

第17回 助成研究報告会

日 時 :2023年6月9日(金)13:00~17:00

場 所 :千里ライフサイエンスセンター



公益財団法人 発酵研究所

プログラム

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)

2021年度 大型研究助成<口頭発表> (13:10 ~ 14:50)

O-1 始原的呼吸経路を繋ぐ一酸化炭素酸化菌コレクションの構築とその応用
基盤

吉田 天士 (京都大学農学研究科)

座長: 太田 寛行 (茨城大学学長)

O-2 タイムラプス・シングルセル発現解析の開発による分裂酵母胞子の休眠と
発芽の分子機構

佐藤 政充 (早稲田大学理工学術院)

座長: 林 哲也 (九州大学大学院医学研究院教授)

O-3 比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の
分子基盤の解明

田淵 光昭 (香川大学農学部)

座長: 林 哲也 (九州大学大学院医学研究院教授)

O-4 遺伝子組換え大腸菌が生産する新規な膜小胞の解析と有用物質分泌生産への
応用

尾島 由紘 (大阪公立大学大学院工学研究科)

座長: 遠藤 銀朗 (東北学院大学名誉教授)

O-5 新規分析法によるセリンラセマーゼ生産菌の網羅的探索とこのラセマーゼに
よる D-セリン高効率生産の研究

金内 誠 (宮城大学 食産業学群)

座長: 遠藤 銀朗 (東北学院大学名誉教授)

2017年度 寄付講座助成<口頭発表> (15:10 ~ 15:40)

O-6 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)

座長: 古川 謙介 (九州大学名誉教授)

2021年度 学会・研究部会助成<口頭発表> (15:40 ~ 16:10)

O-7 日本微生物資源学会

大熊 盛也 (日本微生物資源学会 2019-2022 年度学会長)

座長: 太田 寛行 (茨城大学学長)

O-8 日本生物工学会・未培養微生物資源工学研究部会

青柳 秀紀 (副会長/未培養微生物(微生物ダークマター)資源工学研究部会代表)

座長: 太田 寛行 (茨城大学学長)

一般研究助成(2021、20、19年度)、若手研究者助成(2021年度)、

寄付講座助成(中間報告)

<ポスター発表>

P-1 Gallionellaceae 科微好気性鉄酸化細菌の分離と特性の解明

渡邊 健史 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

P-2 深海底に沈む植物片をニッチとした深海生菌類の多様性

長野 由梨子 (海洋研究開発機構地球環境部門)

**P-3 土壤に特異的に優占する難培養細菌門アシドバクテリアのバイオリソース
拡充**

伊藤 英臣 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

**P-4 各種胆汁酸分子の発芽誘導能を用いた難培養性腸内細菌の分離と日本人腸内
細菌叢カクテルの創製**

中山 二郎 (九州大学大学院農学研究院)

P-5 地衣類チャシブゴケ属の新しい分類体系構築に向けた試み

橋本 陽 (理化学研究所バイオリソース研究センター)

**P-6 土壤微生物が産生する揮発性有機化合物 (VOCs) の網羅的解析による土
壤の微生物性評価法の開発**

池永 誠 (鹿児島大学学術研究院農水産獣医学域農学系)

P-7 ワイン発酵におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用展開

西村 明 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

P-8 病原細菌のインフラマソーム活性化因子の同定と応用

原 英樹 (慶應義塾大学医学部、現 旭川医科大学医学部)

**P-9 幅広い単細胞生物のイオンチャネルの構造と機能から根源的な情報伝達手段
であるイオン透過の成り立ちに迫る**

入江 克雅 (名古屋大学細胞生理学研究センター、現 和歌山県立医科大学薬学部)

