

第 15 回 助 成 研 究 報 告 会

日 時 : 2021年6月11日 (金) 13:00~16:00

開催形式 : オンライン開催



公益財団法人 発 酵 研 究 所

プ ロ グ ラ ム

＊WEB会議システムを利用したライブ配信を行います。

開会挨拶 公益財団法人発酵研究所理事長（13:00～13:05）

事務局からの連絡（13:05～13:10）

2019年度大型研究助成＜口頭発表＞（13:10～14:50）

O-1 遺伝子ドーピングによる希少系統群微生物の革新的分離培養法の構築

加藤 創一郎（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

座長：高橋 洋子（北里大学名誉教授）

O-2 細菌における細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解明と細胞外タンパク質生産場構築への応用

栗原 達夫（京都大学化学研究所）

座長：大島 敏久（大阪工業大学客員教授）

O-3 未だ活用できていない酢酸菌の新規な酸化物質変換系の探索

薬師 寿治（山口大学中高温微生物研究センター）

座長：大島 敏久（大阪工業大学客員教授）

O-4 化学物質の還元反応に寄与する異種微生物間の固体腐植を介した細胞外電子伝達機構の解明

片山 新太（名古屋大学未来材料・システム研究所）

座長：藤田 正憲（大阪大学名誉教授）

休憩（14:50～15:00）

2015年度寄付講座助成＜口頭発表＞（15:00～15:45）

O-5 光合成原核生物の新規菌株の分離分類とバイオリソース化およびそれらを含む複合微生物系の環境・エネルギー産業活用を目指した研究シーズの開発

花田 智（東京都立大学理学研究科光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座）

座長：未定

* オンデマンド配信となります。6月11日から25日までにご連絡した専用URLからご視聴ください。

2019年度一般研究助成、2018年度若手研究者助成、

2016年度、2017年度、2018年度寄付講座助成（中間報告） <ポスター発表>

P-1 DNAバーコードと標本を活用したビョウタケ目ヘソタケ科の探索・分類・系統学的研究

細矢 剛（国立科学博物館植物研究部）

P-2 有用生物資源としての日本産クロボ菌類由来の担子菌酵母の菌株確立

田中 栄爾（石川県立大学生物資源環境学部）

P-3 昆虫病原糸状菌の選択的分離法と培養菌株の確立、および分類学的研究

伴 さやか（千葉大学真菌医学研究センター）

P-4 ハラタケ綱（Agaricomycetes）における外生菌根菌の進化と多様化の解明

佐藤 博俊（京都大学大学院人間・環境学研究科）

P-5 アフリカ（旧世界）で初めて分離された新世界型回帰熱ボレリア、*Candidatus Borrelia fainii*、の全ゲノム比較解析ならびに表現型解析による分類・進化・系統学的検討

邱 永晋（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）

P-6 渦鞭毛藻－自由生活性バクテリアの“緩やかな共生関係”の解明とその情報を利用した無菌化技術の開発

鈴木 重勝（国立環境研究所生物・生態系環境研究センター）

P-7 鉱物による直接的な代謝促進を利用した難培養性微生物の新規単離技術の確立

五十嵐健輔（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

P-8 嫌気的芳香族系廃水処理に特化したDPANN上門アーキアの培養とその生態学的意義の解明

黒田 恭平（都城工業高等専門学校物質工学科、現 産業技術総合研究所 生命工学領域）

P-9 地衣に共生する担子菌酵母の分布と多様性を紐解く

清水 公德（東京理科大学先進工学部）

P-10 海生変形菌は存在するのか－変形体および子実体形成能の検証から変形菌の分類学的定義を議論する

矢島 由佳（室蘭工業大学大学院工学研究科）

P-11 節足動物消化管の内外双方で異なる生活ステージを持つ腸内外両生接合菌類の探索

出川 洋介（筑波大学生命環境系山岳科学センター）

P-12 キノコ類（子囊菌および担子菌）を起源とする新規抗生物質探索のための分子育種法の構築

渡辺 賢二（静岡県立大学薬学部）

- P-13 黒酢醸造に関わる酢酸菌の優占化機構に関する研究
石井 正治（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- P-14 細菌性ウイルス様粒子GTAによる環境適応機構の分子基盤
清水 隆之（東京大学大学院総合文化研究科）
- P-15 次世代型プレバイオティクスを用いた腸内細菌叢制御
中井 博之（新潟大学農学部）
- P-16 *Frankia*属放線菌の窒素固定と樹木との共生に関わる遺伝子の同定
九町 健一（鹿児島大学大学院理工学研究科）
- P-17 二次代謝産物の生物学的意義解明による放線菌潜在能の開拓
木谷 茂（大阪大学生物工学国際交流センター）
- P-18 次世代バクテリアセラピーを可能にするための微生物の体内制御技術
黒田 章夫（広島大学大学院統合生命科学研究科）
- P-19 海藻多糖フコイダンの微生物分解酵素系の解明とアミロイド線維抑制効果
大城 隆（鳥取大学工学部）
- P-20 細菌の菌体内外に生じるセレンナノ粒子の生成機構の解明とバイオアベイラビリティに関する研究
三原 久明（立命館大学生命科学部）
- P-21 微生物がつくりだすガラクトオリゴ糖合成酵素の機能改変一次世代型プレバイオティクスの生産基盤の構築—
田中 俊一（立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構、現 京都府立大学大学院生命環境科学研究科）
- P-22 *Bacillus*属細菌由来のべん毛モーター蛋白質を利用したナトリウムイオンセンサープローブの開発
南野 徹（大阪大学大学院生命機能研究科）
- P-23 微生物のもつシームレスクローニング活性を利用した新規シームレスDNAクローニングシステムの開発
本橋 健（京都産業大学生命科学部）
- P-24 メタノール濃度に応答するシグナル伝達と転写制御機構の解明
由里本博也（京都大学大学院農学研究科）
- P-25 プロバイオティクス有用菌の消化管内定着性向上を目指した基盤技術の創製
小川 哲弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- P-26 大腸菌の呼吸鎖変異株が示す異常代謝の解析と産業利用
横田 篤（北海道大学大学院農学研究院）
- P-27 ω 3系高度不飽和脂肪酸の微生物変換の解析とその応用に関する研究
小川 拓哉（京都大学化学研究所）

- P-28 電氣的膜電位制御に基づく細菌間相互作用の制御法の開発とそのデバイス化の検討
長峯 邦明 (山形大学大学院有機材料システム研究科)
- P-29 分裂酵母胞子表層タンパク質の特性を生かした新奇の異種タンパク質発現・分泌生産・胞子細胞表面提示システムの構築
今田 一姫 (鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科)
- P-30 耐熱性シアノバクテリアと微小電極を使って単光子を捉える
山野井慶徳 (東京大学大学院理学系研究科)
- P-31 シアノバクテリアを用いた非枯渇性資源生産基盤株の開発
景山 伯春 (名城大学理工学部)
- P-32 自己生成させたポルフィリン色素を光増感剤として利用する光駆動型の微生物触媒反応によるバイオ水素生産
本田 裕樹 (奈良女子大学大学院自然科学系)
- P-33 高耐熱性バイオポリエステル微生物生産のための遺伝子資源探索
柘植 丈治 (東京工業大学物質理工学院)
- P-34 地下圏の難分解性有機物を電気微生物分解してメタンを生成する微生物群集中の電子授受機構の解明
石井 俊一 (海洋研究開発機構海底資源研究開発部門、現 海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門)
- P-35 亜硝酸・硝酸イオントランスポーターが脱窒細菌の亜酸化窒素の親和性へ及ぼす影響評価
寺田 昭彦 (東京農工大学大学院工学研究院)
- P-36 南北両極アイスコアに眠る古代菌類から見た過去70万年の菌類の進化とその環境適応
辻 雅晴 (国立極地研究所、現 旭川工業高等専門学校物質科学工学科)
- P-寄1 細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と環境細菌の高度利用および未開拓潜在機能開発への応用
永田 裕二 (東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座)
- P-寄2 生物間相互作用解析を基軸にした糸状菌の潜在機能の開拓と利用
萩原 大祐 (筑波大学大学院生命環境科学研究科糸状菌相互応答学寄付講座)
- P-寄3 革新的技術による輸送系膜タンパク質機能の解明と「微生物膜輸送工学」への応用展開
川崎 寿 (東京大学大学院農学生命科学研究科微生物膜輸送工学寄付講座)

要旨(大型研究助成)

遺伝子ドーピングによる希少系統群微生物の革新的分離培養法の構築

加藤 創一郎（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

[背景・目的]

これまでに人類が分離培養に成功した微生物は、環境中の微生物のわずか 1% 程度に過ぎないと言われている。多くの微生物を分離培養できない要因は、微生物が住む自然環境と実験室内の培養環境との乖離にある。これまでの研究では、培養条件を改変し自然環境に近づけることでその解決が図られてきた。しかし究極的には実験的に自然環境を完全に再現するのは不可能であり、未知微生物の培養化効率の飛躍的な向上には大きなブレークスルーが必要である。本研究ではそのブレークスルーとして、遺伝子導入による対象微生物への特定機能の付与、すなわち遺伝子ドーピングにより、難培養微生物を人為的に改変し実験室内での培養を可能にできないか、という逆転の発想に基づき研究を行った。

[方 法]

本研究では、遺伝子を導入する対象として（1）分離例が非常に少ない希少系統群微生物（Verrucomicrobia 門）、（2）一般的な培地調整の過程で発生するレベルの活性酸素に感受性を持つ微生物、の 2 つを選択した。それぞれの微生物に対する遺伝子導入法の検討を行った後、遺伝子導入による機能付加・培養可能化を検証した。

[結果・考察]

