正の相関が確認され、過剰に生産された菌外膜ベシクルは、フロック形成を引き起こすことを見出した。

## 酢酸菌の酸化発酵に関わる 中央炭素代謝制御に関する研究

新 井 博 之

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

目的：酢酸菌はエタノールを不完全酸化することにより一時的に酢酸として培地中に蓄積する性質を持ち、古くから食酢醸造に利用されてきた。蓄積した酢酸はエタノールの枯渇後に炭素源およびエネルギー源として利用される。*Acetobacter aceti* NBRC 14818等の酢酸菌野生株ではTCA回路の補充経路であるグリオキシル酸経路を持つのに対し、食酢醸造に使用されている *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283等の菌株ではこの経路を欠失しており、このような中央炭素代謝経路の違いが酢酸生産性に影響を及ぼすことが示唆されている。NBRC 14818のグリオキシル酸経路遺伝子欠損株では、エタノールとグルコースが共存する条件で著しい生育阻害が起こるのに対し、NBRC 3283では生育阻害を起こさず酢酸を蓄積するため、食酢醸造株には特有の代謝特性があると考

えられる。本研究では酢酸菌が共通して持つ不完全酸化を起こすための中央炭素代謝制御機構と、食酢醸造株に特異的な代謝特性を明らかにすることを目的とした。

方法：*A. aceti* NBRC 14818の野生株とグリオキシル酸経路欠損株、および、*A. pasteurianus* NBRC 3283を用い、様々な培養条件におけるトランスクリプトームと代謝物の解析から、各菌株に共通または特異的な炭素代謝経路の推定を行った。

結果・考察：解析したすべての菌株において、エタノールの存在時にTCA回路関連遺伝子の発現が抑制された。特に酢酸からアセチル CoA を経てクエン酸に変換する succinyl-CoA:acetate CoA-transferase (*aarC*) と citrate synthase (*aarA*) の遺伝子発現がより強く抑制され、これによりTCA回路への代謝フローが減少することで不完全酸化が起こることが示された。NBRC 14818ではピルビン酸をアセトアルデヒドに変換する pyruvate decarboxylase 遺伝子 *pdC* の発現がエタノールとグルコース共存時に顕著に上昇していたため、グルコースを解糖系からアセトアルデヒドを経由して酢酸に変換するオーバーフロー代謝が働いていると考えられた。グリオキシル酸経路欠損株では *pdC* の転写量がさらに増大しており、細胞内に蓄積するアセトアルデヒドの毒性により生育障害が起こると考えられた。NBRC 3283では逆に、*pdC* の発現はエタノールとグルコース共存時に顕著に低下した。NBRC 3283のゲノムにはNBRC 14818が持っていない acetate kinase (Ack)-phosphotransacetylase (Pta) 経路等、アセトアルデヒドを経由せずにピルビン酸を酢酸に変換するバイパス経路の遺伝子があり、代謝によりアセトアルデヒドを生成しないために生育障害が起こらないと予想された。以上の結果から、酢酸菌の不完全酸化は *aarC* と *aarA* の遺伝子発現抑制によって起こり、菌株間におけるグリオキシル酸経路の有無、および、グルコースからのオーバーフロー代謝経路の違いが、酢酸生産性の違いの原因となることが示された。

二倍体で、育種が比較的容易である上面ビール酵母に、ビール醸造に適した凝集性を付与した菌株を造成し、小規模多品種生産する地ビールへの貢献をめざす

尾形 智夫

前橋工科大学工学部  
tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp

目的：我が国の人口減少、高齢化に伴い、酒類消費量が減少傾向にある。この中で、地ビールの消費量は、増加傾向にある。地ビールの特徴は、少量多品種生産にある。このことに貢献する手段として、酵母株が多種類ある上面ビール酵母株の利用が考えられる。しかし、上面ビール酵母株には、ビール醸造に適した NewFlo タイプ凝集性（マンノース、グルコース添加で凝集が抑制される凝集性）を示す酵母株がほとんどない。そこで、上面ビール酵母株にビール醸造に適した凝集性を付与する酵母株の造成を試みた。

方法：凝集性を示さない上面ビール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Y6 株を胞子形成させ、胞子を分離し、凝集性を調べた。NewFlo タイプ凝集性を示す胞子分離体 Y6-a5 株（接合型 **a**）を分離した。この酵母株と、麦汁発酵性が良好な酵母株 *S. cerevisiae* MAFF 113369（接合型  $\alpha$ ）を接合させ、2倍体酵母を造成した。また、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y6 株のゲノム DNA 配列を、次世代シーケンサー HiSeq2500 で解読し、アセンブリソフトウェア Platanus でアセンブリさせた scaffold を解析し、凝集性に関与する遺伝子を解析した。

結果・考察：NewFlo タイプ凝集性を示す上面ビール酵母胞子分離体 *S. cerevisiae* Y6-a5 株と、麦汁発酵性が良好な酵母株 *S. cerevisiae* MAFF 113369 の接合株 *S. cerevisiae* Y6-a5/113369 は、良好な麦汁発酵性を示し、NewFlo タイプ凝集性を示した。従って、ビール醸造に適した凝集性を示す2倍体の上面ビール酵母を造成することができた。次世代シーケンサーによる、上面ビール酵母 *S. cerevisiae* Y6 株のゲノム DNA 配列解読の結果、第I染色体の右腕末端、左腕末端、第VIII染色体右腕末端に、

凝集性に関与すると予想される遺伝子の存在が確認された。現在、第VIII染色体右腕末端に存在する遺伝子（Y7-FLO5）が、NewFloタイプ凝集性に関与していると推察している。

DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列から、Y7-FLO5遺伝子では、実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C の FLO5 遺伝子（マンノース添加で特異的に凝集性が阻害される FLO1 タイプ凝集性を示す）と比較すると、アミノ酸配列の一致率が78%で、マンノース認識に関与すると推察されている Q98, Q117 は、全て保存されていた。一方、糖質リガンド結合に関与すると考えられている Flo subdomain (D84-N110) では、一致率が相当低下しており（一致率59%）、特にC末端領域では、全く一致しないことより、このアミノ酸残基の差異が、酵母凝集性の差異に関連していると推察された。

放線菌生体内代謝の超高感度  
リアルタイム観測手法の開発と応用

Ulanova Dana

高知大学教育研究部  
ulanova@kochi-u.ac.jp

目的：放線菌由来二次代謝産物の基質は主に一次代謝産物であり、一次代謝経路と代謝フラックスの制御の理解が、二次代謝研究の進展に必要である。我々は、核磁気共鳴分光法（NMR）による、微生物代謝の超高感度リアルタイム観測手法の開発を目的としている。本研究では、放線菌二次代謝の混合物のNMR解析に適した培養条件の検討に注目した。脂肪酸合成を阻害するトリクロサンにより、放線菌二次代謝研究のモデル株 *Streptomyces coelicolor* における一次代謝を改変し、二次代謝色素産物の合成が固体培養で増加することについて報告がある。この阻害剤を用いて、放線菌の液体培養条件及びNMR解析条件を検討した。