- P-10 **真核微生物の細胞表層糖鎖マーカーとしての酸性糖鎖の選別機構と生理的役割の解明**
竹川 薫 (九州大学大学院農学研究院)
- P-11 **スピルリナ強光培養時に確認されたアルカリバチルス of 出現メカニズムの解析**
渡辺 智 (東京農業大学生命科学部)
- P-12 **ビフィズス菌のヒト腸管共生・相互作用因子の構造生物学的解析**
伏信 進矢 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- P-13 **環境メタゲノムから発見した新規な遺伝子発現調節機構の解明と生理学的意義**
末永 光 (産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門)
- P-14 **ストレス検知の場としてのオルガネラ膜：細胞内膜の相分離を利用した細胞成長調整システムの分子基盤**
松浦 彰 (千葉大学大学院理学研究院)
- P-15 **多細胞システムの機械受容シグナル伝達機構に関わる複数イオンの解明**
森本 雄祐 (九州工業大学大学院情報工学研究院)
- P-16 **出芽酵母可視化スクリーニングによる活性化ステロール分布領域制御因子の特定と制御機構の解明**
岸本 拓磨 (北海道大学遺伝子病制御研究所)
- P-17 **グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明**
千葉 志信 (京都産業大学生命科学部)
- P-18 **土壌中での環境適応を標的とした防除技術開発を指向した、青枯病菌のシデロフォア産生機構の解明**
曳地 康史 (高知大学農林海洋科学部)
- P-19 **酵母の細胞質局在型センサーによる新奇高浸透圧感知機構の解明**
舘林 和夫 (東京大学医科学研究所)
- P-20 **ビタミン B₆ の生体内恒常性維持機構の解明**
伊藤 智和 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
- P-21 **トリコセン系かび毒生合成制御の分子機構**
木村 真 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
- P-22 **細菌の宿主定着能獲得や病原性獲得への進化のメカニズムの解明**
坂本 啓 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、現 山口大学大学院医学系研究科)
- P-23 **分岐鎖アルコール認識機構とその生理的意義の解明**
黒田 浩一 (京都大学大学院農学研究科、現 京都工芸繊維大学分子化学系)

- P-24 **祖先型硫黄酸化経路の鍵となる未知酵素の同定**
渡邊 友浩（北海道大学低温科学研究所）
- P-25 **ビスフェノール S 分解微生物系の人工構築と生物処理への応用**
武尾 正弘（兵庫県立大学大学院工学研究科）
- P-26 **ATP-grasp リガーゼにより修飾される新規ペプチドの異宿主生産**
小谷 真也（静岡大学大学院農学領域）
- P-27 **プラスチック廃棄物の微生物分解の効率化を目指した生化学・工学的アプローチ**
渡邊 崇人（京都大学生存圏研究所）
- P-28 **大規模ゲノム再編成を用いる休眠型二次代謝産物生産法の開発**
浅井 禎吾（東北大学大学院薬学研究科）
- P-29 **病原微生物の侵襲進化の解明と新規天然物の探索**
荒井 緑（慶應義塾大学理工学部）
- P-30 **ヒト病原性真菌の内在性ストレス応答機構を活用した神経変性疾患治療薬開発のための新規戦略**
小菅 康弘（日本大学薬学部）
- P-31 **細菌性血管新生因子 BafA の社会実装を目指した高活性オルソログ探索ならびに活性部位の特定**
塚本 健太郎（藤田医科大学医学部）
- P-32 **黄麹菌における光遺伝学的手法を用いたメンブレンレスオルガネラ形成による有用物質生産**
樋口 裕次郎（九州大学大学院農学研究院）
- P-33 **嫌気性ベンゼン分解菌の分解力を引き出す：「本当に現場で分解する」菌を目指して**
水口 千穂（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- P-34 **ニトリルゴムのバイオリサイクル法の開発**
杉森 大助（福島大学理工学群共生システム理工学類）
- P-35 **ポリエチレンテレフタレート分解微生物・酵素の探索**
飯塚 怜（東京大学大学院理学系研究科）
- P-36 **水環境中の多様な捕食性細菌による捕食特性の解明とその持続的なウキクサバイオマス高効率生産への応用**
井上 大介（大阪大学大学院工学研究科）

- P-37 ***Aureobasidium pullulans* の細胞壁構造から超高分子 β - グルカンの分泌機構を学ぶ**
東 雅之 (大阪公立大学大学院工学研究科)
- P-38 **α - アミノ酸の二量化による有用芳香族複素環化合物の創製**
梶尾 俊介 (筑波大学生命環境系微生物サステナビリティ研究センター)
- P-39 **腸内細菌が産生する芳香族アミノ酸による腸管病原菌の感染制御**
西山 啓太 (慶應義塾大学医学部、現 東北大学大学院農学研究科)
- P-40 **日本人の腸内に特異な酢酸生成菌の多様性解析および新規分離株の取得**
山田 千早 (東京大学大学院農学生命科学研究科、現 明治大学農学部)
- P-41 **国内における外生菌根性担子菌類 *Tomentella* 属の分類学的研究と分離培養法の確立による菌株拡充**
早乙女 梢 (鳥取大学農学部)
- P-42 **細菌のセカンダリータンパク質分泌モーター SecDF の活性状態の構造の基盤**
塚崎 智也 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域)
- P-43 **出芽酵母におけるリボソーム品質管理の分子機構**
北島 真 (京都大学医生物学研究所)
- P-44 **植物病原細菌が感染植物組織中に形成するバイオフィーム高次構造と植物病原性との相関解析**
別役 重之 (筑波大学生命環境系微生物サステナビリティ研究センター、現 龍谷大学農学部)
- P-45 **氷河微生物の地球規模での地域比較と寒冷適応戦略の解明**
瀬川 高弘 (山梨大学総合分析実験センター)
- P-46 **適応育種的変異を利用した酢酸菌セルロース合成酵素変異体の作成とそのセルロース合成能の解析**
松谷 峰之介 (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター)
- P-47 **医療施設で分離される *P. putida* グループ新菌種の分類とサブグループ形成関連因子の検索**
遠矢 真理 (順天堂大学大学院医学研究科)
- P-48 **同型配偶子生殖を行う単細胞性緑藻クラミドモナスを用いた葉緑体母性遺伝の分子機構の解析**
小林 優介 (茨城大学大学院理工学研究科)
- P-49 **遊離脂肪酸を介した細菌間コミュニケーションによる環境応答機構の解明**
神保 晴彦 (東京大学大学院総合文化研究科)

