

第 16 回
助 成 研 究 報 告 会

日 時 : 2022年6月3日 (金) 13:00~17:40

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

*Zoomウェビナー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)

2020年度大型研究助成<口頭発表> (13:10~15:15)

- 0-1 ゲノムワイド・セントラルドグマ解析を基盤としたオルガネラ・細胞分裂増殖機構の新パラダイム構築と分子機序の解明
吉田 大和 (東京大学大学院理学系研究科)
- 0-2 環境中の未培養原生生物種の1細胞ゲノム解読手法の確立
本郷 裕一 (東京工業大学生命理工学院)
- 0-3 電気で微生物の代謝を制御する：電気遺伝学の創生
渡邊 一哉 (東京薬科大学生命科学部)
- 0-4 海洋分解性プラスチックの基材開発に資するアーキアポリ- γ -グルタミン酸
芦内 誠 (高知大学農林海洋科学部)
- 0-5 植物バイオマス生産を制御する微生物由来気相コミュニケーション物質に関する包括的研究
上田 晃弘 (広島大学大学院統合生命科学研究科)
- 0-6 ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による高効率クエン酸生産糸状菌の育種
桐村 光太郎 (早稲田大学理工学術院先進理工学部)

2016年度寄付講座助成<口頭発表> (15:20~15:55)

- 0-7 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)

休憩 (15:55~16:10)

*Zoomミーティングの各ブレイクアウトルーム内で発表・討論を行います。参加者はご関心のある発表者ルームへ入室してください。

2020年度一般研究助成、若手研究者助成、2019年度若手研究者助成、
寄付講座助成（中間報告） <ポスター発表>

- P-1 国内の異なる積雪環境に適応した担子菌ガマノホタケ科Typhulaceaeの多様性解析とその環境適応能の評価
星野 保（八戸工業大学工学部）
- P-2 Fungi界に特有なペプチド性化合物生合成因子の生物学的機能解明
梅村 舞子（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）
- P-3 難培養微生物の培養を目指した新規共培養法の構築
雪 真弘（理化学研究所バイオリソース研究センター）
- P-4 一大未知生物群“深海・外洋性ディプロネマ類”の実体と多様性の理解、および分類体系の整理
矢吹 彬憲（海洋研究開発機構地球環境部門海洋生物環境影響研究センター）
- P-5 白癬菌における分類体系の再検討と薬剤耐性との関連性に関する研究
山田 剛（帝京大学医真菌研究センター）
- P-6 好熱性シアノバクテリアの系統分類体系と菌株コレクションの確立
春田 伸（東京都立大学大学院理学研究科）
- P-7 酢酸菌群の光に対する適応応答の包括的理解
高野 英晃（日本大学生物資源科学部）
- P-8 脂質非対称バイオセンサーの開発を通じた生体膜研究のボトルネック解消と細胞外物理化学変数の感知機構に関する新奇概念の提唱
小原 圭介（名古屋大学大学院理学研究科）
- P-9 病原性細菌における毒素遺伝子保有ファージを誘発する因子およびファージ獲得機構の解析
島村 裕子（静岡県立大学食品栄養科学部）
- P-10 腸内細菌科細菌における新規カルバペネム高度耐性機構の解明
多田 達哉（順天堂大学大学院医学研究科）
- P-11 オートファジーから逃れるタンパク質の網羅的解析
古川 健太郎（新潟大学大学院医歯学総合研究科）
- P-12 細菌べん毛成長端の機能構造解析に基づくべん毛形成機構の解明
今田 勝巳（大阪大学大学院理学研究科）
- P-13 液胞よる染色体・核小体の核内配置制御の解析
丑丸 敬史（静岡大学大学院総合科学技術研究科）

- P-14 糖消費速度をモニタリングするフラックスセンサーの探索
柘植 陽太 (金沢大学新学術創成研究機構)
- P-15 耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus*の高温下での脂質代謝変化の解析
星田 尚司 (山口大学大学院創成科学研究科)
- P-16 海藻 (褐藻) 分解小動物の腸管と腸内複合微生物の協同による褐藻の完全分解系の
解明
河井 重幸 (石川県立大学生物資源工学研究所)
- P-17 昆虫共生細菌による殺虫剤の腸内解毒機構の解明
菊池 義智 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
- P-18 低グルコース環境に対する分裂酵母の適応戦略
中岡 秀憲 (東京大学大学院総合文化研究科、現 京都大学大学院生命科学研究科)
- P-19 新規機能性DNA断片を介した酵母の適正なゲノム構造維持機構の解明
飯田 哲史 (東京大学定量生命科学研究所、現 理化学研究所バイオリソース研究センター)
- P-20 ゲノムDNAは、細菌細胞内ではどのように折りたたまれているのか：HUタンパク
質による細菌ゲノムDNA折り畳み機構
大島 拓 (富山県立大学工学部)
- P-21 グラム陽性菌に見いだされた新規電子受容体と超低栄養生育との関連性
吉田 信行 (静岡大学大学院総合科学技術研究科)
- P-22 一細胞力学操作を用いた病原性細菌の細胞侵入における定量的解析：細菌感染を支
配する力学的メカニズムの解明
久保田 寛顕 (東京都健康安全研究センター微生物部)
- P-23 好熱性細菌*Thermus thermophilus*におけるコエンザイム A合成経路の制御機構の
解明とCoA製造への応用
本田 孝祐 (大阪大学生物工学国際交流センター)
- P-24 植物免疫を活性化する微生物の新規評価法の確立と探索への応用
古屋 俊樹 (東京理科大学理工学部)
- P-25 バイオ医薬品の次世代製造宿主を指向した光発現誘導システム導入ブレビバチルス
菌の創製
浅野 竜太郎 (東京農工大学大学院工学研究院)
- P-26 長期間持続可能なインジゴ還元発酵液の新規調整方法の開発
湯本 勳 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
- P-27 病原性細菌の毒素産生を阻害するプロバイオティクスの探索ならびにその作用機構
の解明
野田 正文 (広島大学大学院医系科学研究科)

- P-28 酵母FLO assayを基盤とした真菌二次代謝産物からのエピジェネティック機能探索
杉山 圭一 (国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)
- P-29 発酵食品中の微生物間相互作用を仲介する酵母プリオン様因子[*GAR⁺*]の作用機序に関する研究
渡辺 大輔 (京都大学大学院農学研究科、現 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)
- P-30 柑橘類の優れた芳香族化合物生産能を利用した酵母による*trans*-ケイ皮酸の発酵生産
大橋 貴生 (摂南大学理工学科)
- P-31 Nrf2/SKN-1制御系を活性化する乳酸菌体成分の探索と長寿機構の解明
小村 智美 (奈良女子大学大学院生活環境科学系、現 兵庫県立大学環境人間学部)
- P-32 進化解析に基づく高機能PET加水分解酵素の創出
吉田 昭介 (奈良先端科学技術大学院大学研究推進機構研究推進部門/先端科学技術研究科)
- P-34 乳酸菌が産生する菌体外多糖の免疫増強活性に寄与する酵素の構造基盤の解明
松崎 千秋 (石川県立大学生物資源工学研究所)
- P-35 共生微生物によるダイズ黒根腐病防除機構の解明
岡崎 伸 (東京農工大学大学院農学研究科)
- P-36 新コンセプト「電子伝達体キノンの構成改変による代謝調節」の実証
中澤 昌美 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)
- P-37 リグニンの主要結合を開裂する微生物の探索とリグニンからのポリマー原料生産への応用
上村 直史 (長岡技術科学大学物質生物工学系)
- P-39 単一の細胞が精巧で微小な構造物を構築する原理の解明
野村 真未 (京都大学人間環境学研究科、現 山形大学理学部)
- P-40 彩雪をもたらす氷雪性緑藻の種の全世界的な解明：培養株の多面的解析と野外サンプルとの比較分子解析
松崎 令 (筑波大学生命環境系)
- P-41 少数細菌の検出を可能とする深層化16Sメタゲノム解析法の開発
後藤 愛那 (京都大学大学院生命科学研究科)
- P-42 グラム陰性菌外膜タンパク質アセンブリー機構の解析
塩田 拓也 (宮崎大学テニユアトラック推進室・JST創発)
- P-43 原核微生物が持つエピジェネティクスの理解に向けた海洋細菌群集のDNAメチル化修飾の系統網羅的解析
平岡 聡史 (海洋研究開発機構海洋機能利用部門)

P-44 病原性染色体による宿主特異性の決定・分化機構の解明

鮎川 侑 (理化学研究所環境資源科学研究センター)

P-45 大腸菌の外膜品質管理に関わる2機能性タンパク質BepAの基質認識・選別機構の解明

宮崎 亮次 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所、現 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

P-46 DPANN群に属する新奇アーキアの共生機構の解明

酒井 博之 (創価大学理工学部)

P-寄1 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 (筑波大学生命環境系糸状菌相互応答学寄付講座)

P-寄2 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附属アグロバイオテクノロジー研究センター微生物膜輸送工学寄付講座)

P-寄3 多様な糸状菌類の固体気質認識ならびに侵襲メカニズム解明を基盤とする糸状菌・環境インターフェイス工学の創生とその研究教育拠点の形成

吉見 啓 (京都大学大学院農学研究科糸状菌・環境インターフェイス工学講座)

要旨(大型研究助成)

ゲノムワイド・セントラルドグマ解析を基盤としたオルガネラ・細胞分裂増殖機構の新パラダイムの構築と分子機序の解明

吉田 大和 (東京大学大学院理学系研究科)

[背景・目的]

真核生物が持つ高次機能の多くは、様々な細胞小器官（オルガネラ）によって生み出されている。これらのオルガネラは分裂することによって数を増やし、細胞が分裂増殖する際には正しく娘細胞へと引き継がれていく。しかしながら細胞分裂増殖時に機能する遺伝子数は膨大であり、オルガネラや細胞の分裂増殖がどのような機構によって統御され、実現しているかは未だ十分に明らかではない。本研究では、最もシンプルな単細胞真核生物である原始紅藻シズンを用いることによって、細胞とオルガネラの分裂増殖時に発現する全遺伝子の転写量・翻訳状態・機能的役割を解析する“ゲノムワイド・セントラルドグマ解析”を実施し、細胞の分裂増殖という生物の基本原理を支配する真の分子機序の解明および概念を革新する新パラダイムの構築を目指す。

[方 法]

原始紅藻シズンを光による明暗周期培養によって細胞分裂を同調化させ、分裂増殖期に特異的に発現する遺伝子群を特定し、全対象遺伝子の転写量・翻訳状態・機能的役割の解析を試みた。同解析を実施するため、新たにタンパク質一分子レベルでの顕微解析法や、CRISPR-Cas9 イメージング技術“シズンカッター”を確立した (Tanaka et al., 2021, *J. Cell Sci.*)。

[結果・考察]

細胞周期を同調化したシズンを用いたトランスクリプトーム解析から、オルガネラ分裂期に特異的に発現する機能不明遺伝子 24 個を同定した。各遺伝子の必須性および細胞内局在を解析した結果、少なくとも 3 遺伝子については、僅かタンパク質 10 コピー以下で機能する“極少数性の転写制御因子”であることが分かった【結果 1】。現在までにこれほど少ないコピー数で機能する転写因子は殆ど知られておらず、新たな遺伝子制御機構の存在が明らかとなった (Yabe et al., in preparation)。また超高感度蛍光顕微鏡法によって、RNA の存在量は変わらないにもかかわらず、細胞分裂期にタンパク質翻訳量が増加する未知の細胞内現象“タンパク質翻訳バースト”を捉えることに世界で初めて成功した【結果 2】。解析の結果、同現象はリボソームの翻訳活性制御を通じて限られた細胞内リソースを適切に振り分ける機構であり、細胞とオルガネラが“増える”ために必須の機構であることが明らかとなった (Mogi et al., in preparation)。