方法：*Streptomyces violaceoruber* NBRC 15732 (*Streptomyces coelicolor* A3(2)) を培養し、培養開始、対数増殖期、定常期のそれぞれのフェーズで一次代謝産物の生合成阻

害剤を最小発育阻止濃度より低濃度で添加した。培養後、条件の細菌増殖の速さ及びバイオマス・色素合成を測定した。続いて、土壌及び海洋由来放線菌 *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893, *Saccharopolyspora erythraea* NBRC 13426, *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806, *Salinispora arenicola* NBRC 105043, *Salinispora tropica* NBRC 105044 のトリクロサンの最小発育阻止濃度を検討し、各株の対数増殖期に最小発育阻止濃度より低濃度でトリクロサンを添加した。培養後、バイオマス測定及び生理活性アッセイを行った。二次代謝産物を抽出し、混合物のまま、<sup>1</sup>H NMR 及び HSQC 法により代謝分析を行った。結果・考察：放線菌 *S. violaceoruber* の液体培養実験の結果、阻害剤添加により赤色色素の産生量は2倍に増加することが確認できた。興味深いことに、培養期に応じて、阻害剤の添加は増殖及び代謝産物に異なる影響を与えることも明らかにした。トリクロサンを対数増殖期に添加すると、培養開始時に比べ、色素の合成は58%増加した。

解析した他の放線菌において、*Saccharopolyspora erythraea*, *Amycolatopsis orientalis*, *Salinispora arenicola* の生理活性物質の生産は、今回の実験条件下においてトリクロサンの影響を受けなかった。一方、*Salinispora tropica* の場合は、阻害剤を添加した培地でのみ、生理活性物質を生産した。又、*Salinispora tropica* 及び *Streptomyces avermitilis* のNMR解析の結果、トリクロサン添加有無の培養に、メチル基と酸素官能基を持つ化合物の違いを確認した。現在、トリクロサンの添加により、どのような代謝産物の合成を改変するかを調べている。結論として、開発した阻害剤添加アッセイとNMR解析により二次代謝産物改変の観察ができた。今後は、本手法を生体内代謝の超高感度リアルタイム観察に応用することが期待される。

### 微生物機能を利用したバイオベース ポリマー生産系の構築

岩 木 宏 明

関西大学化学生命工学部  
iwaki@kansai-u.ac.jp

目的：植物油由来のポリマー生産系構築に資する遺伝子を獲得することを目的とした。具体的には、オレイン酸からシクロオクタノン、8-オクタノリドを經由し、ポリ(8-オクタノリド)を合成する系に資するシクロオクタノン1,2-モノオキシゲナーゼ遺伝子、オレイン酸からシクロヘキサンカルボン酸を経て4-ヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸、4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテキュ酸、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸を合成する系に資するシクロヘキサンカルボン酸分解系（芳香族化経路）遺伝子群の取得を試みた。

方法：シクロオクタノン1,2-モノオキシゲナーゼ遺伝子(*codB*)は、Baeyer-Villiger型モノオキシゲナーゼの保存配列をもとに設計した縮重プライマーを用いて部分配列を増幅後、インバースPCR法で全域を取得した。*codB*の大腸菌異種発現にはpETシステムを用いた。

シクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子の取得においては、*Corynebacterium cyclohexanicum* MU株を供試菌株とした。まず、本菌株のシクロヘキサンカルボン酸分解経路上の4-ケトシクロヘキサンカルボン酸から4-ヒドロキシ安息香酸への芳香族化を触媒する酵素（芳香族化酵素）のN末端アミノ酸配列を決定し、その配列をもとに縮重プライマーを設計した。設計したプライマーとTaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kitを用いて、芳香族化酵素遺伝子(*chcC*)の部分配列を増幅した。*chcC*全域および周辺域の取得はインバースPCR法で行った。*chcC*の大腸菌異種発現には、pETシステムを用いた。

結果・考察：シクロオクタノン資化性菌からシクロオクタノン1,2-モノオキシゲナーゼ活性の強い菌株を選択し、*Lutimaribacter litoralis* KU5D5株（シクロヘキシル酢酸分解菌として単離）および*Phaeobacter* sp. KU2B3a株（シクロヘキサノン資化性菌として単離）をシクロオ

クタノン1,2-モノオキシゲナーゼ遺伝子取得の供試菌に決定した。これら菌株の*codB*遺伝子の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を機能既知のBaeyer-Villigerモノオキシゲナーゼのものと比較したところ、両菌株の*CodB*は共に*Xanthobacter flavus* ZL5株および*Acinetobacter* sp. NCIMB9871株のシクロヘキサノン1,2-モノオキシゲナーゼと最も高い類似性を示した（それぞれ78%および61%のアミノ酸一致率）。なお、KU5D5株とKU2B3a株の*CodB*は96%のアミノ酸一致率を有していた。両菌株の*codB*異種発現大腸菌を構築し、*CodB*の機能を確認した結果、両菌株の*CodB*ともにシクロオクタノン1,2-モノオキシゲナーゼ活性を有していたことから、標的遺伝子の取得に成功したものと判断した。

シクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子群の配列を取得するため、約12-kbの領域の塩基配列を決定した。この領域には、*chcC*遺伝子だけでなく、シクロヘキサンカルボン酸から4-ヒドロキシ安息香酸への変換に関与すると推定される酵素遺伝子群、制御遺伝子、トランスポーター遺伝子が存在した。*chcC*異種発現大腸菌を構築し、無細胞抽出液の活性を解析した結果、*ChcC*は4-ケトシクロヘキサンカルボン酸から4-ヒドロキシ安息香酸への芳香族化を触媒することが明らかとなり、標的遺伝子の取得に成功したものと判断した。

### ゲノム解析結果を利用した 清酒酵母の減数分裂における 染色体組換えに関する研究

下 飯 仁

岩手大学農学部  
simoi@iwate-u.ac.jp

目的：清酒醸造に用いられている清酒酵母は減数分裂による孢子形成率が低く、孢子が得られた場合でも発芽率が非常に低いことが知られている。このため、清酒酵母では一倍体の作成による交配育種がきわめて困難である。しかし、清酒酵母の減数分裂過程のどの部分に欠陥があるのかについては不明な点が多く、その解明が待た