- P-50 **地衣化菌が共生藻を認識する仕組みに関する研究**
 升本 宙（筑波大学山岳科学センター、現 京都大学大学院地球環境学堂）
- P-51 **盗葉緑体生物群から探る葉緑体獲得進化の共通原理の解明**
 大沼 亮（神戸大学内海域環境教育研究センター）
- P-52 **植物病原細菌の感染プロセスに重要なホスファチジルコリン生合成機構の構造基盤解明**
 渡邊 康紀（山形大学理学部）
- P-53 **マウス腸内細菌におけるゲノム進化速度の解明**
 高安 伶奈（東京大学大学院医学系研究科）
- P- 寄 1 **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 2 **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**
 河内 護之（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）
- P- 寄 3 **全ゲノム塩基配列に基づく酵母の高次分類体系の再構築および発酵・醸造に重要な酵母のタイピングに応用できる高解像度の実用的同定識別システムの確立と応用**
 高島 昌子（東京農業大学総合研究所酵母多様性生物学・分類学研究室）

要旨 (大型研究助成)

始原的呼吸経路を繋ぐ一酸化炭素酸化菌コレクションの構築とその応用基盤

吉田 天士（京都大学農学研究科）

[背景・目的]

一酸化炭素（CO）酸化菌分離技術（CO 集積培養法）を活用して水素生成型 CO 酸化菌（HydCO 菌）の分離探索を推進し、オミックス解析により未知の CO 代謝を総合的に理解することにより、本代謝鍵酵素嫌気型 CO デヒドロゲナーゼ（CODH）を応用した水素生産並びに C1 化学への展開により持続的低炭素社会に向けた脱石油型のエネルギー生産や合成樹脂生産の基盤構築に資する。

[方 法]

様々な環境試料から絶対嫌気条件において 20% または 100% CO 雰囲気下で、幅広い培養条件で独立栄養的に HydCO 菌を集積した。集積培養系から限界希釈法または平板培養法にて HydCO 菌分離株を確立した。分離株の性状解析・全ゲノム解読により CO 代謝経路を解明した。

[結果・考察]

鹿児島県鰻池湖底堆積物を用い、新規 HydCO 菌 G301 株の分離に成功した。G301 株は *Parageobacillus toebii* と 97.1% のゲノム相同性を示し、同種であると判断された。さらに、本菌は好気型 CODH 遺伝子を保有し、ゲノムが解読された全微生物において、嫌気型・好気型両方の CODH を有する唯一の分離株であった。生理学的解析と比較ゲノム解析により嫌気型 CODH はプロトン還元と、好気型 CODH は好気条件下および嫌気条件下でのそれぞれ O₂ 還元と硝酸塩還元と共役させ CO 酸化を行った。また、琵琶湖湖底試料より H₂ 生成型 CO 酸化能を有する 3 種計 55 株の分離株を得た。28 株は既報の HydCO 菌 *Parageobacillus thermoglucosidasius* であった。25 株は CO 酸化能が未報告の *Thermolongibacillus altinsuensis* と同定され、ゲノム解析により本分離株のみが嫌気型 CODH を保有した。残る 2 株は新種 HydCO 菌として現在も解析を継続中である。集積培養のメタゲノム解析により新規 HydCO 菌種および CO 菌のゲノム再構築に成功している。

さらに大規模データベースを用いた解析探索により、嫌気型 CODH の多くの系統が水生環境・人為環境に多く分布し、一部系統がヒト腸内等の共生環境に偏在した。実際、30,000 個のヒト腸内原核生物ゲノムのうち 1,302 ゲノムに CODH を検出した。それらは、CODH を用いて CO を同化していると予測された。

タイムラプス・シングルセル発現解析の開発による分裂酵母胞子の休眠と発芽の分子機構

佐藤 政充 (早稲田大学理工学術院)