環境中の未培養原生生物種の1細胞ゲノム解読手法の確立

本郷 裕一（東京工業大学生命理工学院）

[背景・目的]

環境中の大多数の微生物種は未培養であるため、メタゲノミクスやシングルセルゲノミクスなどの培養非依存的手法による研究が広く行われるようになった。特に原核生物群集については、メタゲノム断片を情報解析によって種ごとに仕分ける手法（ビニング）が開発され、加速度的に研究が進んでいる。しかし、未培養原生生物種のゲノミクスとトランスクリプトミクスについては、手法が確立していない。本研究では、未培養のシロアリ腸内原生生物種を題材としたシングルセルゲノミクスを行い、手法の最適化を試みる。

[方法]

コウシュンシロアリ腸内の多核原生生物種を1細胞分取し、界面活性剤で中身を漏出させた。核を分取して全ゲノム増幅を行うとともに、残りの細胞質画分からcDNAライブラリを調製した。MiSeqで予備的配列解析を行った後、NovaSeqで約350Gbの配列を取得した。cDNA配列はMiSeqで8Gb取得し、アセンブル後に両者の情報からゲノムのアノテーションを行った。

[結果・考察]

配列解析した結果、環境細菌由来と見られる配列が多数混入していた。そこで、メタゲノムから真核生物配列を識別する、最近開発された解析プログラムを用いて原核生物由来の可能性が高い配列を除去した。さらに、節足動物・植物（木片）・真菌由来と見られる配列も多数混入していたため、それらを相同性検索プログラムで判別しながら頻度も考慮して除去した。残った約28,000の遺伝子（近縁培養種との比較で推定完成度70%）に関して機能解析を行った結果、100個以上の糖質加水分解酵素（GH）遺伝子を含み、5種類のセルラーゼ遺伝子が発現量で80位以内に入っていた（GH発現量は全体の2%弱）。また、ビタミン類と11種類のアミノ酸を合成不能であることが示唆された。

まだ解析中であるが、解決すべき課題としては、予想以上に真核・原核生物由来の混入配列が多く、環境試料の調製方法と、特にビニング手法を最適化していく必要がある。原生生物は原核生物から多数の遺伝子を水平伝播で獲得している可能性があり、配列断片の識別方法確立は重要である。

電気で微生物の代謝を制御する：電気遺伝学の創生

渡邊 一哉（東京薬科大学生命科学部）

[背景・目的]

近年、電気化学活性菌（外界と電子をやり取りすることができる微生物、EAB）を様々なバイオテクノロジーへ応用する試みが盛んに行われている。例えば、発酵代謝経路に電極からの電子を注入して基質をより還元的な生産物に変換する電気制御発酵は、新たな物質生産法として注目されている。これにおいては、低電位電極の存在下で必要となる酵素遺伝子が効率よく発現するすることが必要となるが、EAB の代謝系遺伝子の中には低電位で発現抑制されるものがあることが知られている。一方我々の研究室では、EAB の *Shewanella oneidensis* MR-1 は Arc システムを用いて電極電位を認識し、低電位条件と高電位条件では異なる異化代謝経路を発現・利用することを発見した。このシステムを用いれば、電極により EAB 内の遺伝子発現を制御する新しいバイオテクノロジーが創生できると期待された。そこで本研究では、細胞機能を制御するための新たなプラットフォームとして“電気遺伝学 (Electrogenetics)”を提案し、その proof of concept を行うこととした。また、これを通して電気遺伝学をバイオテクノロジーに応用するための基盤の確立を目指した。

[方 法]

S. oneidensis MR-1 の培養や遺伝子操作は Hirose らの文献 (Hirose et al. 2018 Nat. Commun. 9:1083)、電気化学セルの運転は Koga らの文献 (Koga et al. 2020 Environ. Microbiol. 22 : 3671-3684) に従った。

[結果・考察]

今までのトランスクリプトーム解析により、電位および Arc 系に依存的に発現する遺伝子が検出されている。これらの遺伝子の幾つかについて定量 PCR を用いた発現変動解析を行い、低電位で顕著に発現上昇する遺伝子として Na ポンプ型 NADH dehydrogenase をコードする *nqr1* を同定した。またこの遺伝子上流配列を解析し、低電位で発現誘導するプロモータ領域を同定した。このプロモータの異種遺伝子発現における利用可能性を検証する目的で嫌気 GFP レポーター株を作製し、電極上に生育する細胞における電位依存的蛍光生成を観察した。その結果、電極を低電位 (-0.4 V vs. SHE) に設定すると～60 分以内に顕著な蛍光が見られるようになり、このプロモータの有用性が確認された。今後、この遺伝子発現系を電気制御発酵の高効率化に利用していきたい。

海洋分解性プラスチックの基材開発に資するアーキアポリ- γ -グルタミン酸

芦内 誠 (高知大学農林海洋科学部)

[背景・目的]

微生物は肉眼では見ることのできない微小な生物であるが、あらゆる環境に適応し、地球環境や私たちの生活と密接な関わりをもつ。事実、熱水が噴出する海底の高温環境、極地等の低温環境、深海のような高圧／超貧栄養環境、塩湖のような高塩環境等、過酷な環境にも微生物は存在する。地球外生命の探索モデルにもなりそうな、所謂「極限環境微生物」の適応戦略を理解し、新たな産業応用の基礎を築く必要がある。今回、環境適応因子として注目される高分子「アーキアポリ- γ -グルタミン酸」の機能化と量産化に資する生物材料化学に着手した。

[方法]

立体規則性に優れたアーキアポリ- γ -グルタミン酸 (L-PGA) は、*Natrialba aegyptiaca* の親水性分泌物画分より分離した。立体規則性を欠くポリ- γ -グルタミン酸 (DL-PGA) は、納豆菌起源である。PGA の廉価回収や改質のため、第四級アンモニウム化合物 (QAs) を用いた。耐水化した本新素材をポリ- γ -グルタミン酸イオンコンプレックス (PGAICs) と名付けた。各種機器分析により該 PGAICs の分子構造や機械物性を明らかにした。抗菌・抗ウイルス能や海洋分解性の新機能については、ISO・JIS 標準 (規格) に準拠、あるいは参照しながら評価した。*N. aegyptiaca* の L-PGA 合成遺伝子群を調べるため、独自開発の「メチレンブルー・ファンクショナルクローニング (MBC)」の適用を試みた。

[結果・考察]

PGA と QAs の間で起こる選択的な会合現象に着目し、これを応用した PGA の廉価回収技術の完成と特許化、PGAICs の量産に資する改質プロセスの迅速化にも成功した。PGAICs にはプラスチックとしての用途化に堪える物性 (熱特性等) に加え、抗菌・ウイルス不活化 (衛生強化／微生物活動の抑制) と海洋分解加速 (環境配慮／微生物活動の加速) という明らかに相反する特性を「スイッチング機能」で両立可能にする現状稀有の部材化物質としての価値が見いだされた。かかる高性能 PGAICs の量産化には、その基材となる L-PGA の効率合成が必要不可欠と考えられる。そこで、これまでに巨大菌 PGA 合成オペロンの同定で実績のある MBC 法 (上述) を採用し、該 L-PGA 合成を司る候補遺伝子群の単離を試みた。現在、各種クローン株を用い、さらなる機能分析 (固体培養依存的な機能発現調節機構の可能性等) を進めている。

植物バイオマス生産を制御する微生物由来気相コミュニケーション物質に関する包括的研究

上田 晃弘 (広島大学大学院統合生命科学研究科)

[背景・目的]

自然環境中の微生物には植物の生育促進作用を持つ植物生育促進微生物が存在し、植物栽培現場で利用可能な微生物資材としての実用化が期待されている。しかしながら、生きた微生物を農業資材として使用する生物資材は、化学肥料・農薬のような化学資材よりも効果が弱く、持続性に欠けることが弱点となっている。植物生育促進微生物の単離には、植物-微生物直接的相互作用系が用いられることがほとんどであるが、間接的相互作用系に着目した選抜事例は少ない。本研究では、植物-微生物間接的相互作用系を用いた植物生育促進微生物の単離を行い、植物生育促進効果を持つ揮発性物質 (mVOC) の同定を試みた。

[方法]

国内の様々な土壌・水環境に自生する植物のサンプリングを行った。植物表面や内部に生息する微生物の単離を行い、シロイヌナズナとの隔離共培養に用いた。隔離共培養には 2 分割シャーレを使用し、片側にはシロイヌナズナ培養用の 1/2 濃度の MS 培地、もう片側には細菌・真菌培養用の LB・PDA 培地を作成した。培養は 23°C で 2~3 週間行い、シロイヌナズナの新鮮重を増加させる微生物の選抜を行った。植物生育促進効果が確認された微生物種の同定を行った後、GC-MS を用いて微生物が放出する mVOC を同定した。揮発性物質を用いたシロイヌナズナの生育促進効果を検証するとともに、シロイヌナズナの遺伝子発現解析 (RNA seq) や元素分析 (ICP-OES) を行った。

[結果・考察]

約 1,000 種の単離微生物について選抜を行ったところ、*Pseudomonas* 属や *Salinicola* 属などの細菌がシロイヌナズナの生育を間接的に促進することが明らかとなった。生育促進効果を持つ微生物から放出される mVOC を同定したところ、2-undecanone や 2-tridecanone、3-methyl-1-butanol 等、複数の mVOC が検出された。mVOC のみを用いた植物栽培試験を行ったところ、2-undecanone は顕著な生育促進効果を示したことから、mVOC が植物生育促進に直接関わっている可能性が示唆された。遺伝子発現解析や元素分析から mVOC が持つ植物の生育促進効果について考察したい。

ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による 高効率クエン酸生産糸状菌の育種

桐村 光太郎 (早稲田大学理工学術院先進理工学部)

[背景・目的]

クエン酸は、食品や飲料の酸味料あるいは樹脂の原料、医薬品や化成品の安定（化）剤や pH 調整剤などとして広く利用されており、糸状菌 *Aspergillus Section Nigri* (クロコウジカビ) に属する菌株を使用して工業的に発酵生産されている。本研究は、クエン酸の輸送系をコードする遺伝子群を解析し、ゲノム編集システムを利用した輸送系の改変に基づく新規なクエン酸生産糸状菌の育種を目的として実施した。

[方 法]

演者らは、クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L (NBRC 111403) を供試菌として、DNA と CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集システムを確立している。そこで、当該システムを駆使してクエン酸輸送系を解析し、各種の遺伝子ノックアウト株やノックイン株を作製した。作製した種々の株については、表現型（寒天培地上での形態や分生子の形状）を調べ、液体培地を使用したクエン酸発酵試験を行った。有意な特性を示す候補株については、各遺伝子の転写解析を行った。

[結果・考察]

WU-2223L 株のゲノムサイズは 35.0 Mb で、11,493 個の推定遺伝子が見出された。ミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸の輸送に関わるミトコンドリア局在型の有機酸輸送体（対向輸送を行うと想定されるもの）をコードする遺伝子は 12 個存在し、クエン酸発酵条件下で 7 個が転写されていた。そこで、各遺伝子についてノックアウト株を作製し、特徴を詳細に検討した。遺伝子 *cocA* はクエン酸と 2-オキソグルタル酸等の対向輸送体をコードすると想定されるが、*cocA* ノックアウト株ではクエン酸生産量が激減した。すなわち、*cocA* がクエン酸生産に寄与することを明らかにした。一方、サイトゾルから細胞外へのクエン酸輸送系をコードする遺伝子が *cexA* であることを明らかにした。WU-2223L 株は 2%(v/v) メタノール添加条件下でグルコースからのクエン酸生産量が高い（メタノール効果を示す）が、*cexA* 高発現株ではメタノール無添加条件下でもクエン酸生産量が高く、メタノール効果非依存性の生産株の作製に成功した。