れている。清酒酵母きょうかい7号（K7）で胞子形成の転写因子 *Ime1* を高発現させると、胞子形成能はかなり回復するが、発芽率はあまり回復しないこと、K7でまれに得られる一倍体は異数体が多いことから、清酒酵母は減数分裂時の染色体組換えに欠陥があり、その結果の染色体不分離によって胞子形成率や発芽率が低下している可能性が考えられた。本研究では、K7の一倍体4株を次世代シーケンサーを用いてリシーケンスし、ゲノムワイドな染色体組換えを観察した。また、二倍体実験室酵母 X2180 及び K7 の同一染色体上に2種類のヘテロザイガスな遺伝子マーカーを導入した菌株を作製し、胞子形成後の組換えの有無を検証した。

方法：一倍体のリシーケンスにはイルミナ社の HiSeq2500 を用いた。得られたリードを DDBJ Read Annotation Pipeline を用いて K7 ゲノムにマッピングし、K7 ゲノムでヘテロザイゴシティーを示す部分の塩基を抽出した。また、5番染色体右腕にある *URA3* 及び *CAN1* の遺伝子破壊は *clonNAT* 耐性遺伝子及び G418 耐性遺伝子をマーカーとした相同組換えによって行った。*ura3* 及び *can1* は5-フルオロオロチン酸耐性及びカナバニン耐性によって調べた。

結果・考察：K7 一倍体の全ゲノム解析では、染色体組換えが正常である場合は親株のヘテロザイゴシティーに由来する塩基のハプロタイプが4株ですべて異なるが、染色体組換えが異常の場合は親株と同じハプロタイプが2種類観察されるはずである。解析の結果、二倍体親株の各染色体に由来すると考えられる2種類または1種類のハプロタイプしか観察されず、組換え型と考えられるハプロタイプは観察されなかった。この結果は、K7 の減数分裂時にはいずれの染色体においても組換えが生じていないことを示している。

ヘテロザイガスな遺伝子マーカーを導入した実験では、まず実験室酵母 X2180 (*URA3/ura3, CAN1/can1*) を胞子形成後、50個の子囊について四分体解析を行った。その結果、予想通り約38%の頻度で組換え型が観察され、この方法が染色体組換えの検証に有効であることが確認できた。清酒酵母 K7 (*URA3/ura3, CAN1/*

*can1*) では胞子形成率が極めて低いため、胞子形成後 65°C、20分間の熱処理を行い、その後カナバニン培地で増殖可能で一倍体特有のフェロモン生産能を示す株を一倍体とした。その結果、異なる2種類の親株から得られた15株及び18株の一倍体は、それぞれ同一の遺伝子型 (K7-1 株由来の株は *ura3 can1*, K7-2 株由来の株は *URA3 can1*) を示し、組換え型は観察されなかった。

### 免疫活性化能と乳化作用を併せ持つ パン酵母の細胞表層構造解析

東 雅 之

大阪市立大学大学院工学研究科  
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

目的：これまでに免疫力を高めることができる新たな機能性パン酵母の開発を目指し、免疫担当細胞であるマクロファージとの接触により細胞を強く活性化する遺伝子欠損株を取得し、それらの性状解析を進めてきた。強い活性を示す株の共通の性状として、細胞壁マンナンの減少の他に、酵母と油を混合すると油が乳化する現象が見られ、乳化活性は免疫活性が高い酵母ほど強い傾向を示した。マクロファージの活性化と乳化作用の間に相関が示され、乳化は酵母を油と混合するだけで簡単に評価できることから、実験室酵母の遺伝子ノックアウト株（約5000株）のセットを用い、乳化作用を有する酵母のスクリーニングを行い、さらに選抜株のマクロファージ活性化能を評価してきた。本研究では、継続してスクリーニングを行い、さらにこれら選抜株と既存の活性化株を用いて、酵母により乳化が生じるメカニズムの解明を進めた。

方法：スクリーニングには、*Saccharomyces cerevisiae* BY4741（接合型 a の一倍体株）をもとに各 ORF を遺伝子破壊した遺伝子欠損株を使用した。乳化は、試験水溶液にケロシンを添加しボルテックスにより攪拌した後の様子から目視で判断した。マクロファージ活性化能は、マウス由来の細胞株 RAW264.7 株を用い、酵母細胞と6時間接触した後の TNF- $\alpha$  の分泌量を ELISA によって測

定しその値から評価した。

**結果・考察：**菌体と油を混合した時に乳化活性を示す遺伝子欠損株をスクリーニングした結果、その候補株として22株（接合型 a）が選抜された。接合型 a の同遺伝子の欠損株の乳化活性、菌体懸濁液（PBS）の遠心上清の乳化活性を評価し、最終的に既存の高い乳化を示す酵母と同程度の活性を持つ酵母を5株選抜した。酵母細胞自身のマクロファージ活性化能を評価した結果、選抜した5株中4株で野生株より高い活性が見られた。乳化現象がマクロファージ活性化株を選ぶ一つの指標となることが確認された。4株中2株の欠損遺伝子は、Gタンパク質のサブユニットもしくはそれに関わる因子であると報告されていたが、細胞表層との関わりについての情報はなかった。他の2株の欠損遺伝子は機能未知であった。今後、これら遺伝子と細胞表層の関わりについての解析が必要となる。とくに機能未知であった YBL094C 欠損株は細胞サイズが大きいことから細胞表層との関わりが示唆されたため、細胞壁成分マンナン、グルカン、キチン量を常法に従い測定したが野生株との顕著な違いは観察されなかった。これまでの活性株ではマンナン量の減少が共通した特性であったが、YBL094C 欠損株は異なる傾向を持つものかもしれない。また、菌体を PBS に懸濁するだけで容易に遊離してくる乳化物質の精製を進めたが、同定には至らなかった。そのため、別途乳化物質を培養液中に分泌する変異株を用いて培養液中からの精製を進めた。

出芽酵母のリン酸飢餓応答における  
オートファジーの役割と  
その誘導機構に関する研究

新谷 尚弘

東北大学大学院農学研究科  
takahiro.shintani.d7@tohoku.ac.jp

**目的：**真核細胞は、栄養飢餓に曝されるとオートファジーを利用して細胞成分のリモデリングを行う。出芽酵母では窒素源、炭素源、硫黄の飢餓でオートファジーが

誘導されることが示されていたが、リン酸飢餓でオートファジーが誘導されるかは明らかでなかった。そこで、私たちは出芽酵母を用い、リン酸飢餓で誘導されるオートファジーの役割とその誘導機構について解析を行うことを目的とした。