（1）Verrucomicrobia 門の既知単離株 9 株を使用し遺伝子導入法を検討した。様々な遺伝子導入法や複数の広宿主域プラスミドを検討したものの安定に機能するものは得られなかったが、トランスポソームを用いた手法により一部の菌種にはゲノムへの外来遺伝子導入が可能であることを見出した。（2）寒天培地中の活性酸素濃度を変えた条件で微生物の分離培養を試み、目（order）レベルで新規な微生物を含む活性酸素感受性菌を多数得ることができた。その単離株について遺伝子導入法を検討し、一部の株について安定に遺伝子導入ができる系を構築した。感受性株に大腸菌由来の抗酸化酵素を導入することで、培地調整時に発生する活性酸素に対する抵抗性を付与可能であることを実証した。（3）本来は上記の結果をもとに、環境中の微生物群集に対し遺伝子を導入し、それにより培養効率を向上可能か試験する予定であった。外部研究機関協力の下、感染性微生物でも使用出来る P3 施設にて実験を行う算段を立てていたが、一昨年度よりの感染症問題による様々な制限のため助成期間中の実施がかなわず、現在引き続き実験を行っている。

細菌における細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解明と細胞外タンパク質生産場構築への応用

栗原 達夫（京都大学化学研究所）

[背景・目的]

細菌が生産する細胞外膜小胞は、細胞間コミュニケーション、環境中の栄養素の利用など、生理的に重要な多くの機能を担っている。ワクチンやドラッグデリバリーのキャリア、生体触媒等としての応用も期待されている。本研究は膜小胞高生産性細菌を用いて、膜小胞形成の分子機構、特に特定のタンパク質が膜小胞に輸送される仕組みを明らかにし、膜小胞をプラットフォームとしたタンパク質の細胞外生産系開発の基盤を構築しようとするものである。

[方 法]

アジの腸内容物から分離された *Shewanella vesiculosa* HM13 は直径 50 nm 程度の膜小胞を細胞外に高生産する。この膜小胞には約 49 kDa のタンパク質 P49 が主要成分として積み込まれている。本菌の全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子周辺には、P49 の膜小胞積み込みへの関与が示唆される遺伝子群が見いだされた。それらの破壊実験や膜小胞成分の分析、*in vitro* 積み込み実験などによって、P49 の膜小胞積み込み機構を解析した。

[結果・考察]

P49 遺伝子上流に、分泌タンパク質の外膜透過に関与するⅡ型分泌装置（T2SS）のホモログをコードする遺伝子群が見いだされた。これらの破壊によって P49 の膜小胞移行が見られなくなったことから、T2SS 様の分泌装置が P49 の分泌を担うと考えられた。一方、P49 遺伝子の周辺には、表層糖鎖生合成への関与が示唆される遺伝子群も見いだされた。これらの破壊株の大部分では、親株由来の膜小胞画分に見られた多糖が消失していた。また、これらの破壊株では、P49 は細胞外に分泌されたものの、膜小胞へは積み込まれなかった。さらに、各種遺伝子破壊株由来の膜小胞と精製 P49 を *in vitro* でインキュベートしたところ、T2SS 様分泌装置欠損株由来の膜小胞には P49 が積み込まれたが、表層多糖欠損株由来の膜小胞には P49 は積み込まれなかった。また、P49 を積み込んだ膜小胞の電子顕微鏡観察では膜小胞の周囲に 10 nm 程度の微粒子が観察されたのに対し、P49 を欠損した膜小胞では、そのような微粒子は観察されなかった。これらの結果から、P49 は T2SS 様分泌装置によって細胞外に輸送され、表層多糖との相互作用によって膜小胞に積み込まれると考えられた。

未だ活用できていない酢酸菌の新規な酸化的物質変換系の探索

薬師 寿治（山口大学中高温微生物研究センター）

[背景・目的]

酢酸菌は、他の微生物にはあまり見られない酸化的物質変換能を持つ。その細胞膜の外側に存在する脱水素酵素（以下、表層脱水素酵素と呼ぶ）が、基質の酸化を行う。ゲノム情報の解析に伴い、多くの「オーファン表層脱水素酵素」が見いだされたが、機能未知のままとなっている。本研究は、一つ目の課題として、新しい表層脱水素酵素による物質酸化系の探索を行った。二つ目の課題として、既知の表層脱水素酵素による新しい物質酸化系の探索を行った。

[方 法]

Gluconobacter 属酢酸菌をプラットフォーム株として遺伝子破壊と遺伝子過剰発現を行った。主要な第一級アルコール酸化酵素であるアルコール脱水素酵素（ADH）と第二級アルコール酸化酵素であるグリセロール脱水素酵素（GLDH）の遺伝子を破壊した菌株を発現宿主に用いた。PQQ-DH9 と名付けたオーファン酵素をコードする *pqq9* 遺伝子を ADH と GLDH の二重遺伝子破壊株に過剰発現させた。加えて、二つ目の課題のためにグルコース脱水素酵素（GDH）を過剰発現させた。

[結果・考察]

オーファン酵素 PQQ-DH9 は、二重遺伝子破壊株に過剰発現させることによって、その酵素活性を調べることができた。言い換えると、PQQ-DH9 は本研究の培養条件では染色体からほとんど発現していないクリプティック酵素であった。幅広い直鎖状の第二級アルコールを基質としたが K_M 値は GLDH のそれよりも高かった。一方、環状の第二級アルコールでは GLDH のそれと同程度であった。PQQ-DH9 はシクロヘキサンジオールを最良の基質とし、環状基質に高い特異性を持つ第二級アルコール酸化酵素であると結論した。

加えて、ラクトースを GDH によって酸化することで、ラクトビオン酸の生産を行った。GDH のラクトース酸化活性はグルコースのその 0.5% 程度しかなく、 K_M 値を算出できないほどラクトースに対する親和性は低かった。しかしながら、GDH を過剰発現させることで、より高速のラクトビオン酸生産が行える菌株を構築することができた。

化学物質の還元反応に寄与する異種微生物間の固体腐植を介した細胞外電子伝達機構の解明

片山 新太（名古屋大学未来材料・システム研究所）

[背景・目的]

細胞外固体電極と直接電子授受を行う能力を持つ電気微生物（*Geobacter* 属や *Shewanella* 属細菌）では、導電性繊維や c 型チトクロームタンパクを介する細胞外電子伝達メカニズムが明らかにされてきたが、固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達では、それ自身が固体電極と直接電子伝達の能力を持たない非電気微生物（*Pseudomonas stutzeri* 等）でも、細胞外電子伝達による還元反応促進が観察されており、固体腐植ヒューミン特有の電子伝達メカニズムが想定される。そこで、本研究では、固体腐植ヒューミンを介した細胞外電子伝達メカニズムを解明することを目的とした。

[方 法]

固体腐植ヒューミンを最終電子受容体とする嫌気性条件でヒューミン還元嫌気微生物を集積し、16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンスにより群集構造を調べた。一方、ヒューミンを電子供与体として用いヒューミン酸化嫌気微生物を探索した。更に、ヒューミン酸化微生物である *P. stutzeri* を対象に網羅的遺伝子発現解析を行い、関連遺伝子を調べた。また同様に窒素固定菌に注目して、固体腐植ヒューミンから窒素固定菌への電子伝達メカニズムを調べた。また、ヒューミンの持つ酸化還元電位と微生物反応の酸化還元電位の関係を調べ、細胞外電子伝達系の熱力学的な妥当性を考察した。

[結果・考察]

ヒューミン還元微生物群では、Planctomycetota 門、Armatimonadota 門、Actinobacteriota 門が、ヒューミン特異的に存在比が増加していた。嫌気性ヒューミン酸化微生物として、脱ハロゲン微生物、鉄還元微生物、硝酸還元微生物が知られていたが、更に酢酸生成微生物と窒素固定微生物が見いだされた。これは、固体腐植ヒューミンが多様な酸化還元電位の反応に細胞外電子伝達できることを示唆している。さらに、窒素固定菌では固体腐植ヒューミンによって ATP 生成およびニトロゲナーゼ還元が促された。*P. stutzeri* の網羅的遺伝子発現解析では、固体腐植ヒューミンによりバイオフィーム抑制系が発現上昇したが、硝酸還元呼吸系は変化しなかった。以上から、固体腐植ヒューミンから微生物細胞への電子伝達では、呼吸系の変化が無い一方で、細胞表面構造を固体腐植ヒューミンに適応させて電子を受け取って活性化しているものと考えられる。

要旨(寄付講座助成)

光合成原核生物の新規菌株の分離分類とバイオリソース化およびそれらを含む複合微生物系の環境・エネルギー産業活用を目指した研究シーズの開発

花田 智 (東京都立大学理学研究科光合成複合微生物系の環境・エネルギー活用シーズ開発寄付講座)

[背景・目的]

シアノバクテリアを含む光合成原核生物を主体する微生物生態系は、地球上の太陽光の当たるさまざまな環境に発達している。これら光合成複合微生物系は、光エネルギーを化学エネルギー変換する高いポテンシャルを持っている。しかし、光合成複合微生物系の主要構成者である光合成原核生物の活用開発研究だけでなく、それらの基礎的な研究も十分に進んでいない。現在までに光合成原核生物は、細菌界の七つの門に見ついているが、その系統的、生理的多様性の理解も不十分である。本研究では、エネルギー・環境問題の解決に資する光合成複合微生物系の維持・制御のための基礎的な技術開発および活用シーズの発見を目指し、新規光合成原核生物の発見・特性解明とともに、高温環境に発達する好熱性光合成複合微生物系の機能解明を目的とした。

[結果・考察]

1. 光合成微生物複合系の形成・維持機構

シアノバクテリアが優占化し、約 3mm 厚まで生長する長野県中房温泉の微生物マットについて、その層構造を明らかにした。表層部にはシアノバクテリアが優占するが、中央部には多様な光合成細菌が共存していることが明らかになった¹⁾。さらに最深部からは未培養の *Chlorobi* 細菌が検出された。微小電極を活用した酸素濃度勾配、透過光波長分布解析から、多様な細菌の共存機構を推定できた。さらに、微生物マットに異なる波長の光を照射し、群集構造の変化を観察することで、各光合成細菌の他菌に与える影響を明らかにできた²⁾。