要旨(寄付講座助成)

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、以下の研究を実施した。

[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」（当該機能に特化しており進化的起源が不明な）*lin* 遺伝子群の起源を解明するため、(1-1) 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、(1-2) 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行った。また、(1-3) 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た。その結果、(i) γ -HCH 添加により土壌メタゲノム中の *lin* 遺伝子群の割合は増加するが、単純に特定の分解菌が増加したと考えられる比率ではないこと、(ii) かつて γ -HCH 分解菌の標準株である UT26 株が単離された土壌から、ゲノムの基本骨格は UT26 株と同一だが、 γ -HCH 分解機能に関しては UT26 株より「進化型」と考えられる株が単離されたこと、から、土壌中の γ -HCH 分解細菌が実際に集団として進化していることを示す結果を得た。また、 γ -HCH 分解細菌が DNase による攻撃を受けにくい *lin* 遺伝子群を有する MV を産出することを明らかにし、MV が遺伝情報のリザーバーとして機能する可能性を提示した。一方、キャプチャリング株作製の過程で、天然株より優れた人工の γ -HCH 分解細菌株の育種にも成功した。

2. 脱ハロゲン酵素の機能進化（酵素レベル）

(2-1) γ -HCH 分解資化に関与する haloalkane dehalogenase (HLD) の実験進化系を構築し、(i) 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、(ii) 本系で実際に「進化型」酵素が取得できることを示した。一方、(2-2) 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。以上、人工化学物質分解にも関与する HLD 酵素群が多彩な機能・特性を有し、かつ特性を変化させやすい酵素であり、有用機能の開発と強化のための酵素資源として優れていることを提示した。

3. 環境適応・進化に関与する細胞機能（細胞レベル）

(3-1) γ -HCH 分解細菌株の γ -HCH 資化に必須な新規 ABC トランスポーター LinKLMN が (i) 外膜の integrity 維持、(ii) 外膜成分脂質の輸送に関わることを支持する結果、および LinN が 8 量体として機能する可能性を示す構造学的解析結果を得た。一方、(3-2) alcohol dehydrogenase (ADH) をコードする *adhX* 遺伝子の高発現で、従属栄養細菌である UT26 株が有機炭素源非添加無機塩培地で大気中の CO₂ 固定を伴い増殖する現象 (HYGO 表現型) を見出した。独自に開発した qTn-Seq 法などを用いて HYGO 表現型の機構解明を進めた結果、(i) グリオキシル酸回路によって脱炭酸を抑えると共にアナプレロティック反応により CO₂ を固定すること、(ii) 大気中に極微量に存在するアルコール類等を利用して増殖していること、が強く示唆された。以上、これら分解酵素以外の細胞機能も細菌の新規代謝能力の獲得や進化に重要な役割を担うことを提示した。

4. 細菌集団の形成と進化（集団レベル）

(4-1) 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、それらの共存には、(i) 液体培地のような均質な環境ではなく、固体培地のような空間構造を持つ環境が必要であること、(ii) TonB-dependent receptor-like protein (TBDR) が関与すること、を提示した。なお、本 TBDR は、HYGO 表現型にも関与する。一方、(4-2) 集積培養により得られた非分解細菌を含むヘテロな γ -HCH 分解細菌コミュニティが分解細菌単独よりも長期持続的な分解能力を発揮することを明らかにすると共に、本コミュニティ形成における *Cupriavidus* 細菌株の重要性を提示した。さらに、(4-3) 移動性の非分解細菌株との共接種で、 γ -HCH 分解細菌株は、(i) 固体培地上でより広範囲の γ -HCH を分解できること、(ii) 土壌での生残性が飛躍的に高まること、を明らかにした。本成果は、直接的にバイオレメディエーション等への応用への展開が可能である。また、(4-4) 土壌細菌集団の菌叢変化から相互作用を推定し、易培養性細菌を利用して難培養性細菌が培養できることを提示した。

5. その他の関連研究

(5-1) UT26 株由来の γ -HCH dehydrochlorinase LinA 発現を発現する形質転換シロイヌナズナを作製し、本形質転換植物が γ -HCH 分解活性を有し、顕著な γ -HCH 耐性を示すことを明らかにした。(5-2) γ -HCH 分解細菌以外の環境細菌を対象として、細菌の環境適応・遺伝子水平伝播に関する知見を得た。

要旨(一般研究助成)

要旨(若手研究者助成)

国内の異なる積雪環境に適応した担子菌ガマノホタケ科 Typhulaceae の多様性解析とその環境適応能の評価

星野 保 (八戸工業大学工学部)

多様な積雪環境を有する青森県内を中心に研究例の少ないガマノホタケ *Typhula* 属の探索およびその環境適応戦略を検討した。

融雪後、八甲田山系や下北半島の落葉樹落葉や、少雪土壌凍結環境である八戸市周辺で採集した菌核から培養菌株を調整し、ITS 領域の遺伝子配列を解析した結果、遺伝子データベースに登録された菌株とは、大きく異なることが明らかとなった。今後、既知種との形態の比較をおこない、さらに同定を進める予定である。

スナハマガマノホタケ *T. maritima* は、本属では国内で唯一、海浜環境に適応した種である。本種はこれまでハマニソクなどイネ科植物を宿主とし、本種菌核は他種にない、海水を浮遊する性質を有する。

菌核による海流分散の可能性を検証するため、本種菌核に模したセルロース粒の散布・回収結果から、波浪により生息地のかく乱に伴い、分布域が 500m 程度移動する可能性を明らかにした。また、本種がシロヨモギやハマエンドウなどイネ科以外の海浜植物を宿主とし、特にシロヨモギには強く固着する大型の菌核が見られた。これらの観察より、本種は宿主に応じて異なるサイズの菌核を形成し、小型菌核のみ単独で海流分散するものと判断した。

Fungi 界に特有なペプチド性化合物生合成因子の生物学的機能解明

梅村 舞子 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

Kex2-processed repeat protein (KEP) は Kex2 ペプチダーゼが切断する反復タンパク質であり、近年申請者が見出した糸状菌で最初のリボソームペプチド化合物群の前駆体でもある。ほぼすべての Fungi 界菌株に一株平均 5 個保存されている普遍的な因子だが、その生物学的機能はほとんど明らかになっていない。Fungi 界 1461 株のドライ解析から、本 KEP 群は種特異的に高い多様性を示し、糸状菌の種 / 属レベルでの自他認識や有性生殖に参与する可能性が示唆された (Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7:11, 2020)。そこで、ホモタリックな種である *Aspergillus nidulans* から子嚢殻形成度の異なる 4 株を選択し、ゲノム・全遺伝子発現解析と遺伝子破壊による形態観察を行ったところ、KEP 因子の 1 つについて子嚢殻形成への関与が示唆された。また *Aspergillus flavus* が持つ 15 の KEP 因子をそれぞれ破壊したところ、5 つについて菌核形成能が消失したが、うち 4 つは有性生殖が知られていない *Aspergillus oryzae* 株で欠損しているものであった。KEP 因子群は基本的に Fungi 界以外にホモログが存在せず由来は不明だが、130 以上の単一コピーオルソログから推定した菌株間進化距離との関係から、菌株毎に 1 種類程度が属レベルで保存され、その他は種分化時に獲得されてきたと考えられる。これらのことから、本因子群は真菌分類の指標の 1 つとなりうる。

難培養微生物の培養を目指した新規共培養法の構築

雪 真弘 (理化学研究所バイオリソース研究センター)

地球上の 99% の微生物が未だ培養することが出来ていないと考えられている。もし、これらの難・未培養微生物が培養可能になれば、莫大な微生物資源を利活用でき、様々な産業・学術分野において大きな変革をもたらすことができると考える。難培養の理由の一つとして環境中の微生物が様々な異種の微生物と栄養源等を介して相互作用関係にあり、単独では培養することが難しいことが挙げられる。本研究では、複雑な環境中の相互作用関係を模倣した新規共培養システムを構築し、難・未培養微生物の培養を目指した。新規共培養としては、内部が中空のアガロースゲルマイクロカプセル (AGM) を用いた。AGM の特徴として、低分子量の化合物を透過できる点、嫌気条件下で作製が可能点が挙げられる。AGM にシロアリ腸内の難培養細菌を 1 細胞ずつ閉じ込め、嫌気培養を試みた。その結果、AGM 内で、これまでに報告例のない 2 種の *Dysgonomonas* 属細菌の分離培養に成功した。本研究で開発した AGM を用いた新規共培養は、様々な環境の細菌叢に応用が可能であり、難培養微生物の資源化に貢献できると考える。

一大未知生物群“深海・外洋性ディプロネマ類”の実体と多様性の理解、および分類体系の整理

矢吹 彬憲 (海洋研究開発機構地球環境部門海洋生物環境影響研究センター)

ディプロネマ綱 (類) は、ミドリムシ等が含まれるユーグレノゾア門に含まれる真核微生物の一群である。2014 年までは、わずか 2 属 12 種のみが含まれる規模の小さい生物群であったが、環境 DNA 解析からは海洋、特に深海において数多くの未記載種が生息している可能性が示されていた。それら実体が不明なメンバーの理解は、海洋生物の真の多様性と海洋 (微) 生物生態系の成り立ちをより正確に理解する上で重要であり、その促進が期待されていた。

本研究では、未記載種の発見報告とともにディプロネマ綱全体の分類学的再整理を目指して研究を実施した。研究対象である実体不明のメンバーをどのように発見し実際に研究を取り行っていくかを定めるために、深海由来の水や深海生物が生息する水族館の水より環境 DNA を抽出し目的生物の存在や多様性に関する情報を把握した。確立した解析手法や実際の多様性情報は原著論文として報告している。また確立した培養株を用いた解析やこれまでに収集した知見の精査を通じてディプロネマ綱全体の分類学的な再整理を含むレビュー論文を公開することができた。ポスターではこれらの成果について紹介する。

白癬菌における分類体系の再検討と薬剤耐性との関連性に関する研究

山田 剛 (帝京大学医真菌研究センター)

白癬菌 *Trichophyton indotineae* は、わが国では国民病とも言われる白癬の原因菌の 1 つである。本菌は、臨床的所見や生理的性状、遺伝子の塩基配列などのデータを基に、数年前に *T. mentagrophytes/T. interdigitale* complex (複合群) から独立した新種のグループとしての提案がなされた。*T. indotineae* では、アリルアミン系抗真菌薬であるテルビナフィンの低感受性株に関する知見が散見される一方、アゾール系抗真菌薬への感受性に関する知見が少ない。演者はインドで分離された 30 株以上の *T. indotineae* を対象に、2 種類のアゾール、イトラコナゾールとボリコナゾールに対する感受性を調査し、低感受性化が認められる複数の株を見出した。そして、これらの株に共通する薬剤低感受性化の原因を解析し、アゾールの作用標的分子の 1 つである CYP51B (lanosterol 14 α -demethylase) をコードする遺伝子の重複が繰り返し起こり、ゲノム上でタンデムリピート化したことによって CYP51B が過剰発現したことが主な原因であると結論づけた。

好熱性シアノバクテリアの系統分類体系と菌株コレクションの確立

春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)

米国オレゴン大学では日本を含む世界中から収集した好熱性シアノバクテリア株を保有していたが、管理者の没後、未整理の状態が続いている。本研究では、これら未整理のシアノバクテリア株について遺伝子塩基配列情報を取得し再分類・整理するとともに、ゲノム情報から系統学的に特徴づけることを目的とした。