**方法：**本研究では、遺伝子破壊株ライブラリーの親株として広く用いられている *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株のロイシン、ヒスチジン、リシン要求性を原栄養性に変換した YHY36 株を用いた。各種アッセイに用いるレポータータンパク質は *URA3* を選択マーカーとするプラスミドを導入することにより発現させた（これにより、原栄養株となる）。遺伝子破壊には、薬剤耐性遺伝子を用いた。酵母株を最小培地（SD 培地）で栄養増殖させた後、窒素源（硫酸アンモニウム）あるいはリン酸源（リン酸カリウム）を含まない SD 培地（それぞれ、SD-N、SD-P）で培養することにより、飢餓処理を行った。SD-P には差し引いたリン酸カリウムと当量の塩化カリウムを加えた。

**結果・考察：**リン酸飢餓下で誘導されるオートファジー（以下、PSiA と省略する）は窒素飢餓で誘導されるオートファジー（NSiA）と比べて、誘導レベルは著しく低かった。液胞に貯蔵されたリン酸を細胞質に再分配できない *pho91Δ* 株で PSiA のみが促進されたことから、細胞質のリン酸濃度を感知してオートファジーを誘導することが示唆された。PSiA の誘導には、低リン酸条件にตอบสนองして細胞外ホスファターゼや高親和性リン酸輸送体の転写を活性化する PHO シグナリング経路は関与せず、target of rapamycin complex 1（TORC1）シグナリング経路が関わっていることが明らかとなった。窒素源飢餓下では、アミノ飢餓に伴う TORC1 の迅速な不活性化による Atg13 の脱リン酸化が、オートファジーの誘導に寄与していることが知られている。リン酸飢餓に伴って、Atg13 の脱リン酸化が起こることが観察されたが、そのキネティックスは窒素飢餓時より著しく遅かった。この結果は、リン酸飢餓下でのオートファジーレベルが低いことと一致する。一方、PSiA には、これまで非選択的オートファジーには必要でないと報告されていた Atg11 が必

要であった。Atg11は選択的オートファジーにおける積荷タンパク質とAtg1やAtg9を始めとしたオートファゴソーム形成因子との橋渡しに必要な因子である。積荷結合部位を欠いたAtg11でもPSiAを誘導できることから、Atg11は積荷の認識だけでなく、オートファゴソームの形成にも関与することが示唆された。リン酸飢餓下では、脱リン酸化が不十分なAtg13の機能をAtg11が補っていることが考えられた。

**植物病原菌が病原性タンパク質を  
植物・微生物間インターフェースに  
局在させるメカニズム**

高野 義孝

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

目的：多くの植物病原菌は「エフェクター」と呼ばれる分泌型の病原性タンパク質を用い、本来発揮されるべき宿主植物の防御反応を抑制している。しかし、このエフェクターを病原菌がどのように分泌し植物に作用させるのかは不明な点が多い。近年、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) を対象とした研究により、付着器が形成する侵入菌糸の基部周辺に生じる「病原菌・宿主間に形成されるリング状インターフェース領域」にエフェクターが局在・蓄積することが明らかとなっている。さらにインターフェースへのエフェクター局在が低下した場合、本病原系状菌の病原性が顕著に低下することが示され、エフェクターを介した宿主感染戦略におけるインターフェースへの局在の重要性が示唆されている。本研究では、このインターフェースにおけるエフェクター局在について研究を実施した。

方法：エフェクター動態がモニターできるウリ類炭疽病菌のレポーターラインを背景に、分泌経路に関わると推定される候補遺伝子について相同性組換えを利用した標的破壊解析を行い、その破壊株と宿主とのインターフェース領域へのエフェクター局在、および破壊株の胞子細胞からのエフェクター分泌について調査をおこな

た。さらに、感染時に病原菌より分泌されたエフェクターが宿主細胞内に移行する可能性について検討を加えた。

結果・考察：分泌小胞と細胞膜の融合などに関わるSNARE分子であるSSO1のオルソログをコードする遺伝子をウリ類炭疽病菌において同定し、その標的破壊株を作成した。本破壊株は宿主キュウリへの病原性について有意な低下を示した。続いて、エフェクターDN3とmCherryの融合タンパク質を発現するレポーター株に対し、SSO1遺伝子の破壊をおこなった。SSO1破壊株の胞子においては、エフェクター分泌の明確な低下が観察され、本因子が胞子からのエフェクターDN3の分泌に関わることが示唆された。一方で本レポーター株をキュウリに接種し、侵入菌糸基部周辺のインターフェース領域へのエフェクター局在について観察した結果、野生型株と比較して、SSO1破壊株においては明確な変化は見られなかった。他の因子についても同様な結果が得られており、これらの結果は、インターフェースへのエフェクター分泌に特化した機構の存在を示唆した。また、DN3:mCherryタンパク質を発現するレポーター株の感染部位について共焦点レーザー顕微鏡を用いた詳細な蛍光観察を実施した結果、インターフェースへの局在を示すリング状の蛍光シグナルに加えて、侵入された植物細胞においてmCherryシグナルが検出された。このことは、病原菌から分泌されたエフェクターDN3の宿主移行についての可視化の可能性を示しており、今後さらに解析を継続していく予定である。

**省リン型農業実現のための土壌微生物  
難溶性リン酸塩資化スペクトルの  
体系的分析とその資化機構の解明**

岡野 憲司

大阪大学大学院工学研究科  
okano@bio.eng.osaka-u.ac.jp

目的：畑地土壌において、肥料として供給されたリンの大半は鉄やアルミニウムなどと結合し、作物が利用できない形態で固定される。一方、環境中には難溶性リン酸

塩を可溶化する微生物の存在が知られる。そこで本研究では、土壌より難溶性リン酸塩資化微生物を単離し、その資化機構を解明することで、土壌のリン利用効率向上に向けた知見を得ることを目的とした。

方法：大阪大学構内で得た土壌より  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  のいずれかの化合物を単一リン源として含む MOPS 培地で生育可能な株を複数単離した。得られた株を培養し、培養上清の pH, 遊離リン酸濃度, 有機酸濃度の測定を行った。リン溶解能の高い株については 16S rDNA 塩基配列に基づき微生物同定を行った。