[背景・目的]

生物を構成する細胞は、それを取り巻く周囲の環境に応答して、自己の増殖と休眠を適切に選択することで長期の生存を維持している。しかしながら、休眠と休眠からの打破(目覚め)の分子機構は不明な点が多い。私どもは分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の胞子とその発芽を休眠・目覚めのモデル系ととらえて、胞子が発芽する際の分子メカニズムを追究しようと考えた。本研究では細胞内に存在する RNA を NGS により解読する RNA-seq 法によって、休眠から目覚め始めた細胞内でどのような遺伝子が発現しているのかを解析し、これを突破口として、目覚めを引き起こすメカニズムを解明したいと着想した。

[方法]

胞子が発芽するタイミングは個々の細胞で異なるため、目覚めの初期段階を迎えた細胞をバルクで多数(たとえば 10^7 個の細胞)集めて RNA-seq することは難しい。そこで私どもは、胞子1細胞からの RNA-seq 解析のための手法を開発し、さらにインフォマティクス解析と組み合わせることで、胞子が休眠から目覚める際に、時間とともに遺伝子発現がどのように変動するのかを全遺伝子(約 7,000 個の遺伝情報)について解析した。なお、本方法は、早大・理工学術院の竹山春子博士のグループおよび産総研オープン・イノベーション・ラボラトリとの共同研究として開発・実施した。

[結果・考察]

独自に開発したタイムラプス・シングルセル RNA-seq 解析の結果、もっとも発現変動した遺伝子のひとつとして、ヒストン H3 遺伝子が浮かび上がった。このヒストン H3 遺伝子は発芽開始とともに RNA 量が急激に減少し、発芽後期の段階に再上昇することが分かった。ヒストンは DNA に巻き付きヌクレオソーム構造を形成し、その DNA に位置する遺伝子発現を調節する。したがって、目覚めにともなうヒストンの減少は、染色体におけるヌクレオソーム密度を疎にする可能性がある。このようなクロマチンのオープン化が大規模な遺伝子の転写を引き起こし、これが休眠からの目覚めを誘発する可能性が示唆された。

比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の分子基盤の解明

田淵 光昭 (香川大学農学部)

[背景・目的]

オリーブ立枯病は平成 29 年日本国内において初めて香川県で発見された。この病気に感染したオリーブから分離された原因菌はオリーブ立枯病菌と名付けられ、遺伝子解析の結果、ナスやトマトなどの青枯病の原因菌である *Ralstonia pseudosolanacearum* であることが判明した。本研究では、オリーブ立枯病菌に特異的な病原因子を同定し、オリーブへの感染メカニズムの解明を目的とした。

[方 法]

オリーブ立枯病菌特異的な病原因子を探索するため、国内 6 県で分離されたオリーブ立枯病菌 26 株について phylotype、sequevar、biovar をもとに分類した。また、特徴的な 8 株について、次世代シーケンサー (NGS) による全ゲノム解析を行い、比較ゲノム解析を行った。比較ゲノム解析により得られたオリーブ立枯病に特異的な III 型分泌装置エフェクター (T3E) について、酵母発現系を用いた解析および組換えタンパク質を用いた生化学的解析を試みた。

[結果・考察]

各オリーブ立枯病菌の性状解析の結果、26 株中 20 株 (約 77%) が phylotype I, sequevar 14, biovar 3 に分類された。この結果から特定の遺伝的背景を持った菌株がオリーブに感染し、オリーブ立枯病を引き起こしていることが考えられた。性状及び分離地の違いなどをもとに選抜した 8 株について NGS 解析を行い、比較ゲノム解析を行った。宿主特異的病原性に深く関与することが知られる T3E について、各菌株が保有する T3E レパートリーを比較したところ、オリーブ立枯病は RipBE、RipBK、RipBQ のいずれかを保有することが判明した。次にこれら 3 つの T3E を酵母において過剰発現させたところ、RipBK を発現させることにより酵母に強い増殖阻害が見られ、この増殖阻害が RipBK 分子内の Toll/Interleukin-1 受容体 (TIR) ドメインに依存することを見出した。TIR ドメインは、NAD⁺ を分解する NADase 活性を有することが最近明らかになった。そこで、大腸菌で発現させた組換え RipBK タンパク質について NADase 活性を測定したところ、極めて低い活性しか示さなかった。興味深いことに組換え RipBK タンパク質に酵母抽出液を添加すると添加濃度に依存して NADase 活性の増加が見られた。これより RipBK は、真核生物由来の活性化因子により活性を獲得することが考えられた。

遺伝子組換え大腸菌が生産する新規な膜小胞の解析と有用物質分泌生産への応用

尾島 由紘 (大阪公立大学大学院工学研究科)