細胞形態、培養温度以外の情報がなかったオレゴン大学コレクションの約 100 株について、16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析し再分類した。これらは 8 科、9 属に分けられ、なかには既報配列との相同性が 80% 以下と低いものもあった。それらのうち、古い系統群に位置する好熱・単細胞性 *Synechococcus* sp. CCMEE 5213 株についてゲノム情報を取得・解析したところ、既知シアノバクテリアと異なる独立した系統であることが示された。さらに、日本からの分離株を含む糸状性 *Chlorogloeopsis* 系統について広く比較解析を行ったところ、ゲノム相同性および生理学的特性の違いから、好熱性株が中温性株と明確に異なる系統であることが示され、好熱性系統について属名 *Thermochlorogloeopsis* を提案した。

酢酸菌群の光に対する適応応答の包括的理解

高野 英晃 (日本大学生物資源科学部)

LOV-HTH は、生物に普遍的な内生因子フラビンをクロモフォアに利用する青色光センサーであり、また DNA 結合ドメインを有し、光シグナルを転写レベルに変換できる。我々は酢酸菌 *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388、*Komagataeibacter europaeus* JCM 16935 の LOV-HTH が隣接する光回復酵素遺伝子の発現を青色光特異的に誘導することを見出した。また、*G.liquefaciens* において、LOV-HTH タンパク質のフラビン特異的な吸収スペクトル、光誘導プロモーター領域の決定、網羅的な転写開始点の決定を通じて、酢酸菌よりはじめて機能性光センサーを見出した。さらに、LOV-HTH 近傍には光酸化ストレスセンサーホモログ ChrR がコードされ、特定のゲノム領域に光感知・応答遺伝子群が集中していることが判明した。果実・花などに棲息する本菌群の光応答はこれまで報告例が見つからないことから、本知見は酢酸菌の生態に新たな知見をもたらすとともに、光による物質生産制御技術への応用利用が見込まれる。

脂質非対称バイオセンサーの開発を通じた生体膜研究のボトルネック解消と細胞外物理化学変数の感知機構に関する新奇概念の提唱

小原 圭介 (名古屋大学大学院理学研究科)

細胞膜の脂質二重層では内外層で脂質組成が大きく異なる。その様な脂質非対称の維持や調節は細胞の生存に必須である。私は出芽酵母を用いて、脂質非対称の状態変化を感知して適応反応を引き起こす脂質非対称センサー Rim21 を同定した。また、そのセンサーモチーフを用いて、生きた酵母で脂質非対称変化をモニターできるバイオセンサーを作製した。本助成研究では、その雛型に対するエンジニアリングを行い、脂質非対称変化をより高いコントラストで可視化できる改良版を作製した。それらを用いて、様々な環境ストレス下の酵母を観察したところ、外界の pH 上昇や高塩ストレスによって脂質非対称変化が引き起こされることが示唆された。また、外界の pH 上昇によって脂質分子の内外層間反転移動が抑制され、それが脂質非対称変化を引き起こすことも示唆された。興味深いことに、Rim21 は外界の pH 上昇や高塩ストレスに対する適応に必要であった。すなわち、pH や塩濃度などの物理化学的変数の少なくとも一部は脂質非対称の変化を通して感知される可能性が出てきた。細胞膜が外界の物理化学変数に対する巨大なセンサーとして機能するという新しい概念を提唱したい。

病原性細菌における毒素遺伝子保有ファージを誘発する因子およびファージ獲得機構の解析

島村 裕子（静岡県立大学食品栄養科学部）

本研究では、病原性細菌である黄色ブドウ球菌の毒素（SEA）遺伝子の伝播機構の解明を目的に、SEA 遺伝子伝播株の性状および SEA 遺伝子を受容する SEA 非産生株（レシピエント）の性状を解析した。SEA 非産生株の培養上清より調製した膜小胞を SEA 産生株（ドナー、No.29 株）に添加したところ、No.29 株が溶菌し、さらに、一部の SEA 非産生株で SEA 遺伝子の伝播が確認された。次世代シーケンサーにより、ドナー株とレシピエント株の全ゲノムを解読したところ、No.77 株（レシピエント）は、*hly* 遺伝子領域に既にファージが存在しており、SEA 遺伝子の伝播が確認された No.77-L22 株では、元のファージの挿入位置に No.29 株の SEA ファージ配列が挿入されていた。No.29 株の SEA 遺伝子を受容する SEA 非産生株（レシピエント）の保有ファージ（SEA⁺）は、No.29 株が保有するファージテイル（ ϕ Mu3A）と同様のタイプであった。このことから、ファージの宿主菌への吸着メカニズムとして、同様のファージテイルを保有する菌株間で SEA 遺伝子が伝播する可能性が示唆された。

腸内細菌科細菌における新規カルバペネム高度耐性機構の解明

多田 達哉（順天堂大学大学院医学研究科）

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 CRE (*carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* の略) が地球規模で医療安全を脅かしている。CRE の多くはカルバペネム系薬を加水分解するカルバペネマーゼを産生していることが知られている。我々は沖縄の医療施設よりカルバペネマーゼを保有しないカルバペネム耐性肺炎桿菌を分離した。ゲノム解析の結果、本株はミューテータをコードする遺伝子 *mutS* の欠損が認められた。大腸菌 DH5 α を用いて *mutS* 破壊株を作製し、メロペネム含有培地で継代した結果、10代継代でメロペネム耐性 (MIC 4ug/ml 以上) となった。この継代株における各種 β -ラクタム剤の最小発育阻止濃度を決定したところ、セフェム系薬及びイミペネムを除くカルバペネム系薬で有意に上昇がみられたが、ペニシリン系薬に対する MIC 値に変化は見られなかった。さらに、本破壊株において継代前の株と 10 代継代株の RNAseq を行ったところ、内・外膜に関与する遺伝子、排出系に関与する遺伝子及び鉄代謝に関与する遺伝子の発現が有意に発現上昇していた。これらの内、遺伝子変異と関連したものは *hemB* であり、*hemB* のプロモータ領域の変異が発現を上昇させていることが分かった。今後は *hemB* の発現量の変化と薬剤耐性への関連を明らかにしていきたい。

オートファジーから逃れるタンパク質の網羅的解析

古川 健太郎 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)

オートファジーは、飢餓を含む様々なストレスによって誘導され、一般的なタンパク質は無作為に分解されると考えられている。しかしながら、特定のタンパク質は分解から逃れ、その生理機能を発揮した方が有利な状況もあるはずであるが、そのような概念（オートファジーエスケープ、以下エスケープ）はほとんど検証されていない。本研究では、酵母を用いてオートファジーから逃れるタンパク質を同定し、エスケープの概念を実証することを目的とした。

エスケープタンパク質を同定するため、GFP 融合タンパク質を利用した。オートファジーにより GFP 融合タンパク質が液胞に運ばれると、タンパク質は速やかに分解されるが、GFP そのものは液胞内でも分解されず、ウェスタンブロット解析で検出される。そこで、オートファジー誘導後に分解されない、即ち GFP 単体が検出されない融合タンパク質を探索した。発現量の低さが原因で GFP 単体の検出が困難な場合、蛍光顕微鏡を用いた液胞内 GFP 蛍光の有無による判断、あるいは、強力なプロモーターへの置換によって発現量を増加させた。本発表では、探索結果の一例を挙げ、エスケープの基本原理を議論したい。

細菌べん毛成長端の機能構造解析に基づくべん毛形成機構の解明

今田 勝巳 (大阪大学大学院理学研究科)

運動性細菌の多くは、べん毛と呼ばれる繊維状器官を用いて生存に適した環境へ移動する。べん毛の大部分を占めるべん毛繊維は、約 2 万個の FliC 蛋白質がらせん状に集合体したもので、先端に FliD 蛋白質 5 分子でできた蓋（キャップ）が存在する。べん毛はパイプ様の中空構造を持ち、菌体内で合成された FliC はパイプ中を通り先端へ運ばれ、キャップの下でべん毛に組込まれる。しかし、キャップが先端に結合したまま連続してフラジェリンを組込む機構、11 本の素繊維から成るらせん対称性を持つべん毛繊維と 5 回回転対称性を持つキャップがシンメトリーミスマッチを克服して安定に結合する機構といったべん毛伸長メカニズムは不明である。本研究では、キャップ蛋白質の結晶構造を 3.2 Å 分解能で解析し、クライオ電子顕微鏡解析で得た 8.5 Å 分解能の密度図を組み合わせ、サルモネラべん毛先端部の構造を原子レベルで解明した。その結果、キャップ 5 量体はべん毛先端で段差を持つ非対称な鳥カゴ状構造を形成し、段差の伝播によりべん毛繊維へ結合したままフラジェリン分子の挿入が可能にするという分子機構が明らかになった。

液胞による染色体・核小体の核内配置制御の解析

丑丸 敬史（静岡大学大学院総合科学技術研究科）

栄養源飢餓になるとプロテインキナーゼ TORC1 が不活性化し、リボソーム合成は抑制され、rDNA（rRNA 遺伝子）領域の凝縮が促進される。出芽酵母では飢餓後にミクロヌクレオファジーにより、核小体タンパク質を含む核の一部が液胞との接合部 NVJ において液胞内腔に向かって陥入し切除され液胞内腔で分解される。一方、染色体はヌクレオファジーにより分解されず、核小体に内包される rDNA も分解を免れる。発表者は、飢餓と TORC1 不活性化後、核小体タンパク質は NVJ 近傍に移動する一方、rDNA は凝縮しつつ核小体タンパク質から解離し、NVJ から離れた部位に移動することを発見した。この核小体リモデリングは核小体タンパク質のヌクレオファジー分解に重要である。

本助成研究において、申請者は液胞が NVJ を介して核内の核小体リモデリングを制御することを明らかにした。これは核外の細胞内小器官が核内の染色体動態を制御することを示す例である。さらに、NVJ に集積する核膜タンパク質のうち、Nvj1 に加えて Mdm1 が核小体リモデリングに必要であることを明らかにした。本発表ではその他についても紹介したい。

糖消費速度をモニタリングするフラックスセンサーの探索

柘植 陽太（金沢大学新学術創成研究機構）

微生物を用いて効率的に有用物質を生産するためには速い糖消費速度が必要である。糖消費速度の向上のためには代謝遺伝子の高発現などが行われているが、細胞が糖消費速度を感知して中央代謝遺伝子の発現レベルを制御しているかについては未だ不明な点が多い。そこで本研究ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌を用いて、はじめにグルコース消費速度が変動した際に中央代謝遺伝子の転写量とタンパク質の量の変動するかを検討した。使用菌株として野生株と単位菌体量当たりのグルコース消費速度が低下または増加する三株を用いた。qRT-PCR と定量プロテオミクス解析の結果、mRNA レベルでは 18 遺伝子が、タンパク質レベルでは 3 遺伝子がグルコース消費速度と相関して量が変わった。そこで次に質量分析計を用いた代謝解析により中央代謝経路の細胞内代謝物濃度を調べた結果、5 つの代謝物の濃度がグルコース消費速度と相関して変動した。以上の結果から、糖消費速度に反応して細胞内濃度が変動する 5 つの代謝物の中に、転写因子との結合を介して中央代謝遺伝子の発現レベルを制御するフラックスセンサーが存在する可能性が示唆された。

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の高温下での脂質代謝変化の解析

星田 尚司 (山口大学大学院創成科学研究科)

酵母 *Kluyveromyces marxianus* は 50°C 近い高温でも生育可能な酵母である。この *K. marxianus* の高温への適応に対する脂質の役割を解析するために、リピドーム解析を行ったところ、高温でリン脂質が減少し、トリアシルグリセロール (TAG) が増加することが明らかになった。そこで *K. marxianus* における高温での TAG 増加メカニズムとその高温耐性との関係を解析した。