結果・考察：リン酸カルシウム溶解株 200 株について培養を行った結果、17 株について pH の顕著な低下が見られ、リン溶出量が高い株が多数得られた。pH とリンの溶出量には負の相関が認められ、最も溶解量の高い株で 6.7mM の  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  から 15.9mM のリンの溶出が確認された。いずれの株においても乳酸や酢酸、グルコン酸、酒石酸などの有機酸の生成が認められ、リン酸カルシウムは有機酸の生成に伴う pH の低下によって溶解することが示された。 $\text{FePO}_4$  溶解株についても、リンの溶出量が高い株は pH を低下させる傾向にあったが、有機酸の種類はグルコン酸と 2-ケトグルコン酸と限定的であった。従って、キレート効果のある有機酸が  $\text{FePO}_4$  の溶解に重要な役割を果たしていると考えられる。最も溶解量の高かった株 (*Enterobacter aerogenes* と同定) では、2mM の  $\text{FePO}_4$  から約 0.6mM のリンの溶出が確認された。本株の有機酸生産は培地中の遊離リン酸や鉄濃度には影響を受けず、酸素濃度によって影響を受けることが明らかとなった。一方、 $\text{AlPO}_4$  溶解株においてもグルコン酸と 2-ケトグルコン酸の産生が確認され、 $\text{FePO}_4$  と同様 pH の低下とキレート効果により溶解していることが示唆された。最も溶解量の高い株で 2mM の  $\text{AlPO}_4$  より約 0.8mM のリンの遊離が確認され、*Acinetobacter calcoaceticus* と同定された。本株はグルコースを単一炭素源として用いた場合にグルコン酸を生成し  $\text{AlPO}_4$  を溶解するが、微生物の増殖は殆ど見られなかった。一方、キシロースやアラビノースといったペントースを炭素源として用いた場合、グルコン酸の生成は確認されず、微生

物の増殖が確認された。従って、本株はグルコースを  $\text{AlPO}_4$  の溶解に利用し、ペントースを菌体の増殖に用いることが明らかとなった。以上のように、土壌微生物の有機酸産生には酸素供給や複数の炭素源の供給が重要であることが示唆された。従って、多孔性の土壌改質剤による通気性の向上や、稲わら等炭素を含む有機物の鋤きこみにより、難溶性リン酸塩の効率的な利用が可能となると考えられる。

### エピジェネティクス制御の人為的再制御 による微生物生産機能の活性化

渡辺 賢二

静岡県立大学薬学部  
kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp

目的：次世代シーケンサーによる DNA 配列読取技術の革新により、現在では様々な微生物のゲノム配列を短時間、低コストにて読取可能になった。その結果、たった一種の糸状菌のゲノム中に数十種類もの天然物生合成遺伝子が含まれていることが明らかにされた。ところが、実験室内における一般的な培養条件において、実際に代謝産物として単離、同定される天然物の数はそれよりも遥かに少数である。近年のトランスクリプトーム解析により、これら天然物生合成遺伝子の多くが不活性化状態、すなわち休眠状態であることが示された。つまり、我々は微生物のもつ天然物生産能力のうち、氷山の一角のみを利用してに過ぎないのかも知れない。一方で、このような生合成遺伝子を人為的に制御し、発現させることができれば、これまでに発見されてこなかった天然物の獲得が期待できる。そこで我々は、糸状菌の休眠型遺伝子を人為的に覚醒させることで新規化合物を含む多くの二次代謝産物の創製を目的として研究に着手した。

方法：*Aspergillus niger* は工業的に有機酸の製造に用いられている麹菌の一種であり、既にそのゲノム解読が完了している。そのゲノム中には 33 個のポリケチド合成酵素、15 個の非リボゾーム性ペプチド合成酵素および 9 つのポリケチド-ペプチドハイブリッド型酵素遺



伝子を有する。我々は、コンピューター上にてこれら天然物生合成遺伝子クラスターを詳細に解析し、新規天然物生合成を担う遺伝子クラスターを推測した。続いて選抜した数十種の生合成遺伝子クラスターについて、様々な培養条件にて得た mRNA をもとに、半定量 RT-PCR 法によりその転写量の解析を行った。その結果、いくつかの生合成遺伝子クラスターを、いずれの培養条件においても転写不活性である、休眠型遺伝子として特定することに成功した。

結果：選び出した休眠型遺伝子クラスターに含まれる転写因子遺伝子をマルトース存在下にて強制発現可能なグルコアミラーゼをコードする *glaA* 遺伝子のプロモーター領域の機能部位の下流へと配置したプラスミドを複製し、*A. niger* A1179 株へと導入した。PCR 法にて遺伝子導入を確認した形質転換体について、スターチを含有した培地にて振盪培養を行い、その代謝産物を LC-MS にて解析したところ、コントロール株には認められない、新たな化合物の産生が確認された。得られた化合物の化学構造を解析したところ 5 種の新規化合物 pyranonigrin F, G, H, I, J および F1 を得た。

考察：以上のように、我々は糸状菌の 1 種を用いて休眠型遺伝子を人為的に覚醒させることで新規化合物を含む多くの二次代謝産物の創製に成功した。微生物ゲノムを読み解くことで、迅速で簡便に新規化合物の探索が可能となることが期待される。

### 緑藻クラミドモナスを用いた 繊毛運動制御機構の解明

小 田 賢 幸

東京大学大学院医学系研究科,  
現 山梨大学大学院総合研究部医学域  
toda@yamanashi.ac.jp

目的：繊毛・鞭毛は哺乳類において、左右差の決定、気道の異物除去、精子の運動能、卵管内における卵子の移動、脳室内での脳脊髄液還流など高度な生理現象に関わる重要な運動性細胞小器官である。繊毛・鞭毛の基本構

造は単細胞生物から哺乳類に至るまで保存されており、中でも緑藻の一種 *Chlamydomonas reinhardtii* は鞭毛を持つモデル生物として広く用いられている。繊毛の運動は、モータータンパク質であるダイニンにより駆動されているが、繊毛の複雑な非対称波を作り出すためには、ダイニンの活性を精緻に制御する必要がある。私は過去に繊毛内での分子間衝突が繊毛運動制御に関わっていることを示したが、衝突が生じる箇所はダイニンから離れていたため、メカノシグナルがどのようにダイニンに伝達されるか不明だった。本研究では、繊毛ダイニンの 1 つである外腕ダイニン (Outer Dynein Arm, ODA) と、ダイニン制御複合体 (Nexin-Dynein Regulatory Complex, N-DRC) との間に生じると予想される相互作用と、繊毛運動制御の関係を検証した。

方法：*C. reinhardtii* の ODA 中間鎖欠損株 *oda6* と N-DRC サブユニット欠損株 *ida6* を、それぞれ対応するタンパク質 IC2, DRC2 にビオチン化タグを付加して表現型回復を行った。それらの回復株から鞭毛を単離し、ストレプトアビジンで鞭毛内の目的のタンパク質を構造ラベルした。ラベルした鞭毛の構造をクライオ電子トモグラフィ法により三次元再構成すると、目的のタンパク質の場所を同定することが出来た。これらの構造情報に基づき、IC2 と DRC2 の近接ドメインに FKBP および FRB タグを導入し、ラパマイシンによる化学的二量体誘導で IC2 - DRC2 間の相互作用を人為的に操作可能にした。