糸状性酸素非発生型光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* は温泉微生物マットを形成する主要種のひとつであるが、その光独立栄養生育能は実証されていなかった。本研究では分離株を用いて、硫化水素に依存した独立栄養生育能を初めて確認することに成功した³⁾。さらに、微生物マットの遺伝子転写解析から、本菌が日照量に応じて、電子源（硫化水素、水素、有機物等）を使い分けていることを明らかにした⁴⁾。以上から、*Chloroflexus* が多様なエネルギー代謝を有し、シアノバクテリアと協調して、効果的に光合成微生物複合系を形成していることが分かった。

2. 新規酸素非発生型光合成細菌 *Chloracidobacterium* の発見とその特性

Chloracidobacterium 属細菌は、Tank らによって 2015 年に *Acidobacterium* 門に初めて見つかった新規系統の好熱性光合成細菌である。本研究では光合成反応中心の生化学的

特徴を解明するとともに^{5), 6)}、新たに *Chloracidobacterium* 属を分離することに成功し、それらのゲノム比較から多様性を明らかにした⁷⁾。また、ゲノムには炭酸固定関連遺伝子が見つからないが、その生育には CO₂ の添加が促進的に働くことが示された。安定同位体標識した CO₂ を用いたトレース解析から、本菌の原始的な CO₂ 利用代謝経路を明らかにした⁸⁾。

3. 好熱性シアノバクテリアの多様性

好熱性シアノバクテリアの系統・生理的多様性の調査は少ない。陸上温泉を対象にした環境 DNA 解析からその分布と多様性を明らかにするとともに^{1), 9), 10)}、*Leptolyngbya*、*Chlorogloeopsis*、*Chrookolemma* 系統群の新規好熱性株の培養に成功し、分子系統および生理学的特性を解析した¹¹⁾。また赤色光利用性や生育可能温度域の解析から、多種が共存・棲み分けする仕組みを明らかにした。

4. 好気性光合成細菌の分布と多様性

好気性光合成細菌は、主に酸素呼吸で生きるとともに光エネルギーも利用する、光合成能の進化および活用を考えるうえで重要な細菌群である。本研究では非培養法によって河川環境における好気性光合成細菌の分布と多様性を明らかにするとともに^{12), 13)}、新規好気性光合成細菌を分離培養に成功し、*Aquabacterium* 属¹⁴⁾、*Roseobacter* 属¹⁵⁾、*Litoreibacter* 属¹⁶⁾ の新種を報告・提案するとともに、既報の細菌群の生理的性質を見直し、光合成能が広くプロテオバクテリアに分布していることを明らかにした¹⁷⁾。

1) Martinez *et al. Microbes Environ.* (2019), 2) Nishida *et al. PLoS ONE* (2018), 3) Kanno *et al. Microbes Environ.* (2019), 4) Kawai *et al. Microorganisms* (2021), 5) Zill *et al. Photosynth. Res.* (2018), 6) He *et al. Photosynth. Res.* (2019), 7) Saini *et al.* in preparation, 8) Saini *et al.* in preparation, 9) Thiel *et al. Front. Microbiol.* (2016), 10) Thiel *et al. Front. Microbiol.* (2017), 11) Sato *et al.* in preparation, 12) Sato-Takabe *et al. Water* (2020), 13) Hirose *et al.* in preparation, 14) Hirose *et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2020), 15) Muramatsu *et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2020), 16) Kanamuro *et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2020), 17) Tarhriz *et al. Antonie van Leeuwenhoek* (2019)

要旨(一般研究助成)

DNA バーコードと標本を活用したビョウタケ目ヘソタケ科の 探索・分類・系統学的研究

細 矢 剛 (国立科学博物館植物研究部)

バーコード (ITS-5.8S) シーケンスを利用して、多様だが形態的特徴で属～種レベルでの識別が困難なビョウタケ目ヘソタケ科の種同定を行った。新たに得られた培養株に加え、国立科学博物館に保存されていた 186 株のバーコードデータを取得し、98.5%以上の相同性をもつ配列どうしをまとめたところ、2～19 点の標本を内包する約 30 のクラスターが検出された。各クラスターの代表配列をもとに NCBI データベースからタイプ種由来か、カルチャーコレクションの菌株由来で、98.5%以上の相同性をもつ種同定済みの配列を BLAST 検索して抽出し、これらとともに NJ 法で系統解析したところ、既知種と近い遺伝的距離を有し、高いブートストラップ値 (≥ 90) で支持される複数のクレードが多数認められた。文献情報などをもとに、これらの種の形態と、同一クラスターとなった標本を比較した結果、形態はよく一致し、*Mollisia* 5 種、*Phialocephala* 8 種の日本新産種を明らかにすることができた。

有用生物資源としての日本産クロボ菌類由来の担子菌酵母の菌株確立

田 中 栄 爾 (石川県立大学生物資源環境学部)

担子菌酵母は、主に野外の様々な分離源からスクリーニングによって分離され、物質生産や酵素生産などの有用な生物資源として農芸化学分野で研究が進められてきた。一方で、分子系統学的研究により、多くの担子菌酵母は植物病原菌として知られるクロボ（黒穂）菌類の無性世代であることが明らかにされてきた。このことから、クロボ菌類の無性世代の菌株は、これまでの方法では得ることができなかった担子菌酵母の分離源と考えられ、潜在的な有用生物資源といえる。本研究では、野外で採集した日本産のイネ科植物やタデ科植物に寄生するクロボ菌類を確実に同定し、そのクロボ胞子を発芽させて無性世代である担子菌酵母の菌株を確立することを目的とした。また、これらの菌株を菌株保存機関に寄託して広く利用可能な状態にすることも目的とした。これまで分類学的に未確定の種を含め 25 種以上のクロボ菌類の分離培養に成功した。そのうち 5 種を日本新産種として報告し、分類学的に確実な 10 種の菌株を菌株保存機関 (NITE) に寄託した。

昆虫病原糸状菌の選択的分離法と培養菌株の確立、および分類学的研究

伴 さやか（千葉大学真菌医学研究センター）

昆虫（節足動物含む）病原性真菌のうち、いわゆる冬虫夏草類（Ascomycetes；Sordariomycetidae; Hypocreales）には 500 種近くが知られている。しかし 1900 年代に日本から記載された 200 種以上のタイプ標本の多くは、ホルマリン浸漬などの理由から DNA 情報が得られないため、これら希少種の分子生物学的な系統位置を把握することは分類学上重要な課題となっている。本研究では、それらの種のタイプ・ロカリティーである東京大学秩父演習林（埼玉県秩父市大滝）の広葉樹混生林に於いて、夏季を中心に 8 回採取調査を行った。得られたサンプルは形態観察と rRNA ITS 領域の塩基配列により同定し、選択培地の開発を目指して 2 種類の培地での生育比較を行った。結果として、その他の関東地域で採取されたサンプルも含めて 95 標本を収集し、純粋培養株として 28 種 53 株を確立した。生育試験では、*Ophiocordyceps* 属の生長が全体的に遅く、培養条件の再検討が必要であった。これらの菌株により、新種と思われるものや現在分類学上の問題がある種の再分類において、有意義な知見が蓄積することが期待される。

ハラタケ綱（Agaricomycetes）における外生菌根菌の進化と多様化の解明

佐藤 博俊（京都大学大学院人間・環境学研究科）

温帯・熱帯林の優占樹種の相利共生菌である外生菌根菌は、様々な腐生菌・寄生菌の系統から平行進化したとされるが、その適応放散がいつ、どのような系統で生じたかはよく分かっていない。本研究では、ハラタケ綱（Agaricomycetes）の分子系統推定から、外生菌根菌の進化と多様化のパターンを探ることを目的とした研究を行った。分子系統推定に用いる DNA 試料として、日本国内から採取したハラタケ綱菌類を 196 種選別し、開発済みの PCR プライマーを用いて、96 個の核シングルコピー遺伝子の塩基配列を高スループットシーケンサーによって解読した。同時に、ゲノム解読の進んでいる 242 種のハラタケ綱菌類について、同じ遺伝子の配列をゲノムデータベースから入手して解析に加えた。合計 438 種について、19,086 塩基の連結配列に基づいて最尤法による分子系統推定を行った。解析の結果得られた最尤系統樹では、多くのノードが高いブートストラップ確率で支持されており、ハラタケ綱菌類の分類群間の系統関係を従来の研究よりも高い精度で推定することができた。ベイズ法による分子系統推定や多様化速度の推定についても、研究を進めている。

アフリカ（旧世界）で初めて分離された新世界型回帰熱ボレリア、*Candidatus Borrelia fainii*、の全ゲノム解析ならびに表現型解析による分類・進化・系統学的検討

邱 永 晋（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター）

回帰熱はボレリア属細菌による感染症の一種で、適切な治療が行われなかった場合、高い致死率を示すことが知られている。本疾患は節足動物によって伝播される人獣共通感染症で、中央アジア、サブサハラ周辺アフリカ、南欧、北アメリカで罹患例が報告されている。回帰熱ボレリア属細菌は、地理的・遺伝子学的にアフリカ大陸に分布する旧世界型と北米大陸に分布する新世界型に大別される。これまで、新世界型ボレリアのアフリカ内での検出が散発的に報告されていたが、申請者らはヒト病原性がある新世界型ボレリア（*Candidatus Borrelia fainii*）をザンビア共和国において世界で初めての分離に成功した。昨年と今年、立て続けに中国のコウモリから *Candidatus Borrelia fainii* の遺伝子が検出されたという報告がなされており、かなり広範囲に本ボレリア菌種が分布していると思われる。本研究では、分離された新世界型ボレリア細菌のゲノム情報の取得・比較、電子顕微鏡による形態の観察、感染実験による病原性の解析を行った。その結果、*Candidatus Borrelia fainii* は、951,503 bp のゲノムを持つこと、長さ 20 μ m で太さ 300nm の螺旋状の形態をしていること、マウス（C3H、BALB/c）には感染しないことが分かった。