[背景・目的]

外膜小胞 (Outer Membrane Vesicles; OMVs) は、グラム陰性細菌の外膜から遊離した直径 20 ~ 250 nm の細胞外小胞である。先行研究では、大腸菌のペプチドグリカン (PG) 構造維持に関与する *nlpI* 遺伝子と、外膜外層へのリン脂質バランスを維持する *miaE* 遺伝子の欠損を重ねた 2 重欠損株 ($\Delta miaE \Delta nlpI$) が、野生株の約 30 倍の OMVs を生産し、細胞内ではペリプラズム空間が広がる原形質分離と細胞内小胞が生じ、多重膜小胞も生産することを確認した。以上より、2 重欠損株は外内膜小胞と呼ばれる、大腸菌では報告のない細胞質内の成分を内包するタイプの膜小胞を生産していると考えられ、それを証明すると同時に、細胞質内で生産される組換えタンパク質や脂肪酸の細胞外分泌生産を達成することを目的とした。

[方 法]

大腸菌実験室株 BW25113 の 2 重欠損株の細胞より抽出した PG を急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により観察し、多重膜小胞生産の機構を考察した。実験室株以外にプロバイオティクスとして知られる大腸菌 Nissle 1917 株に関する 2 重欠損株を作製し、同様の解析を行った。さらにモデル組換えタンパク質として GFP を細胞質内発現させる、もしくは脂肪酸生産大腸菌に 2 重欠損を重ねることで、タンパク質や脂肪酸の細胞外分泌生産量を評価した。

[結果・考察]

PG の急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による観察では、2 重欠損株では野生株には見られないサイズの穴が多数観察されたことから、PG の穴を介して内膜がペリプラズムに漏出し、更に外膜に包まれた外内膜小胞が生産されていると考えられた。また 2 重欠損株では、細胞質内で発現させた GFP が 3 mg/L 程度の濃度で OMV 画分に分泌されていたことから、タンパク質分泌生産ツールとして有効であることを確認した。また、Nissle 1917 株の 2 重欠損株においても同様の結果が得られた。続いて、外来遺伝子の導入などにより作製された脂肪酸生産大腸菌に、さらに 2 重欠損を重ねて脂肪酸の分泌生産を試みたところ、増殖と脂肪酸生産量自体の著しい低下が確認され、細胞への負荷が大きすぎる事が明らかとなった。そこで、遺伝子を欠損するのではなく発現抑制を行う CRISPRi 技術を用いたところ、増殖低下を抑えつつ、OMVs 生産を向上させることができた。今後は、遺伝子抑制を組み合わせることで、脂肪酸などの細胞負荷の大きな有用物質の分泌生産を目指す予定である。

新規分析法によるセリンラセマーゼ生産菌の網羅的探索とこのラセマーゼによる D-セリン高効率生産の研究

金内 誠 (宮城大学 食産業学群)

[背景・目的]

D-アミノ酸は、タンパク質を構成する L-アミノ酸のラセミ体である。D-アミノ酸に関する研究は、機器分析による分析が必要であるなどの理由で研究が遅れていた。しかし、それらの機能性が明らかになりつつある。とくに、D-セリンは、脳内神経伝達に関わる疾患予防・改善効果や、腎臓を保護し病気を予防する効果等の機能性が報告されている。ところが、これら D-セリン生産菌などによる発酵食品の報告はない。そこで本研究では、簡易に測定できる D-セリンの分析法を開発し、天然界から分離した乳酸菌類からセリンラセマーゼ生産菌を分離し、その性質を明らかにした。

[方法]

天然界から分離した乳酸菌を L-セリンを含む培地で培養後、D-セリン量を測定し、D-セリン生産菌を分離した。D-セリンの定量は、各サンプル溶液 50 μ L と 150 μ L の検出試薬溶液 (6.0 U/mL D-アミノ酸オキシダーゼ, 2.0 mg/mL ペルオキシダーゼ, 0.11 mM メチルベンゾチアゾリノン ヒドラゾン 塩酸塩, 0.79 mM ジメチルアニリン, 10 mM エチレンジアミン四酢酸を 50 mM) を 96 穴ウェルマイクロプレートに分注し、37 $^{\circ}$ C, 30 分間反応させ、プレートリーダーで 590nm の吸光度を測定した。

[結果・考察]