結果：三次元再構成により IC2 のアミノ末端と DRC2 の中央ドメインが近接していることが明らかになった。そこで IC2 のアミノ末端に FRB タグ、DRC2 の中央ドメインに FKBP タグを挿入し、ラパマイシンによる IC2 と DRC2 の架橋を試みた。ODA は 600 mM の塩化カリウムで鞭毛から溶出されるが、ラパマイシンを付加すると ODA は溶出されなかったことから、ODA と N-DRC が架橋されていることが確かめられた。遊泳状態の *C. reinhardtii* に対しラパマイシンを与え運動性を測定すると、IC2-FRB と DRC2-FKBP を発現している細胞は、ラパマイシン依存的に遊泳速度と鞭毛打頻度が低下した。

考察：私は前研究において、鞭毛軸糸の中心にある微小

管から伸びる突起が、外側円周上にある微小管上の突起に衝突することで、モーター活性が制御されることを示した。本研究の結果により、上記のメカノシグナルがN-DRCを介してODAに伝達されることが明らかになった。

### 結核菌の表面に存在する酸素結合蛋白質を介した感染メカニズムの解明

若 杉 桂 輔

東京大学大学院総合文化研究科  
wakasugi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

目的:我々は、以前、魚類ニューログロビン (Ngb) に、細胞外から細胞質内に自ら移行する働き「細胞膜透過能」があることを初めて発見した。また、魚類Ngbの細胞膜透過能にはN末端領域の4つの正電荷を帯びたりジン残基が重要であること、さらに、魚類Ngbは細胞表面に存在する負電荷を帯びたグリコサミノグリカン (GAG) と静電的に相互作用し細胞膜透過することも明らかにした。この魚類Ngbは細胞膜透過能を持つことが明らかになった最初の酸素結合蛋白質である。我々は、さらに、N末端に塩基性アミノ酸に富む配列を持つ他のグロビン蛋白質を検索したところ、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) 由来のヘモグロビン N (HbN) にそのような配列があることを見出した。そこで、本研究では、結核菌 HbN に細胞膜透過能があるかどうか検証し、その膜透過機構を解明することを目指した。

方法:まず、結核菌 HbN 遺伝子を pET-20b に導入し大腸菌発現ベクターを作製した。大腸菌を用いて大量発現させた HbN および truncated HbN 蛋白質を精製した後、脱エンドトキシン処理を行った。HeLa 細胞をガラスボトムディッシュに播種し、24 時間後、FITC 標識した蛋白質を導入した。その後、緩衝液で2回洗浄して生細胞のまま蛍光顕微鏡で観察した。

結果・考察:まず、結核菌 HbN を大腸菌を用いて大量調製する手法を構築し、次に、蛍光標識した結核菌 HbN を HeLa 細胞の培地に添加し、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、結核菌 HbN も細胞質内に取り込まれ、

結核菌 HbN に細胞膜透過能があることが明らかになった。次に、N 末端 11 アミノ酸残基を欠損させた truncated HbN を蛍光標識し顕微鏡観察した結果、truncated HbN は細胞内にほとんど取り込まれないことがわかった。このことから、結核菌 HbN の細胞膜透過能には N 末端領域が重要であることが明らかになった。また、結核菌 HbN と GAG の一種のヘパリンとの相互作用を検討するために、ヘパリンセファロース結合アッセイを行った。その結果、HbN はヘパリンを固定化したゲルに結合したが、truncated HbN は結合しなかった。この結果は、細胞膜透過能に GAG の存在が重要であることを示唆しており、魚類 Ngb と類似の機構によって細胞質内に導入されるものと考えられる。さらに、結核菌 HbN の部位特異的アミノ酸置換体を作製し細胞膜透過能に重要な残基を探索した結果、N 末端領域に存在する4つの塩基性アミノ酸 Arg6, Arg8, Lys9, Arg10 が細胞膜透過能に必須であることが明らかになった。結核菌 HbN は糖鎖修飾を受け結核菌の表面に存在することが報告されており、本研究で明らかになった結核菌 HbN の細胞膜透過能は、結核菌の感染に関与している可能性がある。

### ビフィズス菌がヒト腸内に定着するために重要なスルファターゼ遺伝子の役割の解析

加 藤 紀 彦

石川県立大学生物資源工学研究所、  
現 京都大学大学院生命科学研究所  
tkatoh@lif.kyoto-u.ac.jp

目的:ビフィズス菌のヒト腸内への定着・共生には、ヒトミルクオリゴ糖や食物繊維、あるいは腸管より分泌されるムチン糖タンパク質等の糖質源の資化代謝が重要である。これまで、これら糖質に対して作用する多様な糖質分解酵素が本菌より単離されているが、ムチンに普遍的に含まれる硫酸化糖鎖に作用する酵素については解析されておらず、また硫酸化糖鎖が資化代謝の対象となるのかについても明らかではない。そこで、本研究においてビフィズス菌のムチン硫酸化糖鎖の分解資化能とそれに

関わりと推定されるスルファターゼ関連遺伝子の解析を目的とした。

方法：保有する14種のビフィズス菌株について、ブタ胃由来ムチンの資化能および*p*-ニトロフェニルβ-6位硫酸化*N*-アセチルグルコサミン (*p*NP-β-GlcNAc-6S)の分解様式について検討した。さらに *Bifidobacterium bifidum* JCM 7004 株のゲノムについて PacBio RSII 法による解読を行った。また、*B. bifidum* JCM 7004 由来の *bbhII* 遺伝子について、大腸菌にてヒスタグ融合タンパク質として発現させ、組換え酵素 BbhII の酵素学的諸性質について調べた。さらにムチン存在下における本遺伝子の発現誘導についても検討を行った。

結果・考察：ムチン培地における生育試験の結果、*B. bifidum* および *B. animalis* subsp. *lactis* にムチンを炭素源としての生育能が観察された。さらに菌体を *p*NP-β-GlcNAc-6S と混合したところ、*B. bifidum* の2菌株において6位硫酸化*N*-アセチルグルコサミン遊離活性を見出した。*B. bifidum* JCM 7004 株のゲノムを解読し、BLAST 検索によって6位硫酸化*N*-アセチルグルコサミン遊離活性の責任遺伝子を探索したところ、*bbhII* が *Prevotella* 由来スルフォグリコシダーゼ遺伝子 *sgl* と28%のアミノ酸相同性を示した。そこで組換え酵素 BbhII について基質特異性を調べたところ、*p*NP-β-GlcNAc と比べ *p*NP-β-GlcNAc-6S に対して400倍以上の  $k_{cat}/K_m$  値を示したことから BbhII は硫酸化された*N*-アセチルグルコサミンを加水分解するスルフォグリコシダーゼであることが示された。また BbhII はムチンからも6位硫酸化*N*-アセチルグルコサミンを直接遊離した。さらに *bbhII* はブタ胃由来ムチン存在下において2倍程度の発現誘導が観察された。