脂質代謝遺伝子の温度依存的な発現変化を mRNA-Seq で調べると、いくつかの遺伝子で高温での発現が増加していた。さらにレポーター遺伝子を用いて発現量を定量した結果、*LRO1*、*GPT2*、*DAG1* の各遺伝子のプロモーターで発現増加がみられた。そこでこれらの遺伝子を CRISPR-Cas9 を用いて破壊し、高温での TAG 蓄積量を定量した結果、*LRO1* 遺伝子と *DGA1* 遺伝子のそれぞれの破壊株で細胞 (濁度) 当たりの TAG 量が低下した。また、これら破壊株の 40°C での増殖は野生株に比べて高かった。*LRO1* 遺伝子と *DGA1* 遺伝子は TAG を合成するアシルトランスフェラーゼをコードしており、TAG の蓄積と高温増殖能の関連が示唆された。

海藻 (褐藻) 分解小動物の腸管と腸内複合微生物の協同による褐藻の完全分解系の解明

河井 重幸 (石川県立大学生物資源工学研究所)

ハマトビムシは、砂浜生態系の一次生産物である漂着海藻の主要分解小動物 (直径 8 mm 程度) である。ハマトビムシの腸管では、腸管側代謝系と腸内複合微生物群とが協同する「褐藻の完全分解系」が機能していると推察される。本研究ではこの「完全分解系」の解明を試みた。

褐藻と紙の各々を食しているハマトビムシ各個体の腸管メタゲノム解析 (16S、ITS2、および 18S アンプリコン解析) の結果、餌や環境等の飼育条件によって固有の微生物叢は検出されず、腸管内微生物叢は個体ごとに大きく異なることが分かった。抗生物質介入により、単純化され餌に依存した微生物叢を示すようになったが、褐藻摂食と寿命に対する抗生物質介入の明瞭な効果は観察されなかった。褐藻と紙の各々を食しているハマトビムシに対する RNA-seq 解析の結果、両方でセルラーゼ遺伝子が検出されたが、褐藻を食するハマトビムシからアルギン酸の資化に関わる遺伝子は現在のところ検出されていない。抗生物質介入試験の結果も考え併せると、褐藻完全分解のために、セルロースは腸管セルラーゼにより、アルギン酸は腸内細菌により分解資化されると推察された。

昆虫共生細菌による殺虫剤の腸内解毒機構の解明

菊池 義智 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

異なる2種が共生することで、ときに生物は全く新しい機能を獲得する。これまでに我々は、農業害虫のカメムシ類が農薬分解菌 *Burkholderia* sp.SFA1 株を体内に共生させることで、昆虫自身までもが農薬抵抗性になることを見出してきた。しかし、宿主カメムシ体内における分解機構はほとんど解明されていなかった。そこで、まず初めに SFA1 株の *in vitro* 条件における農薬 (フェニトロチオン [MEP]) 分解経路を、ゲノム解析、遺伝子発現解析、および遺伝子破壊実験により解析し、その完全分解には 7 種類の遺伝子が関与することを明らかにした。一方、共生時 (*in vivo* 条件) における遺伝子発現解析を行ったところ、昆虫体内では分解経路の最初の遺伝子 (mpd) のみが発現していることが明らかとなった。mpd の遺伝子欠損株をカメムシに共生させたところ農薬抵抗性が消失したことから、共生細菌によるカメムシの農薬抵抗性には mpd 遺伝子のみが関与していることを実験的に明らかにすることができた。本研究は、共生細菌を介した害虫の農薬解毒について遺伝子レベルで解明した初の研究であり、害虫における農薬抵抗性の進化過程について新たな視座を与えるものである。

低グルコース環境に対する分裂酵母の適応戦略

中岡 秀憲 (東京大学大学院総合文化研究科、現 京都大学大学院生命科学研究科)

炭素源枯渇は細胞死に直結するストレスである。しかし低濃度グルコース含有培地で馴化させた分裂酵母細胞は、その後の炭素源枯渇に対して耐性をもつことが分かっており、自然界における微生物にとってこのような馴化応答は重要な生存戦略であると推察される。近年、細胞質の物性が着目されており、例えばエネルギー枯渇状態の細胞質がガラス様の性質を示すことや、定常期酵母の細胞質が硬化することが示唆されている。

本研究ではマイクロ流体デバイスを用いた長期ライブイメージングにより、低グルコース馴化の定常状態を特徴づけることを主眼とした。まず、馴化応答が定常に達するまでに 4 日程度必要であることが示唆され、この過程で pH の緩やかな低下や細胞内物質密度の上昇が確認された。一方で細胞質の流動性は保たれており、蛋白質凝集が抑制されていることが示唆された。このような細胞生理状態は急性グルコース飢餓や窒素源枯渇の場合とは異なる適応応答を反映したものと考えられる。

新規機能性 DNA 断片を介した酵母の適正なゲノム構造維持機構の解明

飯田 哲史 (東京大学定量生命科学研究所、現 理化学研究所バイオリソース研究センター)

ゲノムの不安定化によって引き起こされる遺伝子のコピー数変化は、様々な細胞異常を引き起こす。各生物は、適正なコピー数のリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) をタンデムリピートとして維持し、コピー数の大きな減少は DNA 損傷に感受性となる。したがって、適正な rDNA コピー数の維持は正常な細胞機能に重要である。我々は、出芽酵母 *S.cerevisiae* の rRNA 転写の活性化因子 UAF が、適正なコピー数 (150 コピー) からのコピー数減少を感知し、rDNA の安定性を維持する Sir2 の発現を抑制することで、適正なコピー数への回復を促す機構を見出した。本課題では、*SIR2* プロモーター領域から生成する新規の DNA 断片の性質を明らかにし、相互作用するタンパク質を同定することが出来た。また、UAF を介した *SIR2* 遺伝子の発現制御機構において、これまで、RNA ポリメラーゼ II の転写活性化因子として知られている複合体が *SIR2* 遺伝子の発言抑制に寄与している可能性を見出した。本発表では、rDNA と *SIR2* 遺伝子を結ぶゲノム構造維持の制御機構について議論したい。

ゲノム DNA は、細菌細胞内ではどのように折りたたまれているのか： HU タンパク質による細菌ゲノム DNA 折り畳み機構

大島 拓 (富山県立大学工学部)

我々は、多くの細菌と古細菌の一部が有し、生育に重要な DNA 結合タンパク質 HU に注目し、ヒストンを持たない生物のゲノム DNA の折りたたみ機構と、その生物学的な重要性を、大腸菌を用いて研究した。大腸菌には、HU とその相同タンパク質である IHF が存在する。この HU と IHF を同時に欠損すると、大腸菌は高温感受性を示した。その抑圧変異は、ゲノム DNA の超らせん構造を緩める I 型トポイソメラーゼと RNA ポリメラーゼに生じた。このことは、HU が、温度で変化する超らせん構造の維持と、その際の転写制御に関与することを示している。さらに、高解像度 ChIP-seq を行い、HU と IHF のゲノム上の結合領域を決定したところ、IHF は、塩基配列特異的に、1000 か所以上の結合領域に結合する一方、HU は、遺伝子コード領域に結合していた。さらに興味深いことに、HU は、別の DNA 結合タンパク質である H-NS によって遺伝子発現が強く抑制されているゲノム領域には結合していなかった。このことは、ヒストン同様、HU が転写活性化領域に広く結合してゲノム DNA の超らせん構造を制御し、ゲノムの活性を制御していることを強く示唆している。

グラム陽性菌に見いだされた新規電子受容体と超低栄養生育との関連性

吉田 信行（静岡大学大学院総合科学技術研究科）

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素・窒素・硫黄源およびエネルギー源無添加の無機塩固体培地（BM 培地）上で良好に生育する。本菌の炭素代謝については不明な点が多いが、栄養が乏しい条件下で生育するための独特なシステムを持っていると予想している。トランスクリプトーム解析により、低栄養条件で際立って発現する遺伝子として *N,N'*-ジメチル-4-ニトロソアニリンを人工電子受容体とするメタノール脱水素酵素（NDMA-MDH）をコードする *mnoA* と、NAD 依存性のアルデヒド脱水素酵素をコードする *aldA* を同定している。最近、グラム陽性菌である *Mycobacterium* 属細菌の NDMA-MDH の電子受容体がマイコファクトシン（MFT）であることが示唆されている。興味深いことに、本菌のゲノムにおいて MFT の生合成系遺伝子群は *aldA* と *mnoA* 間にすべて存在しており、低栄養条件で高発現していた。MFT 前駆体ペプチドをコードする *mftA* と、MFT への関与が予想されている糖転移酵素をコードする *mftF* の欠損株を作製し、その生育を検討したところ、どちらの欠損株も BM 培地での生育が著しく低下したため、MFT およびその糖鎖は本菌の低栄養生育に必須であることが明らかとなった。

一細胞力学操作を用いた病原性細菌の細胞侵入における定量的解析： 細菌感染を支配する力学的メカニズムの解明

久保田 寛顕（東京都健康安全研究センター微生物部）

サルモネラが上皮細胞に侵入する過程では鞭毛運動、細胞表面への接着、エフェクターの注入、アクチン細胞骨格の再編成による Membrane Ruffling の形成など物理的に多様な現象が連続的に生じる。本研究ではこうした現象に伴う力学的な背景を調べるため、顕微鏡下で直径 $1\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズに *Salmonella Typhimurium* SL1344 株を一個体結合し、光ピンセットを用いて操作することにより MDCK 細胞に接触させた。結果、100 個体程度の試行では、侵入に伴う Ruffling の形成は観察されなかった。一方、捕捉していない個体により自発的に形成した Ruffling 内に菌を接触させた場合は容易に接着し、Ruffling が閉じるに従いビーズごと細胞内へ取り込まれることが分かった。これらの結果は、単一の菌によって構成される培養液の中ではⅢ型分泌系の発現量に差のある個体が混在し、侵入に十分な発現量を持つ個体の割合が一個一個捕捉していく中では引き当てられない程度に小さいことと、一度 Ruffling が形成された場合は個体差によらず二個体目以降の侵入が達成される協同性を示唆している。

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* における CoA 生合成経路の制御機構の解明と CoA 製造への応用

本田 孝祐 (大阪大学生物工学国際交流センター)

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* の CoA 生合成酵素のひとつであるパントテン酸キナーゼ (PanK) は、type III 型 PanK に分類され、一般的な細菌に見られる type I 型の酵素とは異なり、CoA によるフィードバック阻害を被らない。この事実に基づき、本研究では、*T. thermophilus* 由来の PanK、pantetheine-phosphate adenylyltransferase (PPAT)、dephospho-CoA kinase (DPCK) を *in vitro* で組み合わせたカスケード反応系を構築し、これを用いた CoA 生産試験に取り組んだ。各酵素遺伝子を大腸菌内で発現させ、その無細胞抽出液を熱処理に供することで、組換え酵素を粗精製した。得られた 3 つの酵素を混合し、2.0 mM の pantetheine を基質とした CoA 生産試験に供したところ、モル収率 47% で目的生産物である CoA を得ることができた。ここで十分な収率が得られなかった原因として、PanK 以外の 2 つの酵素 (PPAT および DPCK) が CoA に感受性を示すとの仮説を立て、その検証に取り組んだ。この結果、1.0 mM CoA の存在下で PPAT の活性が、CoA 非存在下の 20% 弱にまで低減することを見出した。以上の結果より、*T. thermophilus* では、PPAT に対するフィードバック阻害により CoA の生合成が制御されていること、また今後、CoA による阻害を被らない耐熱性 PPAT を利用することで、より高濃度、高収率での CoA 生産が可能なカスケード反応が構築できる可能性が示された。