渦鞭毛藻－自由生活性バクテリアの“緩やかな共生関係”の解明とその情報を利用した無菌化技術の開発

鈴木 重勝（国立環境研究所生物・生態系環境研究センター）

自由生活性バクテリアは一部の藻類と相互作用しており、藻類の成長や増殖に対して影響を及ぼすことが知られている。そのため、藻類とバクテリアの相互作用の理解は、藻類培養株の維持管理や、細胞の無菌化プロセスの最適化に重要である。本研究では、無菌状態で増殖しない赤潮形成性渦鞭毛藻 *Prorocentrum dentatum* を用いて、共在バクテリアとの相互作用を明らかにした。*P. dentatum* NIES-900 株に共在した 2 種のバクテリア *Alteromonadales* sp. と *Cytophagales* sp. の培養株を確立しゲノム配列を得た。そのゲノム情報をもとに予測された、バクテリアの 5 種の代謝産物を含む mIMK 培地を開発した。この培地を用いて、採集地が異なる 4 株の *P. dentatum* の無菌化に成功した。NIES-900 株以外の 3 株の共在バクテリアのメタゲノム解析を行ったところ、その種組成は大きく異なるが、同様の代謝産物の産生能があることが示唆された。さらに、共在バクテリアは渦鞭毛藻の鎧板を構成するセルロースを炭素源として利用できることがわかった。したがって、*P. dentatum* と共存自由生活性バクテリアには代謝産物を介した相互作用があると考えられる。

鉱物による直接的な代謝促進を利用した難培養性微生物の新規単離技術の確立

五十嵐 健輔（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

磁硫化鉄（グライナイト、 Fe_3S_4 ）は様々な嫌気環境に存在しており、その結晶構造は生物がもつ鉄イオウクラスターに類似していることが知られている。この鉱物は、特に嫌気性で独立栄養性の細菌とアーキアの増殖を促進する活性をもつことが報告されている。本研究では、この磁硫化鉄のもつ増殖促進作用を利用して、環境中から難培養性の微生物を培養・単離することを目的とした。種々の嫌気環境由来の微生物源を、グライナイトを添加した培地を用い、独立栄養および従属栄養条件で集積培養した。グライナイトによる増殖促進と菌叢への影響が見られた各培養物を用い、グライナイト粒子および、その抽出物を添加したプレート培養による単離を行った。その結果、特に *Clostridiales* 目、または *Bacteroidales* 目に属し、近縁種と比較的低い相同性（16S rRNA 遺伝子で約 94 ~ 96%）を示す複数の株（例えば *Tepidibacter* 属や *Prolixibacteraceae* 科などの株）を単離することに成功した。いずれの単離株もグライナイト存在下で増殖促進を示した。単離株の比較ゲノム解析から、鉄イオウクラスター依存的な代謝がグライナイトによる増殖促進と関連する可能性が示された。本研究から、生理活性をもつ鉱物を用いた微生物の単離手法の有効性が示された。

嫌氣的芳香族系廃水処理に特化した DPANN 上門アーキアの培養とその生態学的意義の解明

黒田 恭平（都城工業高等専門学校物質工学科、現 産業技術総合研究所生命工学領域）

本研究では、芳香族系廃水を処理する上昇流嫌気性スラッジブランケット（UASB）反応槽で優占して検出された、DPANN アーキアの培養を行い、その生態学的意義の解明を行うことを目的とした。ポリエチレンテレフタレート（PET）製造模擬廃水を処理する UASB 反応槽保持汚泥、活性汚泥、下水消化汚泥を対象としたショットガンシーケンス解析を行った結果、Woesearchaeota、Pacearchaeota、Iainarchaeota、Micarchaeota に属する 5 種の DPANN アーキアの高品質ゲノムを得た。最も DPANN アーキアのゲノムを回収した UASB 反応槽保持汚泥を植種源とし、集積培養を試みた結果、2 種の DPANN アーキアを原核生物全体の 2 ~ 6% まで優占化させることに成功した。16S rRNA 遺伝子解析結果を基にして Spearman の順位相関係数を算出した結果、これら DPANN アーキアが *Methanosaeta*、*Methanosarcina*、*Methanoregula* と強い正の相関（ $p < 0.001$ ）を持つことが明らかとなり、メタン生成アーキアが宿主である可能性を示唆した。

地衣に共生する担子菌酵母の分布と多様性を紐解く

清水 公徳（東京理科大学先進工学部）

近年、地衣体には担子菌酵母が普遍的に共生していることが示唆されたことから、本研究では、*Cladonia rei*（ツエハナゴケ）を用いて地衣体に共生する担子菌酵母の特徴を調査するため、微生物学および分子生物学的検討を行った。

千葉および神奈川の 15 地点で採取した *C. rei* について担子菌酵母の分離を試みたところ、8 地点で採取した *C. rei* から 41 株の担子菌酵母が分離された。リボソーム ITS 配列を比較した結果、これらは 25 種類の異なる ITS 配列をもつものの、いずれも *Cyphobasidium* 属に近縁であることが示唆された。さらに、LSU、および SSU rDNA 遺伝子領域の塩基配列データに基づく系統解析の結果、これらの担子菌酵母は、Microsporomycetaceae 科に属する 6 系統に分類された。

C. rei 地衣体に複数種類の担子菌酵母が共生することが明らかになったため、真核生物の ITS 配列を用いてメタゲノム解析を行い、地衣体内の微生物相について解析を試みた。その結果、地衣体に含まれる担子菌酵母の割合は地衣類や藻類と比較して圧倒的に低いことが明らかになった。さらに、担子菌酵母特異的プライマーにより増幅された ITS 配列を用いてメタゲノム解析を行ったところ、いずれの地衣体にも 10 種類以上の異なる担子菌酵母が存在することが示唆された。

海生変形菌は存在するのか—変形体および子実体形成能の検証から変形菌の分類学的定義を議論する

矢島 由佳（室蘭工業大学大学院工学研究科）

これまで子実体と変形体期を生活環に持つアメーバ様の生物が、変形菌として分類されてきた。しかし「例外」も示唆され、近年はどちらも報告のない水生アメーバが分子系統解析から変形菌に属する可能性が報告されている。陸生変形菌は陸水に適応できる可能性が示されているが、海生ウニから単離された変形菌と推定されるアメーバは、変形体も子実体も確認されず、追加報告もない。そこで本研究では、海生ウニや海藻、海水、海砂から変形菌を探索し、陸生変形菌の耐塩性も検討した。その結果、ウニや海藻、海水から変形菌は単離されず、海砂の培養物から *Arcyria* 属と推定されるアメーバが単離された。このアメーバの変形体形成は今のところ見られていない。陸生変形菌では、*Didymium* 属種で塩分を含む条件でアメーバの増殖が見られたが、非含塩培養で変形体を形成した種類が、含塩培養では変形体形成が見られなかった。したがって、変形菌には含塩環境にも適応できる種類が存在し、含塩条件で変形体形成が見られないとしても変形体形成能を持たないことを意味せず、現行の分類学的定義が直ちに否定されるわけではないことが示唆された。

節足動物消化管の内外双方で異なる生活ステージを持つ 腸内外両生接合菌類の探索

出川 洋介（筑波大学生命環境系山岳科学センター）

トリモチカビ門キクセラ亜門には節足動物の腸内菌と土壌・糞などに生育する腐生菌が知られてきたが、双方の特徴を併せ持つ“腸内外両生菌”と称すべき生態群を発見した。バッタ目のカマドウマ科及びコオロギ科昆虫の前胃には未記載属の形態的に区別される2種の腸内外両生菌が高頻度に生息している。各々の宿主を交換して孢子摂食試験を実施した結果、各種の感染頻度は本来とは異なる宿主において有意に減少することがわかった。また付着構造を観察した結果、2種とも孢子の修飾部が前胃の剛毛を挟み腸内に滞留するが、コオロギ科では摂食時に孢子の一部が溶解して修飾構造が露出することが判明した。分子系統解析により、この未記載属と近縁と判明した *Myconymphaea yatsukahoi* はキクセラ目の新属新種として2000年に昆虫死骸より発見された菌だが、本種がムカデ綱イシムカデ目動物の糞より反復して高頻度に検出されることが判明し、孢子サイズの異なる未記載種も発見された。本種の腸内ステージは未だ解明できていないが、昆虫に加え多足類にも腸内外両生菌類が存在する可能性が示唆され、今後、集中的に調査を進める必要がある。

キノコ類（子囊菌および担子菌）を起源とする 新規抗生物質探索のための分子育種法の構築

渡辺 賢二（静岡県立大学薬学部）

本研究ではキノコ（担子菌類）のレギュレーター遺伝子改変に基づく生合成経路の活性化ならびに新規化合物の獲得を目的に研究に着手した。

本研究では、キノコのモデル生物で我々が遺伝子操作系を確立したウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* を用いた。*C. cinerea* のゲノム情報をもとに、レギュレーター遺伝子を探索したところ、*Aspergillus fumigatus* のレギュレーター遺伝子 *laeA* と49%の相同性を示す CC1G_00498 遺伝子 (*CclaeA*) を見出した。そこで *CclaeA* を破壊し、得られた破壊株の化合物生産を調べた。その結果、 $\Delta CclaeA$ において、保持時間4.7分に化合物 **1** (m/z 744.4871 [$M+H$]⁺) の分子イオンピークが観測され、化合物 **1** の分子式は $C_{35}H_{66}O_{10}N_7$ であると推定され、データベース検索から化合物 **1** は新規化合物であることが示唆された。NMRによる構造解析を行ったところ、化合物 **1** は3回繰り返し型のアシル化ヒドロキシオルニチン構造を含む新規化合物であることが判明した。3つのN-ヒドロキシオルニチンの絶対配置は改良マーフィー法で3種ともL体と決定した。また、化合物 **1** はその構造から鉄に配位し鉄取り込みを促進す

る化合物（シデロフォア）と予想された。単離した化合物 **1** に対して鉄投与試験を行ったところ、鉄投与後にピークの保持時間が変化し、鉄結合体に該当するマスペクトルが観測された。以上から化合物 **1** はシデロフォアだと決定し、**coprinoferin (CPF)** と命名した。