D-セリンは、D-アミノ酸オキシダーゼ用いた測定法により迅速かつ安定して測定が可能であった。この測定法を利用し、天然界から分離した乳酸菌 129 株から D-セリン変換能を持つ株を分離した。その結果、H74 株は 50% もの高い変換能を示した。さらにその最適条件を検討したところ、糖源を D-アラビノースとし、また酵母エキスの濃度は 1.0%、窒素源を L-セリンのみの培地で最大となった。また、培養期間を 7~8 日間とすると、最大で約 95% で変換した。この H74 株を同定したところ、16SrRNA-DNA の同一性は、*Enterococcus* 属および *Lactococcus* 属と 99% 以上であった。そこで、生理学特性を検討したところ、H74 株は 50 $^{\circ}$ C 以上で生育ができないことや糖の資化性などから *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* であると同定した。



要旨 (寄付講座助成)

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]

地球上の多様な環境に生息する糸状菌は、バイオマス分解を基礎とした物質循環に寄与することから生態学的に重要であるとともに、植物や動物、人への病害や発酵産業への応用など、人間社会にも影響力を強く持つ菌群である。環境中では、ウイルスや細菌、真菌など異なる増殖マシナリーを持つ微生物と相互作用しており、糸状菌の真の生態を理解する上で、これらの生物間相互作用の詳細かつ俯瞰的な理解が重要となる。そこで私たちのグループは、1) 糸状菌細胞に潜むウイルス、2) 糸状菌同士の共培養、3) 細菌および細菌叢に対する相互作用等に着眼し、解析を進めてきた。特に、これまであまり重要視されてこなかった菌類ウイルス（マイコウイルス）の大規模探索による実態解明ならびに、他の菌と糸状菌との相互応答の分子基盤の解明を目指した。

[結果・考察]

1. 糸状菌に対するマイコウイルスの影響解析

マイコウイルスが糸状菌の二次代謝に与える影響を明らかにするため、3種のウイルスが感染したイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* とこのうち2種のウイルスが除去された株の培養液を比較した。ある培地条件においてウイルス依存的なテヌアゾン酸の産生が見出され、菌糸融合によりウイルス再感染株を作製し確認すると、Totivirus が本化合物の産生を正に制御していることが明らかになった。RT-qPCR 解析から、テヌアゾン酸生合成遺伝子 *TAS1* および転写制御因子 *TAS2* が発現上昇しており、糸状菌二次代謝のウイルスによる調節を、産物レベルおよび遺伝子レベルで初めて明らかにした (Ninomiya et al. 2020)。

アスペルギルス症原因菌 *Aspergillus fumigatus* およびアフラトキシン産生菌 *Aspergillus flavus* を対象にした体系的なウイルス探索の結果、異なるウイルス種による感染株を多数取得した。このうち5株および9株でウイルス除去株を作製し、体系的な表現形比較によりウイルスの影響を解析した。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。なおこの過程で、抗ウイルス剤を利用した、より効果的なウイルス除去法を確立した (Ikeda et al. 2022)。

2. マイコウイルスの大規模解析と分割型 RdRp を保有するウイルスの発見

当グループで分離した菌株のほか、全国の菌株収集・保存機関や研究グループとの共同研究により、子嚢菌、担子菌、接合菌に跨る 1000 株以上を対象にウイルス探索

し、180 株以上の感染株を見出した。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。配列末端まで精細に解析可能な FLDS 法を用いて、これらマイコウイルスのゲノムを解析すると、RNA ウイルスの複製に必須な 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、臨床および深海から分離された *A. fumigatus* で見出された (Chiba et al. 2021a, 2021b)。菌類に広範にわたり感染するウイルスの実態と、その配列多様性を世界に先駆けて提示した。

3. 糸状菌の共培養による化合物生産誘導

潜在的な化合物生産能の活用を志向して、共培養による菌類の休眠二次代謝の活性化が近年注目を集めている。その応答分子基盤の解明を目指した。種々の検討から、*A. fumigatus* との共培養により、*Aspergillus nidulans* の *ors* 遺伝子クラスターが活性化され、ジフェニルエーテル類のオルセリン酸とその類縁化合物の産生が誘導される現象を見出した。さらに、異種発現系を活用して生合成経路の一端を明らかにするとともに、共培養相手の違いによる生産化合物の多様性創出に寄与する応答を示唆するデータを得た (Ninomiya et al. 2022)。

また *Aspergillus niger* は、他の *Aspergillus* 属菌との共培養により、未同定の黄色化合物を生産誘導した。トランスクリプトーム解析および遺伝子破壊株を用いて、生合成遺伝子クラスターを同定すると、当該クラスターは *Penicillium* 属にも保存されていることが明らかになった。一部の *Penicillium* 属菌において同化合物の生産誘導が見られ、相互作用による化合物産生機構が種を越えて保存され得ることを明らかにした。