植物免疫を活性化する微生物の新規評価法の確立と探索への応用

古屋 俊樹 (東京理科大学理工学部)

植物の免疫システムを活性化する微生物は、微生物農薬としての利用に期待が寄せられている。しかしながら、微生物の植物免疫活性化能を評価する簡便な手法がなく、当該微生物のスクリーニングに多くの時間と労力を要しているのが現状である。そこで本研究では、微生物と植物培養細胞の相互作用に着目した植物免疫活性化能の評価手法を考案した。具体的には、微生物を植物培養細胞と試験管内で接触させ、植物培養細胞の免疫応答の指標として活性酸素種 (ROS) 生成を計測することにより、微生物の植物免疫活性化能を評価する手法を開発した。この手法を利用すると、微生物が植物の免疫を活性化するポテンシャルを有するかどうかを、わずか数時間で判定することができる。さらに、コマツナの内部から約 30 株の細菌を分離し、開発した評価手法に供した。その結果、一部の細菌は植物培養細胞の ROS 生成を亢進し、植物免疫を活性化できることがわかった。さらに、実際にこれらの細菌を植物に接種することにより、植物に耐病性を付与できることを明らかにした。

バイオ医薬品の次世代製造宿主を指向した 光発現誘導システム導入ブレビバチルス菌の創製

浅野 竜太郎 (東京農工大学大学院工学研究院)

大腸菌に比べ、グラム陽性菌であるブレビバチルス菌は、タンパク質分泌能の高さに加えて、菌体外プロテアーゼ活性が低いことなどから次世代微生物宿主として期待されている。大腸菌発現に於いて問題となるエンドトキシンの除去工程も必要ないため、治療薬を指向した分子の製造コストの低減も見込まれる。しかしながら、ブレビバチルス菌を用いた実用的な発現誘導システムは未確立であるため、宿主に成長阻害をもたらすような目的タンパク質の場合、形質転換体すら得られない。

そこで本研究では、ブレビバチルス菌に対して、化合物の添加を必要としない非侵襲的な発現誘導法である光発現誘導システムの導入を目指した。具体的には、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する、緑色光で転写促進し赤色光で抑制する CcaS/CcaR システムのブレビバチルス菌への導入を検討した。CcaS の補因子であるフィコシアノビルリン (PCB) の生合成に関与する遺伝子群も含めて導入したところ、モデルタンパク質として用いた緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現を確認することができた。現在、さらに詳細な解析を続けている。

長期間持続可能なインジゴ還元発酵液の新規調整方法の開発

湯本 勳 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

インジゴ還元発酵液はその原料であるスクモ (蓼藍 [*Polygonum tinctorium* L.] の葉をコンポスト化したもの) 由来の微生物を起源とした複合微生物系によって行われている。インジゴ還元のために必要な微生物叢の形成は使用するスクモの質と発酵液の仕込みの方法による最初の発酵条件の調整に依存する。仕込みから短期間 (1 ~ 5 日程度) でインジゴの還元を行うためにはノウハウを必要とし、場合によっては仕込みからインジゴ還元の発生までに 2 週間以上を要することもある。本研究では、仕込みからインジゴ還元までの期間短縮に対するインド藍 (*Indigofera tinctoria* L.) の粉末 (LP) の効果を検討した。その結果、本研究では、仕込みからインジゴ還元開始までに比較的より長い時間がかかるスクモを用いたが、LP を添加した発酵液は微生物叢の変遷の速度が促進されることにより、仕込みからインジゴ還元の発生までの期間が縮小されることが明らかになった。この効果は LP に含まれる発酵液系内の脱酸素に貢献する成分の機能により微生物叢がインジゴ還元の起こり易い方向により速く遷移したことによるものと推察された。

病原性細菌の毒素産生を阻害するプロバイオティクスの探索ならびにその作用機構の解明

野田 正文 (広島大学大学院医系科学研究科)

細菌が増殖する際、自身の細胞密度を感知して、細胞数が閾値を超えると特定物質（毒素等）の生産にスイッチを入れるシステムを quorum sensing (QS) と呼ぶ。私たちは、優れた保健機能性を示すプロバイオティクス探索研究の一環として、この QS 阻害物質を産生する乳酸菌の分離・同定を試みた。当研究室にける先行研究として、QS に関わる auto-inducer-3 (AI-3) に着目し、大腸菌の宿主・ベクター系を用いた QS 阻害物質のスクリーニング系を開発している。本研究では、これを利用して QS 阻害物質を産生する乳酸菌株を探索した。

研究室保存株ならびに新規に分離・同定した計 649 株を対象としたスクリーニングの結果、QS 阻害候補株として 28 株が得られた。それらにおける、2 種の菌周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 及び *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) に対するバイオフィルム形成阻害能を調査したところ、*Leuconostoc pseudomesenteroides* 及び *Enterococcus faecalis* と同定された No.403 株及び No.372 株の培養液抽出画分に、それぞれ阻害活性が観察された。加えてその時、Pg 及び Aa でそれぞれ毒素産生に関与する、*vimA* 及び *cdtB* 各遺伝子の発現低下が認められた。

酵母 FLO assay を基盤とした真菌二次代謝産物からのエピジェネティック機能探索

杉山 圭一 (国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部)

エピジェネティック作用のかく乱は発がんを誘発する。一方、酵母凝集反応を指標に開発されたエピジェネティック変異原検出系「FLO assay」により発がん性が懸念されるかび毒からエピジェネティック作用が報告されている。本研究では、FLO assay を用い、真菌二次代謝産物からエピジェネティック作用を示す化学物質の探索を試みた。まずはアッセイ系の妥当性検証を目的に、発がん性が懸念されているかび毒フモニシン B1 のエピジェネティック作用について予備的な検討を行なった。また、培養方法についても検討を加え、アッセイ方法の簡便化を図った。そのうえで、真菌の二次代謝産物について FLO assay に供試し、エピジェネティック作用のスクリーニングを行なった。その結果、FLO assay によりかび毒フモニシン B1 がエピジェネティック作用を示す可能性を認めた。また、真菌二次代謝産物を静置培養にて FLO assay に供試した結果、エピジェネティック作用を示す代謝産物が存在する可能性も見出した。

発酵食品中の微生物間相互作用を仲介する酵母プリオン様因子 [GAR⁺] の作用機序に関する研究

渡辺 大輔 (京都大学大学院農学研究科、現 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

伝統的発酵食品の製造において、酵母と乳酸菌の共存が広く認められており、その際、酵母が推定上のプリオン [GAR⁺] の働きを介して炭素代謝プロファイルを変化させることが明らかにされている。その結果、毒性の高いエタノールの産生が抑えられ、酵母と乳酸菌の相利共生に貢献する。本研究では、[GAR⁺] の実体を解明するためのトランスクリプトーム解析を実施し、[GAR⁺] により酵母のグルコース応答に欠損が生じることを新たに見出した。このことから、グルコースシグナル伝達の鍵を握る転写コリプレッサー複合体 Cyc8p-Tup1p 複合体の関与が示唆された。Cyc8p および Tup1p はいずれもプリオンの形成に必須な QN-リッチドメインを有することから、乳酸菌との共存によりこれらの酵母タンパク質がプリオンを形成し本来の転写調節機能を欠損するというモデルが考えられた。Cyc8p または Tup1p の機能欠損によりアルコール発酵力が低下したことから、[GAR⁺] との関連が支持された。本研究成果は、我々の生活に深く根付いた発酵食品内の微生物間相互作用の分子メカニズムを解明するための重要な手掛かりになると期待される。

柑橘類の優れた芳香族化合物生産能を利用した酵母による trans- ケイ皮酸の発酵生産

大橋 貴生 (摂南大学理工学科)

trans- ケイ皮酸は最も高耐熱なバイオプラスチックであるポリイミドモノマーの前駆体として非常に有用であり、微生物を用いたバイオプロセスによる生産技術の開発が強く望まれている。赤色担子菌酵母 *Rhodospiridium toruloides* は、乾燥菌体重量辺り 70% 近くの中性脂肪を貯める油性酵母として知られている。本研究では、この本菌が持つ極めて高い脂溶性化合物生産ポテンシャルを利用して、原核微生物で見られた問題点を解決し、脂溶性の芳香族化合物の一種である *trans*- ケイ皮酸を発酵生産することを目的とした。柑橘類はフェニルアラニンから *trans*- ケイ皮酸を経て、フラボノイドを生合成し細胞内に多量に蓄積することが知られている。そこで、柑橘類由来 *trans*- ケイ皮酸合成酵素 (PAL) は高活性であることを期待して、柑橘由来 PAL を *R. toruloides* に異種発現させ、*trans*- ケイ皮酸を発酵生産できるかどうかを調査した。その結果、PAL 遺伝子過剰発現株において *trans*- ケイ皮酸の生産に成功した。現在、培地成分の最適化等を行い、さらなる生産向上に取り組んでいる。

Nrf2/SKN-1 制御系を活性化する乳酸菌体成分の探索と長寿機構の解明

小村 智美 (奈良女子大学大学院生活環境科学系、現 兵庫県立大学環境人間学部)

我が国は長寿大国であるものの、認知症など老化に関する課題も多い。そこで乳酸菌など食品微生物を介して老化や加齢性疾患を制御できる可能性に着目している。動物実験を行う場合、一般的にマウスやラットを用いるものの長期の実験期間を要し、動物愛護の観点から代替法を考慮した実験が望まれる。そこで本研究はモデル生物の一種 *C. elegans* (線虫) を用いて、乳酸菌投与が線虫に及ぼす影響を調べた。その結果、乳酸菌を線虫に与えると、線虫の寿命が延長すること、加齢に伴う運動機能低下や化学走性低下を抑制し抗老化作用を有すること、これらがストレス応答性転写因子 SKN-1 (哺乳類では Nrf2 に対応する) を介してもたらされていることを見出した。また乳酸菌が産生する菌体外多糖を抽出し、線虫に経口投与すると寿命延長傾向を示した。さらにマウス細胞に乳酸菌または菌体外多糖を処理すると、Nrf2 標的遺伝子 HO-1 の発現が上昇した。以上のことから乳酸菌および菌体外多糖は、宿主の Nrf2 を活性化し長寿や抗老化作用に関わることが示唆される。

進化解析に基づく高機能 PET 加水分解酵素の創出

吉田 昭介 (奈良先端科学技術大学院大学研究推進機構研究推進部門/先端科学技術研究科)

ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解細菌 *Ideonella sakaiensis* の生産する PET 加水分解酵素 (PETase) は、既知の PET 加水分解活性を示す耐熱性酵素と比べ、高い分解活性と分解特異性を示す。本研究では、これら耐熱性酵素の安定骨格に PETase が持つユニークなアミノ酸を導入することで、高活性と高安定性を併せ持つ酵素の創出を試みた。PETase 活性部位周辺の 4 つのアミノ酸残基を、PET 加水分解能を有する耐熱性クチナーゼ LCC の相当部位に、単独あるいは複数を置換導入し、変異体の PET 加水分解活性と特異性、耐熱性を調べた。その結果、F243S 変異体では、PET 加水分解活性が 3.5 倍、PET 基質特異性が 4.1 倍増加した。4 残基すべてを置換した変異体は、PET 加水分解活性は半減したが、PET 特異性は 62 倍に増加した。一方、いずれの変異体もわずかな耐熱性の低下が認められた。以上の結果から、PETase 由来アミノ酸の置換導入は、耐熱性酵素の高安定性を維持しつつ、PET 分解活性と分解特異性の向上に寄与することが示された。