C. cinerea は、CPF を産生・分泌することで外部の鉄を効率的に体内に取り込んでいると考えられる。そして取り込まれた鉄が菌糸成長の促進・子実体形成に重要な働きを有すると本研究から示唆された。CPF の生合成遺伝子クラスターはブナシメジなどの 200 種類を超える担子菌種で高度に保存されており、実際に CPF 類似生合成遺伝子クラスターを有する担子菌種において CPF の生産が確認された。また、一般に子囊菌由来 *laeA* は二次代謝産物生産を正に制御するのに対し、予想外にも担子菌由来 *CclaeA* は CPF の生産を負に制御していた。本研究は *LaeA* タンパク質の二次代謝制御における新たな機能を世に提示するものであり、本機能の解明により生合成遺伝子の休眠・覚醒化の理解、ひいては効率的な新規天然物獲得法の樹立へとつながると期待される。

黒酢醸造に関わる酢酸菌の優占化機構に関する研究

石井 正治（東京大学大学院農学生命科学研究科）

伝統的壺造り純米黒酢醸造では、種酢や種菌として酢酸菌を添加しなくても、壺内壁に定着する多種の細菌の中から *Acetobacter pasteurianus* が自然に優占化することで酢酸発酵が安定的に進行する。本研究では、黒酢醸造過程で *A. pasteurianus* が優占化するメカニズムを解明することを目的とした。黒酢醸造中に蓄積が見られるエタノール、酢酸、乳酸に対する耐性を、*A. pasteurianus* の標準株 NBRC3283 と黒酢由来株、および、*A. aceti* NBRC 14818 で比較したところ、*A. pasteurianus* の各菌株は、特にエタノールに対して高い耐性を示した。エタノールは黒酢醸造中に 7 % 程度まで上昇するが、この濃度で *A. pasteurianus* と *A. aceti* の共培養を行ったところ、*A. pasteurianus* が有意に優占化したことから、エタノール耐性の違いが黒酢中での優占化の主要因であることが示された。また、黒酢熟成過程での経時的な菌相解析を行ったところ、*A. pasteurianus* は熟成後期に存在比率が上昇したことから、長期間の熟成が *A. pasteurianus* の壺内壁への定着に有利に働くことが示された。

細菌性ウイルス様粒子 GTA による環境適応機構の分子基盤

清水 隆之（東京大学大学院総合文化研究科）

近年、細菌における新たな遺伝子水平伝搬機構として、細菌性ウイルス様粒子 Gene Transfer Agent (GTA) による形質導入機構が明らかになってきた。GTA は、細胞や環境のストレス状態に応じて細胞内で産生され、自身のゲノム DNA をパックし細胞外に排出する機能を持つ。しかし、この応答の制御機構や制御を受ける意義の理解は不十分である。

最近、私は、硫化水素由来のパースルフィド応答性転写因子 SqrR が GTA 関連遺伝子の制御に関わることを見出した。野生株 (WT) と *sqrR* 欠損株 ($\Delta sqrR$) で、GTA 関連遺伝子の転写量を比較したところ、GTA を構成する因子とその制御因子の転写量が $\Delta sqrR$ で高いことがわかった。一方で、硫化水素処理はこれら遺伝子の転写量に影響を与えなかった。SqrR はシステインの酸化還元状態を介してその機能が制御されることから、細胞内のレドックス状態も検知しているかもしれない。本発表では、酸化ストレスが GTA 産生に及ぼす影響に加えて、GTA 欠損株のストレス耐性についても議論したい。

次世代型プレバイオティクスを用いた腸内細菌叢制御

中井 博之（新潟大学農学部）

腸内常在菌叢バランスの崩壊により様々な疾患が発生することや様々な疾患に特徴的な腸内常在菌叢がこれまでに報告されてきており、ヒトの健康保持増進や健康寿命の伸長の観点から腸内細菌叢制御の重要性への認識が高まってきている。そこで我々は、ホストの消化および腸内常在菌優勢種による資化を免れた上で、ビフィズス菌や乳酸菌に代表される有用腸内細菌のみを「狙い撃ち」で増殖させ、効率的な腸内細菌叢改善を通じた疾患予防・治療を可能とする『次世代型プレバイオティクス』の開発を試みている。今回、申請者が酵素合成法を駆使して構築したオリゴ糖ライブラリーを用いて、様々な腸内常在菌優勢種のオリゴ糖資化性をハイスループット系にて評価することで、ヒト腸管内でビフィズス菌や乳酸菌、その他の有用腸内細菌、各々を選択的に増殖可能なオリゴ糖を複数見出した。

Frankia 属放線菌の窒素固定と樹木との共生に関わる遺伝子の同定

九 町 健 一（鹿児島大学大学院理工学研究科）

Frankia 属は窒素固定能を持つ放線菌である。ハンノキやモクマオウ等の 200 種以上の樹木と共生することもできる。共生窒素固定は根に形成される根粒内で行われる。窒素固定酵素を酸素による失活から守るため、厚い脂質多重膜で覆われた構造体（ベシクル）を分化する。本課題では共生窒素固定やベシクル分化が異常な変異株の詳細な解析に取り組んだ。

G23D3 変異株は、ベシクルをほとんど形成しなかった。わずかなベシクルもサイズが小さく膜の発達が乏しかった。一般的な窒素応答に関わる制御系は正常だったため、ベシクル分化に特化した鍵遺伝子に変異していると考えられた。この株は根粒着生も全く行えなかった。

N9D9 変異株は、ベシクル数は正常だが膜の発達に異常を示した。ベシクル内の酸素濃度が高く、窒素固定酵素が失活していると考えられた。HTH 型の転写因子が変異原因遺伝子である可能性が示唆された。

N3H4 変異株は、ベシクル数・膜厚ともに見た目は正常だが窒素固定が行えず、根粒着生も行えなかった。NAD⁺ 合成酵素が変異原因遺伝子であり、細胞内の NAD(H) の量が低いことが共生窒素固定を阻害していると考えられた。

二次代謝産物の生物学的意義解明による放線菌潜在能の開拓

木 谷 茂（大阪大学生物工学国際交流センター）

放線菌は、多様な生理活性物質を二次代謝産物とする微生物である。しかし、この二次代謝産物の「真の生物学的意義」は不明である。一方、放線菌にある二次代謝クラスターの大半は休眠しており、この潜在する物質生産能の開拓は新規物質の獲得に結びつく。本研究では、他種放線菌に対する放線菌の二次代謝誘導能を解析し、休眠天然物を生産覚醒させる技術を確立することを目指した。*Streptomyces albus* または *Blastococcus* sp. ST9 株を各種放線菌と共培養し、その代謝物を解析した。固体共培養では、2 菌株を非接触状態にて培養し、シグナル物質による休眠二次代謝の覚醒を期待した。その結果、*S. albus* を用いた場合、18% の菌株にて、共培養依存的な代謝物変動が観察され、一部の代謝物は既知シグナル以外の機構にて生産誘導されることが明らかとなった。一方、*Blastococcus* sp. ST9 株は、エバーメクチン生産菌において、エバーメクチン以外の休眠代謝物を生産覚醒することが分かった。この 2 菌株による生産誘導メカニズムを解明することにより、生物間化学シグナルに基づいた物質探索技術を提案できると同時に放線菌代謝物の生物学的意義を示せると考えている。

次世代バクテリアセラピーを可能にするための微生物の体内制御技術

黒田 章夫 (広島大学大学院統合生命科学研究科)

組換え微生物を使った治療（バクテリアセラピー）は、高度なプロバイオティクスや効果的な癌治療への応用が期待されている。しかし、バクテリアセラピーの実現には、治療が終わると死滅することや、自然環境中では生存できないことなど、生育を厳密に制御することが求められる。亜リン酸 (H_2PO_3^-) 依存性を付与した大腸菌は、亜リン酸のない一般環境や体内では増殖できないことから、人為的に亜リン酸を投与することによってその増殖を制御することが可能である。本研究では、亜リン酸依存性株の増殖・生存特性の解明とその改変を目的とした。亜リン酸依存性株の表現型を解析したところ、亜リン酸存在下での生存率の向上や細胞外多糖 (EPS) 分泌の亢進などの変化が認められた。RNAseq 解析による原因特定を試みた結果、リン酸レギュロン支配下のストレス応答、生存性、EPS 生産に関与する遺伝子群の関与が示唆された。そこでリン酸レギュロンの活性化を抑制した亜リン酸依存性株を作製したところ、EPS 生産が抑制され、かつ生存率の短くなった株の取得に成功した。これにより、バイオセラピーに利用できる宿主のバラエティーを増やすことができた。

海藻多糖フコイダンの微生物分解酵素系の解明とアミロイド線維抑制効果

大城 隆 (鳥取大学工学部)

海藻に含まれる多糖、フコイタンは陸生環境には存在せず、主鎖に硫酸化フコースを含むことが特徴であるが、その分解代謝の詳細は解明されていない。抗血液凝固、抗腫瘍作用など多様な生理活性が提唱されているほか、予備的な検討ではあるものの、当研究室において、フコイタンがアルツハイマー病の原因とされているアミロイド線維の形成を阻害することを明らかにしている。本研究では、オキナワモズクフコイタン資化性微生物 *Luteolibacter algae* H18 が有するフコイタン分解に関与する酵素群のうち、脱硫酸化酵素を明らかにするとともに、オキナワモズクフコイダンのアミロイド線維形成阻害について詳細な評価を行った。

H18 株の菌体からフコイタン脱硫酸化酵素を精製し、N 末端アミノ酸配列を決定し、ゲノム情報より本酵素遺伝子を見出した。組換え大腸菌から本酵素を調製し、酵素化学的性質を検討したところ、オキナワモズク以外に、オオウキモ由来フコイタンから硫酸基を遊離させることができた。また、本酵素の一次構造はスルファターゼよりむしろホスファターゼに類似しており、*p*-ニトロフェニルホスフェートを基質にすることができた。一方、オキナワモズクフコイタンは、低分子化してもアミロイド線維形成阻害を示すことが明らかになった。

細菌の菌体内外に生じるセレンナノ粒子の生成機構の解明と バイオアベイラビリティに関する研究

三原 久明 (立命館大学生命科学部)