References

- Ninomiya A., et al., *Frontiers in Microbiology*, 11: 1641 (2020)
Ikeda A., et al., *Frontiers in Microbiology*, 13: 1024933 (2022)
Chiba Y., et al., *Virus Evolution*, 7: veaa101 (2021a)
Chiba Y., et al., *Virus Evolution*, 7: veab095 (2021b)
Ninomiya A., et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106: 4169–4185 (2022)

要旨 (学会・研究部会助成)

日本微生物資源学会

大熊 盛也（日本微生物資源学会 2019-2022 年度学会長）

[活動内容および成果]

日本微生物資源学会は、微生物多様性の理解とその保全及び持続的利用のため、微生物資源に関する科学技術や微生物系統分類学の発展を促進することを目的としている。公益財団法人発酵研究所 2021 年度 学会・研究部会助成を受け、微生物分類学を志す若手および関連の研究者の支援と育成、微生物分類学分野の活性化を図るため以下の活動を実施した。

1. 学会参加と論文発表への助成

「分離・分類・保存」の研究を発表する若手人材を対象に、国内外の学会の旅費・渡航費と学会参加費、および論文投稿の費用の支援を行なった。4名の国際学会参加者、2名の国内学会参加者、4件の論文発表の支援を行うことができた。

2. 技術研修と保存機関紹介の支援

本学会の特徴に、個人会員加え、微生物保存機関が機関会員として学会活動に参画していることが挙げられる。機関会員には分類や保存の技術に長けた研究・技術者が在籍することの強みを生かし、オンラインでの技術研修の開催1件を支援した。微生物の保存活動の啓発を目的に、微生物保存機関とその活動を一般に紹介する動画の作成を支援した。

3. シンポジウムの開催

コロナ禍で従前の対面での開催が困難であり、2021、2022年度の学会年会時に合わせ、それぞれオンデマンド配信形式、対面とオンライン配信のハイブリット形式でのシンポジウムを開催し、主催者として不慣れなこれらの形式での開催を支援した。それぞれ「環境負荷低減に向けた農業・食品関連微生物の分類とその応用」、「持続可能な微生物の利用と分類」と題したシンポジウムで、海外からの講演者を含む講演がなされた。シンポジウムの詳細については、本学会の学会誌に報告されている。2023年3月には、都内の会場にて対面とオンライン配信でのシンポジウム「新たな時代を拓く微生物分類学：現状と展望」を開催した。いずれも公開のシンポジウムとして開催し、学会員に限らず多数の参加者があった。

公益社団法人 日本生物工学会

青柳 秀紀

(副会長／未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会代表)

[活動内容および成果]

1. 日本生物工学会ではじめて、研究部会支援型の公募制度を確立し、「微生物の分離・培養・分類・保存などに関する研究で、生物工学分野におけるダークマター微生物の課題を解決する新たな方法論や基盤技術の確立を目指した研究を推進し、未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会の活動推進に貢献する提案」を生物工学会会員から公募・審査を行った。その結果、3名の若手研究者に研究助成を行い、研究部会と連携して研究を推進し、一定の成果が得られた。

2. 本研究助成の成果発表も含めた、シンポジウム「未培養微生物（微生物ダークマター）資源の新展開」を主催・開催した（2023年3月29日、対面開催、82名参加）。本シンポジウムでは、新規な培養デバイス iChip を開発、活用することでダークマター微生物を培養化し、新規抗生物質（teixobactin）の発見、生産につなげた Prof. Kim Lewis（Northeastern University）の基調講演、Lewis 研究室の Dr. Sangkeun Son の招待講演も実施した。産官学の研究者や学生が参加し、対面開催ならでの、活発なディスカッションと新たな人的ネットワークの形成ができた。

3. 日本生物工学会の研究部会であるバイオインフォマティクス相談部会と連携し、ダークマター微生物関連研究における、実験自動化、ビッグデータやAIの活用について考える、若手研究者を中心としたシンポジウム「大規模データとインフォマティクスが拓く未培養微生物研究」（2022年3月7日、オンライン開催、100名参加）を開催した。さらに、本シンポジウムの討論内容も踏まえ、第74回日本生物工学会大会（創立100周年記念大会）でシンポジウム「生物工学が拓く未培養微生物（微生物ダークマター）の未来」（2022年10月20日、オンライン、150名参加）を開催し、最先端の研究成果を紹介し、討論を行った（現在、両研究部会で連携し、自動化に関する研究を開始している）。

要旨 (一般研究助成)