以上のことから、ビフィズス菌 *B. bifidum* は硫酸化糖鎖に対して、スルファターゼによる反応よりもむしろ、スルフォグリコシダーゼによる反応による硫酸化糖の遊離によって、硫酸化糖鎖の分解を促進することが示唆された。

## 限定的発現遺伝子の機能解析による 新たな両賭戦略システムの解明

森川 一也

筑波大学医学医療系  
morikawa.kazuya.ga@u.tsukuba.ac.jp

目的：細菌が多様な環境を生き抜いていく際、各々の細胞が全て生き残る必要はない。一部の細胞が自然形質転換能を発揮して外来遺伝子を獲得したり、発現させる鞭毛タイプを確率的に切り換えて宿主免疫を回避したりする。細胞集団の一部の適応・進化を前提として種の存続を図るこのような生存戦略は、「両賭戦略」、「保険仮説」、「分業」などの概念で理解されている。ここでは、通常発現していない遺伝子が一部の細胞で発現する（限定的発現）ことが重要であり、そのメカニズムには Phase variation や bi-stability が知られている。

トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析データ（計64条件）によると、これまで黄色ブドウ球菌で発現が検出されていない遺伝子は128個（88個の外来遺伝子と40個の黄色ブドウ球菌遺伝子）存在する。我々は外来遺伝子を除く40個のうちから20種類の限定的発現遺伝子を見出している。このうちの一つ *comGC*（DNA取り込み装置遺伝子）については限定的に発現するメカニズムを明らかにして少数の細胞が自然形質転換能を示すことを初めて証明したが、残り19種類の限定的発現遺伝子が担う生物学的役割は不明である。本研究ではこれら限定的発現遺伝子 *esp* (*expression in minor subpopulation*) の機能を解明することによって、新規な両賭戦略・保険戦略システムを明らかにすることを目的とした。

方法：強度の異なるプロモーター配列を用いることで発現レベルの異なる強制発現用ベクターを2種類（高発現用と低発現用）作製した。各限定発現遺伝子を2種類の強制発現プラスミドに組み込み、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) RN4220 株および N315 株に導入した。これらの強制発現株、特に強発現用プラスミド株について、コロニー形態、寒天培地上でのコロニー拡散、各種薬剤感受性、糖の利用などの各種細菌生化学的特徴、ポ

リスチレン表面への接着、乾燥耐性度などを調べた。

結果・考察：*esp17*強制発現がRN4220の乾燥耐性を上昇させることを見出した。RN4220株はストレス応答に重要なシグマ因子SigBのレギュレーターを欠損しており比較的乾燥に弱い。一方、*esp17*をN315で強制発現させても乾燥耐性化は見られなかった。N315は通常の乾燥耐性度を示す株である。このことから、本菌は複数の乾燥耐性メカニズムを補完的に備えており、*esp17*はひとつのバックアップシステムを担う可能性が考えられる。乾燥耐性は本菌がヒト表層環境で生存し、またヒトからヒトに伝播するためにも重要な特質であるが、実はそのメカニズムはほとんど明らかになっていない。*esp17*による新たな乾燥耐性メカニズムについて今後明らかにしていきたい。

### 外来遺伝子の発現を抑制する CRISPR-Cas エフェクター複合体の機能構造解析

沼田 倫 征

産業技術総合研究所  
t-numata@aist.go.jp

目的：CRISPR-Cas系は原核生物における獲得免疫系として機能する。ウイルスに感染すると、原核生物はウイルス核酸の一部をゲノム上のCRISPR遺伝子座に組み込み、ウイルスの感染をゲノムに記録する。同じウイルスに再感染すると、この遺伝子座からcrRNAが合成され、Casタンパク質と会合してエフェクター複合体を形成し、ウイルス核酸を分解する。エフェクター複合体は、Casタンパク質の種類により3つの型に分類される。III型エフェクター複合体であるCmr複合体は、6種類のCasタンパク質（Cmr1～Cmr6）とcrRNAから構成されている。crRNAは5'側に8塩基のタグ配列（crRNAに固有の配列）、続いて31もしくは37塩基のガイド配列（ウイルス核酸に由来する配列）をもち、Cmr複合体はガイド配列と相補的な外来RNAを切断する。しかしながら、Cmr複合体が標的RNAを捕えて分解する仕組みは不明であった。本研究では、Cmr複合体の作動

原理を解明するために、その結晶構造を決定し、立体構造に基づいた機能解析を行った。

方法：アーキア由来のCmrタンパク質を大腸菌内で合成し精製した。crRNAおよびそのガイド配列と相補的なRNAまたはDNAは市販品を購入した。Cmr複合体を再構成し、crRNA依存的なRNA分解活性を測定した。再構成したCmr複合体を結晶化し、Photon Factoryにおいて回折データを得た。MR-SAD法により、結晶の位相を決定し、Cmr複合体の原子構造モデルを構築した。このモデルに基づいて生化学的実験を行った。

結果：再構成実験の結果、5つのCasタンパク質（Cmr2～Cmr6）とcrRNAからなる複合体（Cmr1-deficient Cmr複合体：CmrΔ1複合体）が、crRNAのガイド配列と相補的な標的RNAを切断することが判明した。次に、標的アナログ（標的RNAと同じ配列をもった一本鎖DNA）と結合したCmrΔ1複合体の結晶構造を解析した。CmrΔ1複合体は、Cmr4を3分子、Cmr5を2分子、それ以外のサブユニットを1分子ずつ含んでいた。crRNAのタグ配列はCmr3により特異的に認識されていた。また、標的アナログはcrRNAのガイド配列と2本鎖を形成していたが、Cmr4が6塩基周期で2本鎖の間に入り込んでいた。このため、Cmr複合体は、crRNAの5'側から数えて一定距離（14, 20, 26番目）にある塩基対合の形成を周期的に阻害し、標的RNAの形を3ヶ所で不安定化させることが分かった。生化学的な解析の結果、Cmr複合体はこれら3ヶ所のリン酸結合を周期的に切断することが明らかとなった。