セレンは主に、セレンタンパク質として種々の生理機能を発揮する。一方、ある種の細菌は、異化作用や無毒化作用により、セレン酸や亜セレン酸を、毒性の低い元素状セレンナノ粒子 (SeNP) に還元して細胞内外に蓄積・排出するが、SeNP の形成機構は不明である。本研究では、SeNP の生成に関わる遺伝子、タンパク質を同定し、SeNP 生成機構を解明することを目的とした。また、細菌が生成する SeNP が、微量栄養素としてのセレン源になり得るか (バイオアベイラビリティ) も検討した。異化的金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* における細胞表層 SeNP の生成に、新奇な亜セレン酸還元酵素が関与することを見出した。さらに、本酵素遺伝子と同一オペロンにコードされる外膜ポーリン様タンパク質も SeNP 形成に関わっていた。一方、*Escherichia coli* K-12 において、細胞外 SeNP 生成と外膜小胞生成との間の関連を示唆する結果を得た。また、*E. coli* により生成された SeNP をセレン欠乏ラットに経口投与した実験では、本 SeNP は腸管吸収されにくく、セレン栄養源として不活性であることが示唆された。

微生物がつくりだすガラクトオリゴ糖合成酵素の機能改変 一次世代型プレバイオティクスの生産基盤の構築

田中 俊一 (立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構、現 京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

母乳に含まれるミルクオリゴ糖には様々な結合様式と重合度のものがあり、種類は 200 を超える。この構造多様性が、数多のプレバイオティクスとしての生理機能を発揮する基盤である。一方、ミルクオリゴ糖を模倣する食品素材としてガラクトオリゴ糖 (GOS) が利用されているが、その製造に使われる微生物 β -ガラクトシダーゼは主に直鎖型 GOS を作るため、構造多様性は乏しい。そこで本研究では、GOS の機能をよりミルクオリゴ糖に近づけることを志向し、分枝型 GOS を効率的に産生する改変型酵素の作出を目指した。我々の先行研究成果である、抗体様ペプチドを β -ガラクトシダーゼの基質結合部位周辺に結合させることで産生 GOS を直鎖型 β -1,4 から分枝型 β -1,3 に改変できうという知見を基に、本研究では、① X 線結晶構造解析によって抗体様ペプチドが β -ガラクトシダーゼの特異性を改変する機序の解明とともに、②その構造情報に基づく変異体設計によって分岐型 GOS の産生能が大幅に向上した改変型酵素の作出に成功した。今後は、直鎖型を好む野生型酵素と分岐型を好む改変型酵素の組合せ反応を試験し、構造多様性の広い GOS の産生を検討する。

Bacillus 属細菌由来のべん毛モーター蛋白質を利用した ナトリウムイオンセンサープローブの開発

南野 徹 (大阪大学大学院生命機能研究科)

バクテリアの運動器官であるべん毛モーターの固定子は環境変化を感知するバイオセンサーとして働く。固定子のペプチドグリカン結合ドメイン (以降、PGB ドメインと呼ぶ) が外環境変化の情報を得ると、べん毛モーターの周りに配置される固定子の数が制御される。最近、我々は *Bacillus subtilis* のべん毛モーターの固定子として働く MotPS 複合体の PGB ドメインが Na^+ を直接感知するセンサーとして働くことを見出した。本研究では、この PGB ドメインによる Na^+ センシング機構を原子レベルで解明するため、*B. subtilis* 由来の MotPS 複合体の PGB ドメインを精製し X 線結晶構造解析を行なった結果、 $2.2\text{\AA}$ 分解能で構造を決定することに成功した。さらに、PGB ドメインの 68 番目のグルタミン残基から 78 番目のリジン残基の領域が Na^+ 依存的に構造変化することが示唆された。

微生物のもつシームレスクローニング活性を利用した 新規シームレス DNA クローニングシステムの開発

本橋 健 (京都産業大学生命科学部)

近年、急速に普及しているシームレスクローニング法は、古典的な制限酵素トリガーゼを使用するクローニング法と比較し、効率が高い。バイオ試薬各社は複数 DNA 断片を同時にベクターへクローニングできるキットを競って発売している。これに対し、これまでのシームレスクローニング法とはまったく異なるアプローチで、より効率の高いシームレスクローニング法である Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) 法を開発した。この方法は、通常研究室で使用する一般的な大腸菌株 (JM109, DH5 α など) から「ある一定条件下」で調製した粗抽出液を用いると、DNA 断片を効率良くベクターへシームレスに挿入できる。この方法を使用すると、一般的大腸菌株の粗抽出液でシームレスクローニングできるため、特別な試薬を必要とせず、超低コストにクローニングできる。しかし、SLiCE 法では大腸菌粗抽出液を用いるため、ヌクレアーゼなどの混入もある。そのため反応条件等を工夫し、より安定に、かつ高い効率で SLiCE 法を行う方法を検討し、確立した。

メタノール濃度に応答するシグナル伝達と転写制御機構の解明

由里本 博也（京都大学大学院農学研究科）

強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種タンパク質生産宿主として広く利用されているメタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) では、メタノール濃度に応答してメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが制御される。本研究では、このようなメタノール濃度に応答した転写制御機構とそのシグナル伝達機構の解明を目的とした。細胞表層においてメタノール濃度の感知に寄与する Wsc1, Wsc3 からのメタノールシグナルは、メタノール誘導性遺伝子発現に必須の転写活性化因子 Mxr1 に伝達され、Mxr1 のリン酸化レベルがメタノール濃度に依存して変化した。抗ホスホセリン抗体および抗ホスホスレオニン抗体を用いた解析により、Mxr1 のセリン残基がメタノール濃度非依存的に脱リン酸化され、スレオニン残基がメタノール濃度依存的に 0.1% メタノール培養時に最も多くリン酸化されることがわかった。さらに、Mxr1 のドメイン欠失解析により、0.01% 以下の低濃度および 0.1% 以上の高濃度でのメタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要なドメインをそれぞれ同定した。

プロバイオティクス有用菌の消化管内定着性向上を目指した基盤技術の創製

小川 哲弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）

近年の健康志向の高まりから、プロバイオティクスの開発が盛んに進められている。その中であって、これら有用菌の定着性の低さは、克服すべき課題であった。当研究室では、大腸菌をモデルとしてバイオフィーム形成の分子機構について研究を行ってきた。細菌はバイオフィームを介して消化管内に定着するため、これまでの成果の利用により長期定着が可能となると考え、これの実証を試みた。これにより、遺伝子組換えプロバイオティクスの、将来的な臨床応用に向けた基盤技術の確立を目指した。

大腸菌において、RNase I 欠損株が高いバイオフィーム形成能を示すことが報告された。また、バイオフィーム形成条件下では、リボソームは不活性型へと変換されるが、この不活性型リボソームを蓄積する株もバイオフィームを作りやすくなることを見出した。そこで、これらの株のマウス腸管での定着能を調べた。ルシフェラーゼを発現させた上記株の培養液を、マウスに経口接種した。経時的に糞便を採取し、ここから得られるルシフェラーゼ発光量を指標に定着性を評価した。その結果、幅広い週齢マウスで、これらの株がコントロール株に比べて高い腸内定着能を示すことが分かった。

大腸菌の呼吸鎖変異株が示す異常代謝の解析と産業利用

横田 篤 (北海道大学大学院農学研究院)

我々は大腸菌において、プロトン駆動力 (PMF) 形成能の高い二つの呼吸鎖酵素である、I 型 NADH 脱水素酵素 (NDH-I) と bo 型末端酸化酵素 (Cytbo) を同時に欠失させた変異株 ($\Delta\Delta$ 株) が、生育の低下、中枢代謝の活性化、グルタミン酸 (Glu) と酢酸の異常蓄積を示すことを見出している。本研究では、 $\Delta\Delta$ 株における Glu と酢酸の蓄積がエネルギーレベルの低下、または酸化還元バランスの偏りのどちらによって引き起こされているのか明らかにするために、 $\Delta\Delta$ 株において NADH 再酸化系の強化を試みた。そこで、大腸菌が有する PMF 形成能が無い II 型 NADH 脱水素酵素 (NDH-II) を $\Delta\Delta$ 株において過剰発現させたところ、 NAD^+/NADH 比の偏り、生育の低下、酢酸の異常蓄積が解消された。一方、NDH-II を過剰発現しても糖消費速度と Glu 生産能は $\Delta\Delta$ 株と同等であった。これらのことから、 $\Delta\Delta$ 株における生育の低下と酢酸の異常蓄積は酸化還元バランスの偏りによって引き起こされている一方、糖消費の亢進及び Glu の異常蓄積は、エネルギーレベルの低下もしくはそれに起因している代謝変化が引き起こしていると考えられた。

ω 3 系高度不飽和脂肪酸の微生物変換の解析とその応用に関する研究

小川 拓哉 (京都大学化学研究所)

ω -3 系高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) は人の健康にとって有益な脂肪酸であり、長らく微生物生産系の開発が模索されてきた。EPA 生産菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA の *de novo* 合成能を有するが、これに加え、細胞外に添加した DHA から EPA を生産するユニークな変換能を持つ。この代謝機構を明らかにするため、本菌の変異解析と組換えタンパク質を用いた *in vitro* アッセイを行った。その結果、責任酵素として β -酸化反応を担う 2,4-ジエノイル-CoA 還元酵素 FadH とアシル-CoA 脱水素酵素 FadE1 を同定し、DHA が β -酸化経路を介して EPA に変換されることが明らかになった。現在、組換え酵素を用いた *in vitro* での DHA-EPA 変換の再構成を試みている。さらに、変異解析の結果から、本変換により生じた EPA の蓄積に、リン脂質合成酵素の 1 つであるアシル基転移酵素 PlsC1 が関与することが示唆されており、EPA は細胞膜に素早く取り込まれることでさらなる β -酸化を免れ蓄積することが考えられた。

電氣的膜電位制御に基づく細菌間相互作用の制御法の開発とそのデバイス化の検討

長 峯 邦 明 (山形大学大学院有機材料システム研究科)