乳酸菌が産生する菌体外多糖の免疫増強活性に寄与する酵素の構造基盤の解明

松崎 千秋（石川県立大学生物資源工学研究所）

乳酸菌の産生する菌体外多糖には、粘膜免疫を増強する効果が知られているが、多糖のどのような構造成分が活性に寄与しているのかは明らかではなく、応用利用するための大きな障害となっている。我々はこれまでに、乳酸菌の持つ糖質加水分解酵素ファミリー 70 (GH70) に属する酵素グルコシルトランスフェラーゼによって合成されたグルコース鎖が、粘膜を病原体から保護する役割をもつ免疫イムノグロブリン A (IgA) の産生を誘導することを明らかにしている。そこで本研究では、グルコース鎖のどのような構造成分が IgA の誘導に寄与しているのか明らかにすることを目的とした。様々な乳酸菌由来のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を取得し、合成される多糖の構造と IgA 産生誘導活性とを比較することによって、活性に最も寄与しているグルコース鎖の構造成分を明らかにした。さらに酵素合成した構造成分において、マウス生体の粘膜免疫増強活性を確認した。

共生微生物によるダイズ黒根腐病防除機構の解明

岡崎 伸（東京農工大学大学院農学研究院）

ダイズ黒根腐病は我が国の大豆栽培において最も深刻な病害の一つである。発病した場合、ダイズの生育が抑制され、生育途上で枯死し、大豆収量が大きく低下する。これまでのところ、本病害に利用できる農薬はなく、有効な対策も存在しない。本研究では、ダイズ黒根腐病菌の増殖を抑える *Bacillus pumilus* TUAT1 株に着目し、(1) TUAT1 によるダイズ黒根腐病抑制能力の評価、(2) ダイズ栽培時における病害抑制効果、および (3) TUAT1 株が生産する黒根腐病菌増殖抑制物質の解析を行った。その結果、TUAT1 株は日本各地から分離された異なる黒根腐病菌の増殖を抑制すること、ポット試験でのダイズ黒根腐病害を抑制できること、および黒根腐病菌増殖抑制物質候補を複数同定することができた。本研究により TUAT1 株をダイズ黒根腐病防除に応用するための科学的根拠と有用効果を提示することができた。今後、TUAT1 株接種法をさらに改良することで、ダイズ栽培時における黒根腐病抑制効果を高め、TUAT1 株を利用した低農薬・低化学肥料型大豆栽培へ貢献し、安全で美味しい大豆生産につながることを期待される。

新コンセプト「電子伝達体キノンの構成改変による代謝調節」の実証

中澤 昌美 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

低い酸化還元電位をもつ「ロドキノン」は限られた生物にのみ存在するが、*rquA* 遺伝子の異種発現により、ユビキノンを一段階で合成できることが近年明らかとなった。本研究では、ロドキノン合成能の付与により細胞内の電子授受を変化させ、反応の速度や向きを改変する、新たな方法論の開拓を目指した。

検証には、大腸菌 (原核生物)、出芽酵母・分裂酵母 (真核生物)、*Cyanidioschyzon merolae* (シズン・真核光合成生物) を用いた。酵母ミトコンドリアにユーグレナ由来 *rquA* 遺伝子を発現させたところ、ロドキノン合成量はユビキノンの 5% 以下と非常に低く、代謝への影響の測定は困難であった。一方、大腸菌およびシズンにおいては、ロドキノン量がユビキノンの 80% を越える株の取得に成功した。得られたロドキノン合成株が、嫌気条件下で培地中に分泌するコハク酸量を比較したところ、両生物でコントロール株に比べ 2 倍以上のコハク酸分泌を示した。これらの結果から、ロドキノン合成能の付与は、嫌気下で生じる余剰還元力を還元的代謝に供給する際に効果を発揮し、還元反応が律速であるコハク酸生産が促進されたと結論した。

リグニンの主要結合を開裂する微生物の探索と リグニンからのポリマー原料生産への応用

上村 直史 (長岡技術科学大学物質生物工学系)

リグニンの単位間結合の約 50% は β -O-4 結合である。 β -O-4 結合の開裂酵素は、リグニン由来化合物分解菌の *Sphingobium* sp. SYK-6 株を含む α -proteobacteria にしかほとんど例がなく、いずれもグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) である。本研究では新規または高活性の β -O-4 結合開裂酵素の発見を狙い、 β -O-4 結合開裂細菌の探索と解析を行った。はじめに、ハイスループットなスクリーニングのため β -O-4 型蛍光基質の GOU を合成した。環境試料から単離した 918 株のバニリン酸 / シリンガ酸資化細菌から、GOU を基質としたスクリーニング等により β -proteobacteria の *Delftia* sp. NB13-2 株を含む β -O-4 結合開裂細菌を 10 株単離した。 β -O-4 結合開裂能を有する *Delftia* 属細菌の発見は本研究が初めてであり、ゲノム解析から NB13-2 株は既知と同タイプの β -O-4 結合開裂 GST 遺伝子を持たないことが判明した。現在、 β -O-4 結合開裂酵素遺伝子の同定と NB13-2 株を宿主としたポリマー原料生産菌株の作出を進めている。

単一の細胞が精巧で微小な構造物を構築する原理の解明

野村 真未 (京都大学人間環境学研究科、現 山形大学理学部)

単細胞生物の有殻アメーバは実に精巧な母細胞と同型の被殻を細胞外の鋳型のない空間に構築することが知られており、その構築様式の解析は有殻アメーバによる構築行動の原理を理解するのに重要な要素である。しかし、現在有殻アメーバの利用可能な培養株は世界中でたった6株しか存在せず、被殻構築様式の研究は進んでいない。そこで、本研究では有殻アメーバの培養株を確立し、その被殻構築様式を解析することで、被殻構築の基本原理を明らかにすることを目的とした。各地で採集を行い、新たに4株の培養株を確立することに成功した。有殻アメーバのなかで分子情報が豊富な独立栄養性の *Paulinella* と同属の *Paulinella indentata* の真核生物が混入していない培養株確立に成功した。本株は増殖が非常に遅く、同調培養ができないため、有殻アメーバにおける単細胞 RNA-seq の方法を検討した。SMART-seq2 法を改良し、qPCR で増幅が確認できた細胞についてシーケンスを行った結果、3 サンプルのうち2 サンプルで良好にシーケンスを行うことができた。今後、独立栄養性 *Paulinella* との発現比較を行っていく予定だ。

若手研究者助成報告 … P-40

彩雪をもたらす氷雪性緑藻の種の全世界的な解明： 培養株の多面的解析と野外サンプルとの比較分子解析

松崎 令 (筑波大学生命環境系)

極域および山岳地域の雪原や氷河が緑色や赤色などに染まる「彩雪」現象は、氷雪性緑藻が雪氷中でブルームを形成することで引き起こされる。近年の彩雪試料のアンプリコン解析は多様な氷雪性緑藻の存在を示唆しているが、その実体はほとんど分かっていない。本研究は氷雪性緑藻の種多様性と系統を全世界的に解明することを目的とし、新規培養株と世界各地の株保存施設が保有する培養株、並びに野外試料中の接合子を用いて、演者が近年確立した形態と分子情報を結合した種レベルの分類学的同定手法を実施した。

主要な氷雪性緑藻であるクロロモナス属の培養株を日本の彩雪試料から約60株確立し、海外の株保存施設から購入した北米、北極域、および南極産の未同定株約10株とともに分子系統解析を行った。その結果、未記載種と考えられる13の新規系統が明らかとなった。また、氷雪性クロロモナス属の有性生殖および接合子形成の誘導は1種でしか成功していなかったが、手法の改良と新規培養株の利用により、新たに3種で誘導に成功した。分子同定した野外試料中の接合子と比較した結果、培養株由来の接合子の形態は、天然で形成されたものと同様であることが示唆された。

少数細菌の検出を可能とする深層化 16S メタゲノム解析法の開発

後藤 愛那 (京都大学大学院生命科学研究科)

地球上の多種多様の細菌は、「細菌叢」という複雑な一群を成し、自然環境や共生生物などにとって重要な影響を及ぼす。これら細菌叢解析には、細菌ゲノム中の 16S rDNA 配列を PCR 増幅し、次世代シーケンサー (NGS) で解析する 16S メタゲノム解析が一般に用いられている。しかしながら、腸内や土壌には $10^{13}/\text{g}$ を超える細菌が存在するため、現行 NGS の解析可能最大リード数 (10^{10} リード程度) では、存在比が低い希少種までを十分に把握することは困難である。しかしながら、希少菌種が菌叢形成全体に影響を及ぼす事例が複数報告されていることから、本研究では希少種に焦点を絞った 16S メタゲノム解析、すなわち希少種由来のアンプリコンの検出頻度を上昇させる新たな手法の開発を試みた。

乳児の腸内細菌叢をモデルとし、乳児腸内で優勢となる *Bifidobacterium* 属細菌の 16S rDNA 特異的な配列を持つ、ビオチン付加阻害プライマーを添加し 1st PCR を行った。アビジンで *Bifidobacterium* 属由来アンプリコンのみを除いた後、2nd PCR を行った。NGS 解析の結果、従来法では検出されなかった細菌種が検出され、本手法の有効性が確認された。この方法を、メジャー菌を中心に検出する従来の方法と合わせることで、真の網羅解析に近づけることができる。

グラム陰性菌外膜タンパク質アセンブリー機構の解析

塩田 拓也 (宮崎大学テニュアトラック推進室・JST創発)

大腸菌などのグラム陰性菌は、抗菌薬などに対する高いバリア機能を有する外膜を持つ。外膜の 50% を占める重要な要素として β バレル型の膜貫通領域を持つ外膜タンパク質 (Outer Membrane Proteins: OMPs) が存在する。OMPs が機能するための正しい立体構造形成を伴った膜組込 (アセンブリー) は BAM 複合体によって行われる。多くの OMPs は、最も C 末端側の β ストランドに β シグナルと呼ばれる特徴的な配列を有し、これがアセンブリーに重要であることが示されている。しかしながら、C 末端側の β ストランド以外の大部分の領域が、どのように BAM 複合体と相互作用しアセンブリーされているかについてはほとんど明らかにされていない。

本研究では、我々が近年開発した再構築実験系、EMM アセンブリーアッセイにより C 末端側から 5 本目の β ストランドに BAM 複合体と親和性の高い領域が存在することを見出した。この領域は、BAM 複合体の必須サブユニット BamD によって認識され、それが素早いアセンブリーの実現、さらには外膜のバリア能維持に重要であることを明らかにした。また、この C 末端側から 5 本目に存在するシグナルは、真核生物の OMPs にも広く保存されていた。

原核微生物が持つエピジェネティクスの理解に向けた 海洋細菌群集の DNA メチル化修飾の系統網羅的解析

平岡 聡史（海洋研究開発機構海洋機能利用部門）

DNA に様々な化学修飾が後天的に施される仕組みはエピゲノムと呼ばれ、制限修飾系や遺伝子転写制御など多様な機能に関わる例が、一部の単離株を用いた研究から知られている。しかし、環境中に優占する未培養の原核生物・ウイルス系統が持つエピゲノムは、殆ど検証されていない。本研究では、我々が確立した非培養的な手法「メタエピゲノム解析」を用いて、海洋微生物叢が持つエピゲノムを大規模に解析した。太平洋からの採水試料を用いて、PacBio Sequel 等によるショットガンシーケンスを実施し、約 400 の原核生物とウイルスのゲノムを取得した。そして、このゲノム上から DNA 化学修飾を検出し、新規のものを含む 220 の多様な修飾モチーフを推定した。また、新規モチーフを特異的に認識する 5 つの新規酵素を見出し、大腸菌組み換え実験から活性を確認した。さらに、Alphaproteobacteria で高度に保存されていた修飾酵素について、in vivo/in vitro での酵素機能の検証や進化学的解析を行った。本研究により、海洋微生物叢が持つ多様なエピゲノムの存在が明らかになり、それらが生態や進化に影響することが示唆された。