考察：構造解析の結果、Cmr複合体がI型エフェクター複合体の立体構造と類似することも判明した。I型エフェクター複合体はDNAを標的とするが、それ自身にDNA分解活性は無く、リクルートされたCas3が二本鎖DNAを切断する。このように、I型およびIII型エフェクター複合体は、類似した仕組みで標的を認識するが、全く異なる機構で標的を分解する。したがって、両者は共通の祖先型複合体から派生し独自の進化を遂げてきたと示唆された。

## 微生物の中樞神経系への侵入経路 およびその分子機構の解明

村上正晃

北海道大学遺伝子病制御研究所  
murakami@igm.hokudai.ac.jp

目的：微生物には中枢神経系（CNS）へ感染し、脳髄膜炎を発症させるものがある。しかしCNSは血液脳関門によって保護されており、物質の出入りは厳密に制御されている。それにもかかわらず、どのように微生物がCNSへと侵入するのかは不明である。我々は、慢性炎症性疾患の発症機構の解明を研究する過程で、第5腰椎（L5）の背側血管において、免疫細胞を引き寄せるケモカインが、他の脊髄部分に比べて非常に多量に存在することを報告している。このL5でのケモカイン発現の誘導は、重力からの感覚神経の活性化が交感神経の活性化を招き、L5背側血管でノルアドレナリンが放出することによってL5血管内皮細胞がNF- $\kappa$ BおよびSTAT3依存的に活性化すること（炎症回路）が原因であることを見出している。このような局所神経刺激による特異的血管機能の変化を「ゲートウェイ反射」、とくに重力によるL5背側血管の機能変化を重力ゲートウェイ反射と呼び、研究を進めている。このL5背側血管の特殊性が微生物のCNSへの侵入にも関与するか否かをリステリア菌（*Listeria monocytogenes*）を用いて検討したところ、リステリア菌全身感染後のCNSではL5にのみ菌が検出された。このことは、微生物のCNS侵入に宿主生体応答が利用されていることを示唆している。本研究では、微生物のCNS侵入経路を明らかにし、その分子機構の解明を目的とした。この研究により、微生物による健康被害を抑制する神経系を介した新たな方法の開発へと繋がるのが期待される。

方法：C57BL/6 マウスに *L. monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, herpes simplex virus (HSV)2 を全身感染させ、その後、脳や脊髄の各部位を単離し、qPCRによって感染させた微生物のゲノムDNAを検出した。正常マウスのL1およびL5背側血管

からRNAを単離し、DNAマイクロアレイを行った。

結果・考察：*L. monocytogenes*を腹腔内投与後、CNS各部位でのリステリアの存在量を定量的PCRにて解析した。その結果、大脳皮質、中脳、小脳や脊髄L1部位に比較して、L5部位に有意に高いリステリアの存在を認めた。一方で、*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, HSV2は、*L. monocytogenes*の場合のようなL5選択性を示さなかった。L5血管の特殊性を分子レベルで明らかにするために、正常マウスからL1およびL5背側血管を単離し、DNAマイクロアレイを行った。リステリアの組織への侵入は、肝細胞増殖因子受容体c-MetとEカドヘリンに主に依存している。c-Metは炎症回路の標的遺伝子であり、DNAマイクロアレイの結果からも実際にL5背側血管で発現増強していた。阻害薬にてc-Met機能を阻害するとL5部位への*L. monocytogenes*の存在が変化することが判った。これらの結果は、*L. monocytogenes*がCNS侵入に重力ゲートウェイ反射という宿主生体応答を利用していることを示しており、c-Met阻害剤が*L. monocytogenes*のCNS重症感染を防ぐ手段となる可能性を示唆している。

## 細菌の光環境応答学の開拓

笠原賢洋

立命館大学生命科学部  
kasa@sk.ritsumei.ac.jp

目的：ゲノム解析の急速な進行により、多くの細菌が光受容体を持つことが明らかになってきた。特に、光合成せずに増殖する多くの細菌も光受容体を持ち、光環境が増殖に影響を及ぼすと考えられ興味深い。実際にどのような生理現象に光が関与するのかはほとんど分かっていない。細菌の光環境応答の全容を明らかにしていくことを目指し、*Novosphingobium aromaticivorans*が持つ光受容体LOV-ヘリックス-ターン-ヘリックス（LOV-HTH）の生理機能を明らかにすることを目的とした。

方法：生化学的解析で決定した *N. aromaticivorans* LOV-HTH の DNA 結合配列モチーフをゲノム DNA 配列から検索し、相同性の高い配列をプロモーター領域に持つ遺伝子を抽出した。青色光照射した細胞から RNA を調製して逆転写後、候補遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR で定量し、青色光で mRNA 量が増加する遺伝子を探索した。

結果・考察：123 遺伝子を調べたところ、*Saro1759*, *Saro1229*, *Saro1230*, *Saro3053* の 4 遺伝子の mRNA 量が青色光照射で顕著に増加した。*Saro1759* は紫外線で DNA に形成されるピリミジン二量体を修復する光回復酵素遺伝子、*Saro1230* は光回復酵素に結合するアンテナ色素の合成経路の GTP シクロヒドロラーゼ遺伝子であった。*Saro1229* は機能未知の酸化還元酵素遺伝子であるが、*Saro1230* のすぐ下流に位置し、オペロンを組むと予想されたため、アンテナ色素合成に関わると考えられた。LOV-HTH を介する光回復酵素生合成の光調節機構の存在が明らかとなった。植物や菌類でも光回復酵素遺伝子の発現が光で調節され、植物ではクリプトクロム、菌類では WC-1 が光受容体であることが分かっている。異なる光受容体が関与することから、光回復酵素遺伝子発現の光調節機構は、それぞれの生物種が収斂的に獲得した光環境応答機構であると考えられる。これは、光回復酵素遺伝子発現の光調節機構が、*N. aromaticivorans* のみならず多くの生物が、地球環境で生きるための重要なしくみであることを示しており、他のバクテリアも同様の調節機構を持つと予想できる。*Saro3053* は fasciclin をコードし、N 末端のシグナル配列からペリプラズムに局在することが予想された。Fasciclin は細胞間接着や光酸化ストレス応答など多様な働きが報告されている。*N. aromaticivorans* で fasciclin の機能や光で発現調節される生理的意義は不明であるが、短時間の青色光照射が *N. aromaticivorans* の増殖を阻害することが分かり、この現象との関連などを検討し、fasciclin が関与するバクテリアの光環境応答機構を明らかにしていきたい。

発酵研究所助成研究報告 第31号【非売品】

平成29年12月10日 印刷

平成29年12月20日 発行

編集委員長 中瀬 崇  
編集委員 伊藤忠義, 熊谷 英彦, 阪井康能  
左子芳彦, 下田 親, 徳増征二  
坂野 勲, 横田 明

発行人 樽井直樹

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