本研究の最終目標は細菌への電気刺激印加によるシグナル伝達物質分泌制御とセンサ細菌の代謝活性計測による周辺細菌由来シグナル伝達物質受容の検出を実現する送受信型細菌 / 電極ハイブリッドセンサの確立である。これにより細菌間相互作用の把握と攪乱を実現したい。本助成期間では基礎研究として①電気刺激による膜電位制御法の確立と②細菌代謝活性の電気化学計測法の確立を目的とした。①に関して膜電位依存的なシグナル伝達物質 K^+ イオン分泌の電気刺激制御を検討した。平板電極対表面に枯草菌菌付着寒天ゲルを貼付し矩形パルス電流(電流 10 mA、パルス幅 9.9 ms、周波数 100 Hz)を 2.5 秒間印加したところ膜電位の過分極を反映した一過的かつ可逆的な蛍光輝度の増加を誘導できた(図1)。現在、刺激前後の周辺 K^+ イオン濃度変化を定量しており分泌制御の可能性を調べている。②に関し高分子(ポリ-L-リジンやキトサン等)を用いた細菌固定化電極を作製し低分子の酸化還元物質を用いた細菌内代謝酵素活性の電気化学計測に成功した(図2)。現在、酸化還元物質の電極への固定化による電極・細菌・酸化還元物質の一体化を検討している。

分裂酵母胞子表層タンパク質の特性を生かした 新奇の異種タンパク質発現・分泌生産・胞子細胞表面提示システムの構築

今 田 一 姫 (鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科)

分裂酵母の胞子は直径約 $3\mu\text{m}$ の休眠細胞で、胞子の表面は Isp3 タンパク質からなる強固な層で覆われている。Isp3 は減数分裂・胞子形成中に大量に発現・蓄積し、胞子細胞膜が完成すると胞子の細胞外(子嚢)に分泌され、その後胞子表層に定着する。これを利用することで、新奇の異種タンパク質発現・分泌生産および胞子表面への提示システムを構築することができると考え、Isp3 を GFP で可視化することで挙動に必要な Isp3 の配列を調べた。その結果、Isp3 の両端が胞子の細胞外への放出に関与しており、特に N 末端側が重要であることが分かった。胞子表層への定着には、Isp3 の N 末端側 52 aa で十分であった。しかし、この定着はバックグラウンドの野生型 Isp3 が存在しないとき、遊離胞子上で胞子表層から消失していた。野生型 Isp3 が存在する場合は分泌率が下がるものの、遊離胞子に安定して局在しており、任意のタンパク質の胞子表面への提示には野生型 Isp3 との結合が重要であった。

耐熱性シアノバクテリアと微小電極を使って単光子を捉える

山野井 慶徳（東京大学大学院理学系研究科）

光合成は自然界で最も重要なプロセスの一つであり、2つの光反応中心（光化学系 I（PSI）と光化学系 II（PSII））から構成されている。光化学系の量子収率が高いことから、バイオエレクトロニクスへの応用が期待されている。しかし、ネイティブ PSI（N-PSI）をデバイスに使用すると、高い光機能を失う。この低下は、PSI の配向制御の難しさに起因する。PSI の配向が最適であれば、光励起された電子が容易に電極に到達し、良好な光電変換効率を得ることができる。

報告者は、新規に設計した遺伝子組換え PSI（G-PSI）と白金ナノ粒子（PtNP）を簡単な積層法を用いて基板上に集積し、電極上の PSI の配向を制御できる新規な光電極を開発した。固定化した PSI の基板上の配向は、偏光の吸収スペクトルで確認した。その結果、G-PSI を取り付けた電極では、680 nm の照射で内部量子収率（IQY）が N-PSI 修飾電極と比較して約 2 倍に増加することを確認した。また、G-PSI 上のシトクロム c（Cyt c）の静電相互作用により IQY が 4 倍に増加した。

シアノバクテリアを用いた非枯渇性資源生産基盤株の開発

景山 伯春（名城大学理工学部）

シアノバクテリアは有用物質の生産基盤としての応用が期待できる。本研究では、遺伝子操作が容易な淡水性シアノバクテリア株の耐塩性化を目指し、シアノバクテリアの耐塩性機構を解析した。2 段階クロマト分離により、耐塩性シアノバクテリア *Halothece* sp. PCC7418 において強く塩誘導される蛋白質として I 型フルクトース-1、6-ビスリン酸アルドラーゼ（FBA）を見出し、これを H2846 蛋白質と名付けた。FBA は解糖系および糖新生に必須の酵素であり、I 型（CI-FBA）および II 型（CII-FBA）が存在する。系統解析の結果、高塩濃度環境下に生息するシアノバクテリア株が特異的に H2846 と相同性の高い CI-FBA を有していた。H2846 蛋白質を淡水性シアノバクテリア株に導入することで、塩耐性を増強することができた。これらの結果から、H2846 はシアノバクテリアにおける耐塩性機構に関与していると考えられる。さらに、*Halothece* が有する CII-FBA を H2847 と名付け、H2846 と H2847 の塩ストレス応答や酵素活性維持機構の違いを見出した。

自己生成させたポルフィリン色素を光増感剤として利用する 光駆動型の微生物触媒反応によるバイオ水素生産

本田 裕樹（奈良女子大学研究院自然科学系）

「水素社会」が提唱され、水素の需要が増加すると予想されるなか、自然エネルギーを用いる水素生産系の重要性が高まっている。本研究では、色素による光増感反応と水素生成酵素（ヒドロゲナーゼ）の反応を組み合わせたクリーンな光駆動型水素生産系の構築を目指した。特に、大腸菌で色素合成能と水素生成能を強化し、生合成した色素を光増感剤としてヒドロゲナーゼを光駆動する光バイオ水素生産系の実現を目指した。まず、大腸菌でポルフィリン色素合成系を強化し、培養液と菌体内に著量の色素（主成分は Zn-ウロポルフィリン III）の蓄積を確認した。カラム精製した色素と電子供与試薬（トリエタノールアミン、TEOA）、電子メディエーター（メチルビオローゲン、MV）の混合溶液で、MV の光触媒的還元を確認した。さらに、精製色素と MV、TEOA、ヒドロゲナーゼ遺伝子を発現した大腸菌の懸濁液で、光照射依存的な水素生成を確認した。1 つの大腸菌への色素合成能と水素生成能の同時付与は、両者の条件が大きく異なるために達成できていないが、本研究を通して大腸菌で生合成した色素と細胞内のヒドロゲナーゼを共役させた光駆動水素生産の可能性を実証することができた。

高耐熱性バイオポリエステル微生物生産のための遺伝子資源探索

柘植 丈治（東京工業大学物質理工学院）

微生物が炭素貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、海洋環境でも生分解が可能なバイオプラスチックとして利用できる。その中でも α 位にメチル基が付いた 3-ヒドロキシ-2-メチルブタン酸（3H2MB）をモノマーユニットとする P（3H2MB）は、既存の PHA と比較して高耐熱性のポリマーである。現在、遺伝子組換え大腸菌を用いた P（3H2MB）の生産量（蓄積量）は乾燥菌体重量の 20 wt% 程度であり、PHA の生産量としては低い値である。P（3H2MB）の生合成経路において律速段階と考えられるのが、モノマー供給に関わる R 特異的水和反応であり、その反応を触媒する R 特異的エノイル CoA ヒドラターゼ（R-ヒドラターゼ、PhaJ）が該当基質に対して活性が低いことが原因と考えられる。そこで本研究では、P（3H2MB）生合成におけるモノマー供給酵素遺伝子を他細菌由来の *phaJ* 遺伝子に置き換えることで、P（3H2MB）生産量の増強が可能かを調べた。*Aeromonas caviae* 由来の PHA 生合成オペロンを組み込んだ大腸菌に、種々の細菌由来 *phaJ* 遺伝子を発現させ、チグリン酸を炭素源として P（3H2MB）の生合成を行った。その結果、これまで用いていた *A. caviae* 由来の *phaJ* 遺伝子よりも、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の *phaJ1* 遺伝子を発現させた際に、P（3H2MB）の生産量が多くなることが分かった。

地下圏の難分解性有機物を電気微生物分解してメタンを生成する 微生物群集中の電子授受機構の解明

石井 俊一（海洋研究開発機構海底資源研究開発部門、現 海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門）

海底下 2km の石炭層を含む下北沖掘削コアを播種源とし、電圧印加培養による低品位炭を基質としたメタン生成を行った。陽極上の発電菌バイオフィーム、陰極上の電気メタン生成バイオフィーム、浮遊菌のメタオミクス解析を行った結果、電子を収奪する陽極では発電性の *Geoalkalibacter* 属細菌が、電子が供給される陰極ではメタン生成を行う *Methanobacterium* 属アーキアと *Aeromicrobium* 属細菌が集積されている事が分かった。これらの微生物群の遺伝子発現解析から、陽極では *Geoalkalibacter* によって酢酸を分解し電極呼吸する反応が起こり、陰極では *Aeromicrobium* によって電極から電子を受け取り水素およびギ酸が生成され、それを使用して *Methanobacterium* がメタンを産生する反応が起こっている事が分かった。低品位炭の分解には、*Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Chloroflexi*、*Firmicutes* に属する細菌群が重要な機能を担っている事が示唆され、これらが電極上の微生物群と協調している事が分かった。