病原性染色体による宿主特異性の決定・分化機構の解明

鮎川 侑（理化学研究所環境資源科学研究センター）

土壌病原菌 *Fusarium oxysporum* は、100 種以上の植物に対して病原性を示すが、菌株によって宿主植物が異なり、それぞれの宿主に応じて分化型に区別される。いくつかの分化型から、生存に必須でないが病原性に必要な染色体（病原性染色体）が特定されており、病原性染色体が宿主決定に関与すると考えられている。しかしながら、病原性染色体に座上する宿主決定遺伝子は特定されていない。

本研究では、シロイヌナズナに病原性を示す分化型の宿主決定遺伝子の特定を試みた。薬剤処理による染色体異常誘導によって、本分化型から病原性染色体を同定した。病原性染色体喪失株ではシロイヌナズナ野生株に対する病原性が低下したが、トリプトファン由来の抗菌物質合成変異株 *cyp79b2/b3* 二重変異株に対しては高い病原性を示した。シロイヌナズナ感染時のトランスクリプトーム解析を通して、病原性染色体に座上するエフェクター *SIX8* および *PSE1* を同定した。トリプトファン由来の抗菌物質はアブラナ科植物に特有であることから、本分化型の宿主決定には、*SIX8* および *PSE1* による抗菌物質を介した宿主免疫の抑圧を要することが示唆された。

大腸菌の外膜品質管理に関わる 2 機能性タンパク質 BepA の 基質認識・選別機構の解明

宮崎 亮次 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所、現 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

グラム陰性細菌の外膜は、抗生物質や薬剤等に対する透過障壁として細胞の生存に重要な役割を持つ。大腸菌 BepA は、外膜機能維持に関わる 2 機能性のプロテアーゼであり、外膜へのリポ多糖輸送に関わる外膜タンパク質 LptD の品質管理に働く。BepA は外膜タンパク質の膜組み込み装置 BAM 複合体近傍で、成熟途上の LptD と相互作用し、通常時は LptD 成熟化を促進するが、その一方、異常な LptD 分子は分解・除去する。しかしながら、BepA が正常な LptD と異常な LptD のそれぞれを如何にして認識し、選別するのかが明らかではない。

本研究では、LptD 成熟化中間体と BepA 及び BAM 複合体との相互作用について系統的な架橋解析により調べた。その結果、BepA のプロテアーゼ活性部位近傍にある edge-strand 領域が LptD β バレルドメインの N 末端側領域と結合すること、この edge-strand での結合が BepA による LptD の分解と成熟促進のいずれにも重要であることを見出した。さらに、LptD 中間体は BepA と同時に BAM 複合体中の BamA ゲート領域とも相互作用していることも明らかにした。以上の結果から、BepA は BAM 複合体によって外膜に組み込まれる途上の LptD 中間体と相互作用し、異なる経路への選別を行うと考えられる。

DPANN 群に属する新奇アーキアの共生機構の解明

酒井 博之 (創価大学理工学部)

DPANN 群は、極めて多様な環境に生息する寄生性アーキアとして、微生物生態学分野において最も注目されている生物群のひとつである。しかし、培養成功例が数例しかなく、本群の生理生態はほとんど未知である。報告者は、本群に属する新奇アーキア (ARM-1 株) を、酸性温泉から、単一の宿主 (*Metallosphaera* sp. AS-7 株) と共に培養することに成功した。本研究では、ARM-1 株が有する独自の共生機構を理解することを目指して、培養に基づく増殖特性の解析、蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡観察およびゲノム解析を実施した。その結果、「宿主が活発に増殖していること」が ARM-1 株の増殖に重要な要素であることが強く示唆された。本株は 0.8 Mb の小さなゲノムを持ち、中央代謝に関連する多くの遺伝子を持たないことがわかり、宿主との共培養下でしか増殖しない培養性状とよく一致した。一方、完全な TCA 回路が確認され、その一部は宿主が属する *Sulfolobales* 目アーキアからの遺伝子水平伝搬によって獲得されたことが示唆された。本発表では、得られた結果から推定された ARM-1 株独自の共生機構について議論する。

要旨(寄付講座助成・中間発表)

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 (筑波大学生命環境系糸状菌相互応答学寄付講座)

[背景・目的]

糸状菌は地球上のあらゆる環境に生息し、物質循環に寄与する重要な菌群である。環境中では多様な生物と相互作用することから、個々の振る舞いに加えて、生物間相互作用の詳細かつ俯瞰的な理解が、糸状菌の真の生態を理解する上で重要となる。近年、菌類に持続的に感染するウイルスの存在が注目され始め、糸状菌をめぐる内なる相互作用として我々も着目している。一般的に菌類ウイルスは宿主を殺さず持続的に感染し、不顕性で宿主に影響を及ぼさない。しかし、宿主の二次代謝生産や薬剤感受性を変える感染例も見つかってきており、菌類ウイルス（マイコウイルス）の生態や機能の包括的な解析を実施する。

[方法]

菌類からのウイルス探索は限られた菌種や菌数での報告があるのみで、本研究では前例のない規模で探索を実施し、マイコヴァイロームを明らかにする。同一菌種において複数の感染株を対象にウイルスを除去し、ウイルスの有無による宿主の生育や二次代謝、薬剤耐性等への影響を比較解析する。

[結果・考察]

これまでに複数の菌株保存機関と共同研究先から糸状菌株を取り寄せ、土壌から分離した株も含めて、子囊菌、担子菌、接合菌に跨る 1000 株以上を対象にウイルスを探索し、170 株以上の感染株を見出している。特に、*Aspergillus* 属では 23 種 600 株から 99 株、*Penicillium* 属は 12 種 104 株から 29 株でウイルス感染が認められた。約半分のウイルスはゲノム解読を完了しており、この中には RNA ウイルスが共通に保持する RNA 複製酵素 (RdRP) が 2 つの ORF に分割してコードされるという、これまでのウイルス学の常識を覆す配列が見つかった。

また一部の菌種 (*A. fumigatus*, *A. flavus*) では、抗ウイルス剤を用いてウイルス除去株を作製し、ウイルスの影響を体系的に解析した。その結果、ウイルスは宿主菌の生育や形態に大きく影響を与えないという傾向が見えてきた。一方で、二次代謝や薬剤感受性への影響が観察されたことから、糸状菌の潜在的な生理的特性に寄与し得ると考えられる。

菌類ウイルスは細胞内に潜む共生因子とみなされるが、我々の大規模解析により生態・機能の一端が明らかになってきた。菌学研究においてウイルスの存在は見見過されてきた背景から、菌類の進化や機能拡張などに関する、全く新しい知見をもたらす可能性があると考え、さらなる解析を進めていく。

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附属アグロバイオテクノロジー研究センター微生物膜輸送工学寄付講座)

[背景・目的]

発酵生産における細胞内で合成された目的化合物の排出、恒常性維持、エネルギー生産など重要な役割を担う膜輸送タンパク質は、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。しかし、脂質分子との相互作用や動的挙動に基づく作動機構や制御機構の理解は充分ではなく、このことは応用の大きな障壁となっている。本研究は、新しい解析技術を活用して膜輸送タンパク質の作動機構や制御機構の理解を深め、応用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解析にはパッチクランプ法をベースに独自に開発した微生物膜輸送タンパク質活性解析システムを用い、膜輸送タンパク質の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ンネル (Msc) をモデルとして膜輸送タンパク質の高機能化を目指している。*E. coli* 由来 L 型 Msc の開口挙動をシミュレーションで解析したところ、高排出型では置換アミノ酸残基近傍の膜貫通ヘリックスで野生型では見られない kink が生じていることを見いだした。この kink 部位のアミノ酸を置換した変異遺伝子をプリン核酸合成を遺伝子工学で強化した *E. coli* で発現させたところ、生産性が従来の高排出型 Msc 保有株と同等以上に向上した。シミュレーションによる動的挙動解析に基づく膜輸送タンパク質の高機能化を達成した。

E. coli の Na^+/H^+ アンチポーター活性が膜脂質の脂肪酸組成によって制御されることを見いだした。独自開発の实在に近い膜モデルを用いたシミュレーションによる解析の結果、膜脂質のシス型不飽和脂肪酸の二重結合部位で屈曲した先の部分がアンチポーターの活性中心近傍と相互作用することによって活性を制御することが示唆された。

チラコイド膜に存在しプロトン駆動力制御に係る電位依存性陰イオン輸送チャンネル VCCN1 は立体構造も膜での配向も未解明である。膜電位等で制御される膜輸送タンパク質の作動機構や制御機構の理解には、立体構造と共に膜での配向を知る必要がある。これまで未確立であったチラコイド膜タンパク質の配向を決定する実験手法を確立し、当該チャンネルのシロイヌナズナのチラコイド膜での配向を決定した。

多様な糸状菌類の固体気質認識ならびに侵襲メカニズム解明を基盤とする 糸状菌・環境インターフェイス工学の創生とその研究教育拠点の形成

吉見 啓 (京都大学大学院農学研究科糸状菌・環境インターフェイス工学講座)

[背景・目的]

糸状菌は分解者として地球規模の物質循環で中心的な役割を果たしており、固体を基質として侵入分解することを特徴とする。したがって、固体基質と菌糸表面において展開される生物反応こそが、糸状菌たる生き方を決定づける基本原理と言える。本寄附講座では、生態的、系統進化的に比較できる特徴的な菌種を用いて、糸状菌の環境・基質認識、基質定着および基質分解メカニズムを、生化学的、界面化学的、分子遺伝学的、比較ゲノム学的研究手法を駆使した多面的アプローチにより包括的に解析する。これにより、糸状菌の基質認識・侵襲メカニズムの多様性と共通性を抽出し、糸状菌の進化生態を総合的に理解する。

[方法]

生態的・系統進化的背景が大きく異なる、子囊菌門に属する麴菌、トウモロコシごま葉枯病菌及び担子菌門に属するヒラタケをモデルに、基質と菌糸の界面で機能する疎水性分子、細胞壁及び分泌性多糖・タンパク質を探索し、それらの機能を遺伝学的、生化学的に解析した。

[結果・考察]

表面疎水性を欠くトウモロコシごま葉枯病菌の変異株 2 株を解析し、そのうち 1 株で、疎水性欠失の原因遺伝子が *NRPS4* (non-ribosomal peptide synthase) であることを明らかにした。またもう一方の変異株でも、*NRPS4* 遺伝子の発現量が減少していた。他の菌種において *NRPS4* ホモログが生産する環状ペプチドが菌糸の表面疎水性に寄与することが報告されている為、本菌においても環状ペプチド生産能の欠落が表面疎水性喪失の原因と考えられる。また本菌の細胞外マトリクス (ECM) 形成不全を示す変異株に関する解析から、2 種の ECM 形成関連伝子を新規に同定した。それらは互いに隣接し、どちらも糖鎖関連酵素をコードしていた。ヒラタケの細胞壁構成多糖の解析では、 α -1,3-グルカン量は子囊菌とは異なり、その合成遺伝子 *ags* の破壊は菌糸の正常な生育や表面構造に影響することが示された。加えて、*Aspergillus* 属 *ags* 破壊株で起こる液体培養時の菌糸分散現象は、ヒラタケでは見られなかった。したがって、子囊菌と担子菌では α -1,3-グルカンが担う役割が異なることが明らかとなった。

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.