亜硝酸・硝酸イオントランスポーターが 脱窒細菌の亜酸化窒素の親和性へ及ぼす影響評価

寺田 昭彦（東京農工大学大学院工学研究院）

二酸化炭素の約 265 倍の温室効果を有する亜酸化窒素 (N_2O) は、農耕地や排水処理施設などで発生しており、削減が強く求められている。本研究では、 N_2O を還元可能な脱窒細菌の亜硝酸・硝酸トランスポーターの有無や脱窒の表現型が、 N_2O 還元能力に及ぼす影響を評価した。申請者らが単離した亜硝酸・硝酸イオントランスポーター遺伝子 (*nrt*) を保有していない *Azospira* sp. strain I13 (I13 株) を含む様々な脱窒細菌に、酢酸塩と NO_3^- を嫌気条件で供給した結果、I13 株の NO_3^- 還元速度は、*nrt* を保有する同種の I09 株や他の脱窒細菌と比較して半分以下であった。また I13 株の脱窒速度は、亜硝酸・硝酸トランスポーターによる NO_3^- 取込みを阻害する塩素酸の存在下でも変化がなかった。安定同位体 ^{15}N を標識した NO_3^- と N_2O の共存下での脱窒速度を評価したところ、I13 株は NO_3^- 還元よりも優先的に N_2O を N_2 に還元する傾向を示し、 NO_3^- を優先的に利用する他の脱窒細菌と逆の傾向を示した。さらに動力学的解析の結果、I13 株は他の脱窒細菌より高い N_2O 親和性を有していた。以上より、I13 株は NO_3^- から N_2 まで還元反応を行う脱窒細菌の遺伝子型を有しながら、表現型として N_2O を優先的かつ効率的に還元し、 N_2O シンクとして機能することを明らかにした。

要旨(若手研究者助成)

南北両極アイスコアに眠る古代菌類から見た 過去 70 万年の菌類の進化とその環境適応

辻 雅 晴 (国立極地研究所、現 旭川工業高等専門学校物質化学工学科)

地球環境は過去、氷期と間氷期を繰り返しながら大きく変動しており、南北両極のアイスコアには、過去の物質が凍結状態で連続して保存されている。過去にどのような菌類が生息していたかを知ることは、地球の古環境を知る上で重要な手掛かりとなる。しかし、これまで古代菌類の研究は化石などからに限られており、過去にどのような菌類が生息しており、これらの菌類が環境変動に対しどのように適応してきたのかは不明であった。そこで本研究では、みずほ基地 (70° 41' S、44° 19' E) とドームふじ (77° 19' S、39° 70' E) で採取されたアイスコアに眠る菌類の取得を試みた。取得した菌株から DNA を抽出し、塩基配列の相同性により種を同定した。

その結果、南極のアイスコアから取得した菌株は、現世の既知の菌類とは遺伝的相同性が低いことから、古代の菌類の取得に成功したと考えられる。このことから、今まで化石の菌類では不可能であった、過去に生息していた菌類がどのように環境変動に適応してきたのかを解明するというアイスコアを利用した新たな研究分野の開拓に発展させることができると考えている。

要旨（寄付講座助成・中間発表）

細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と 環境細菌の高度利用および未開拓潜在機能開発への応用

永田 裕二（東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座）

[背景・目的]

本寄付講座では、自然界で誕生して間もないと考えられる高度に難分解性の人為起源有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) を分解・資化する細菌を主な研究対象として、遺伝子（ゲノム）・酵素・細胞・集団の各レベルから細菌が有する「特殊」機能を多面的に解析することで、I. 細菌の環境適応・機能進化機構の本質を包括的に理解すること、II. 得られる知見を元に細菌の実環境での高度利用、および画期的な未開拓潜在機能開発に応用するための基盤を確立することを目的として、以下の研究を進めている。

[方法・結果・考察]

(1) 特殊性の高い遺伝子の起源と細菌がそれら遺伝子を獲得する機構の解明（遺伝子・ゲノムレベル）： γ -HCH 分解資化に関与する「特殊性の高い」*lin* 遺伝子群の起源を解明するため、 γ -HCH 汚染化土壌のメタゲノム解析および単離した γ -HCH 分解細菌株のゲノム解析、また、様々な環境試料に対して機能相補による遺伝子キャプチャリング実験を進めている。一方、遺伝情報のリザーバーとして membrane vesicle (MV) が機能する可能性について検討している。(2) 脱ハロゲン酵素の機能進化（酵素レベル）： γ -HCH 分解資化に関与する haloalkane dehalogenase (HLD) の実験進化系を構築し、 γ -HCH 分解細菌が有する LinB 以外の HLD も γ -HCH 資化に関与し得ること、および本系で実際に「進化型」酵素が取得できることを明らかにした。一方、基本的細胞機能に関わる tRNA-specific deaminase と fusion protein として存在する新規 HLD を見出した。(3) 環境適応・進化に関与する細胞機能（細胞レベル）： γ -HCH 分解細菌株の外膜の integrity 維持に関与し、 γ -HCH 資化に必須な新規 ABC トランスポーター LinKLMN の機構解明に向けた生化学的研究基盤を確立した。一方、alcohol dehydrogenase をコードする *adhX* 遺伝子の高発現で、従属栄養細菌である γ -HCH 分解細菌株が有機炭素源非添加無機塩培地で大気中の CO_2 固定を伴い増殖する現象を見出し、その機構解明を進めている。(4) 細菌集団の形成と進化（集団レベル）：クローナルな γ -HCH 分解細菌株を固体培地上で継代培養することで、ヘテロな集団に多様化し共存する実験進化集団を得た。単離した進化型クローンの解析と集団ゲノムシーケンシングで、その共存の機構解明を進めている。一方、集積培養により得られた非分解細菌を含むヘテロな細菌集団からなる γ -HCH 分解細菌コミュニティの構成原理の理解と、その解析から見出した現象のバイオレメディエーション等への応用を見据えた研究を展開している。

生物間相互作用解析を基軸にした糸状菌の潜在機能の開拓と利用

萩原 大祐（筑波大学大学院生命環境科学研究科糸状菌相互応答学寄付講座）

[背景・目的]

糸状菌は多様な酵素や化合物の産生能を有し、環境中に広く生息する。ゲノムには多数の化合物生合成遺伝子が存在するが、その多くは実験室の培養では発現しない。天然化合物の探索源としてさらに活用するためには、これらの休眠生合成遺伝子を活性化させる必要がある。そのために、生態に近い環境に菌を置く試みが広がっており、特に生物間相互作用に注目が集まっている。本研究では、生物間相互作用を利用した糸状菌二次代謝の活性化に着目し、広範囲な探索により新規化合物の発見や、応答の分子基盤とメカニズムの解明を目指している。

[方 法]

二種の *Aspergillus* 属糸状菌による共培養により、産生される物質の探索、および産生が誘導される化合物の生合成遺伝子の同定を試みた。また、糸状菌に感染するウイルス（マイコウイルス）に影響を受ける化合物産生応答を探索した。

[結果・考察]

Aspergillus fumigatus との共培養により、*A. nidulans* における violaceols や diorcinol の産生が誘導された。生合成遺伝子クラスターの発現誘導が確認され、この中の PKS をコードする *orsA* 遺伝子の破壊株では、これらの化合物の産生が見られなかった。膜を介した共培養においても、生合成遺伝子の発現が上昇し、diorcinol が産生されることから、接触に依存しない誘導機構が示唆された。

A. niger が他の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属菌との共培養により、菌体に黄色い色素を蓄積した。膜を介した培養では色素産生は誘導されず、接触依存的な現象であると考えられた。トランスクリプトーム解析から、生合成遺伝子クラスター候補を選定し、CRISPR/Cas9 による破壊株作製により、生合成遺伝子を同定した。当該遺伝子クラスターは、*A. niger* の近縁種と一部の *Penicillium* 属菌にも保存されていた。その近縁種では、同化合物が共培養により産生誘導されたが、*Penicillium* 属菌では構成的に産生する種もあり、その応答は多様であった。

三種のマイコウイルスが感染したイネいもち病菌と、このうち二種のウイルスが脱離した株の培養液の比較から、ウイルス依存的なテヌアゾン酸の産生が見出された。再感染実験により、Totivirus が本化合物の産生を正に制御していること、RT-qPCR 解析からは、生合成遺伝子 *TAS1* および転写因子 *TAS2* の活性化により化合物生産が誘導されることが示された。糸状菌に感染するマイコウイルスによる二次代謝の調節を、遺伝子レベルで初めて明らかにした。

革新的技術による輸送系膜タンパク質機能の解明と 「微生物膜輸送工学」への応用展開

川崎 寿（東京大学大学院農学生命科学研究科微生物膜輸送工学寄付講座）

[背景・目的]

微生物を利用したものづくりは持続可能・循環型社会に貢献する技術として期待されている。合成生物学などの発展により細胞内に目的化合物を蓄積させる技術が進展する一方、蓄積させた目的化合物の生体膜を横切る輸送の効率化は発酵生産において克服すべき課題の一つとなっている。膜輸送タンパク質は周囲の脂質分子や膜電位などの影響を受けつつ構造変化を伴いながら機能しているが、その脂質分子との相互作用や動的挙動に基づく作動機構の理解は充分ではなく、このことは膜輸送タンパク質の発酵生産における応用の大きな障壁となっている。本研究では、新しい解析技術を活用して膜輸送タンパク質作動機構の理解を深め、応用・デザインに繋がる知見を得ることを目的としている。

[方 法]

膜輸送タンパク質の電気生理学的解析には独自に開発したパッチクランプ系である微生物膜輸送タンパク質活性解析システムを用いた。膜輸送タンパク質の脂質分子との相互作用ならびに動的挙動解析はスーパーコンピュータ等を用いた全原子分子動力学シミュレーションによって行った。

[結果・考察]

メカノセンシティブチャネル (Msc) をモデル輸送タンパク質とした高活性化が課題の一つである。既に Msc の基質認識が寛容なことを膜輸送解析システムを用いて明らかにしている。プリン核酸合成を遺伝子工学で強化した *E. coli* に開口頻度が向上したアミノ酸置換をもつ *E. coli* 由来 L 型 Msc の遺伝子を導入したところ、プリン核酸類生産性が 1.4 ～ 3 倍程度上昇した。この高排出型 Msc の開口挙動をシミュレーションで解析したところ、高排出型では、①置換部位近傍の膜貫通ヘリックスで野生型では見られない kink が生じ、②置換部位のアミノ酸残基と脂質分子及び水分子との相互作用が野生型よりも安定であった。①は全く想定外で、その高排出への寄与機構は興味深く、シミュレーション結果の詳細な解析を行っている。この解析結果を基にさらに高排出な Msc を創出する。

光合成細菌由来の未解析陰イオンチャネル様タンパク質を膜輸送解析システムで解析し、それが電位依存性チャネルであることを明らかにした。

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.