Gallionellaceae 科微好気性鉄酸化細菌の分離と特性の解明

渡邊 健史 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

Gallionellaceae 科は中性淡水環境に生息する微好気性鉄酸化細菌で構成されており、ストークと呼ばれる紐状の菌体外高分子物質を生成する *Gallionella ferruginea* はその代表種である。環境中には多様な微好気性鉄酸化細菌が生息すると予想されるが、Gallionellaceae 科はこれまでに4種しか記載されていない。本研究では、水田環境より新規の菌株を分離し、その特徴を明らかにすることを目指した。名古屋大キャンパス内で得た水稻根とブルキナファソの水稻鉄過剰障害発生圃場より得た水稻根と田面水試料を分離源とした。試験管の底に硫化鉄を沈め、酸素と二価鉄の対称的な濃度勾配を形成させた無機塩培地で鉄酸化とともに増殖した微生物を集積、純化し、4株の Gallionellaceae 科微好気性鉄酸化細菌を得た。このうち1株は硫黄酸化能も有すること、ほかの3株は、特徴的な形態のストークを形成することが観察された。16S rRNA 遺伝子配列解析より、2株は *Ferrigenium* 属の同一の新種、別の2株は *Sideroxyarcus* 属のそれぞれ別の新種である可能性が示された。本研究より、水田環境に生息する新規の Gallionellaceae 科微好気性鉄酸化細菌を複数分離することに成功した。

深海底に沈む植物片をニッチとした深海生菌類の多様性

長野 由梨子 (海洋研究開発機構地球環境部門)

深海底には、陸上より流出した多種多様な植物片が点在している。植物の主要な分解者は真菌類であるが、深海環境においても沈木に子実体を形成する深海生菌類が存在する。深海生菌類は6種が報告されているのみで、その多様性や分布、生態についてはほとんど研究が進んでいない。そこで、深海底に沈む木材等をニッチとした深海生菌類の多様性や分布を網羅的に明らかにするために、深海底より植物片を回収し、ITS rRNA 遺伝子を対象とした真菌アンプリコン解析を行なった。

深海底から植物片19試料、浅海から1試料、海藻1試料を回収したところ、深海由来の1試料において菌類の子実体が確認され、深海生菌類の一つ *Oceanitis scuticella* であることが明らかとなった。他試料では子実体の確認はできなかったものの、アンプリコン解析の結果、異なる水深や海域から回収した8試料中で *O. scuticella* と高い相同性を示す配列が検出された。このことから *O. scuticella* は深海環境中の植物基質に高頻度で存在することが明らかとなった。また、水深5mの浅海より回収した試料からは海生菌類である *Ceriosporopsis halima* と高い相同性を示す配列が優占して検出されたが、深海由来4試料からは、*C. halima* と近縁だが別種と推定される配列が優占種として検出された。このことから *C. halima* と近縁な深海種が存在することが示唆された。

土壌に特異的に優占する難培養細菌門アシドバクテリアのバイオリソース 拡充

伊藤 英臣（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）

環境中の核酸ベースの解析から、アシドバクテリア門細菌は海や河川といった水圏ではほとんど検出されない一方、土壌圏では普遍的かつ極めて高頻度に検出される、「土壌ならではの細菌群」であることが知られている。それにも関わらず、他門と比べアシドバクテリア門細菌の単離培養例は極めて乏しい。単離株が少ない、すなわち参照可能なゲノム情報が少ないことは、相同性検索に依存する環境核酸ベースの解析において致命的であり、現在の研究のほとんどが土壌の優占種であるはずのアシドバクテリアの機能を考慮せずに結論を導かざるを得ない。このように生態不明な巨大な優占群があることが土壌圏の微生物生態の包括的な理解の妨げになっているともいえる。

これまでに土壌そのものを培地として用いた集積培養法により新系統の嫌気微生物を単離培養してきたが、その中でアシドバクテリアも単離できることが分かった。そこで本研究では、考案した集積培養法を用いて様々な土壌からアシドバクテリアを集中的に単離培養し、ゲノム情報や系統分類を明らかにすることを試みた。本発表ではこれまでに単離した 430 株のアシドバクテリアの系統や機能について発表する。

各種胆汁酸分子の発芽誘導能を用いた難培養性腸内細菌の分離と日本人腸 内細菌叢カクテルの創製

中山 二郎（九州大学大学院農学研究院）

数百種類からなる腸内フローラの構造を遺伝子レベルで俯瞰的に解析する研究スタイルが定着しつつある一方、腸内フローラを細胞や分子レベルでボトムアップに解析する研究は、腸内細菌の分離と培養に高いハードルがあり一筋縄では進行しない。そのような背景のもと、我々は、腸内細菌叢中にて高い占有率を占めるが、難培養性細菌が多い有孢子桿菌のクロストリジア綱細菌の胞子が、グリシン抱合型胆汁酸において高効率に発芽誘導されることを見出し、胆汁酸用いた難培養性クロストリジアの高効率培養法を確立した。そして、その方法を用いて得られた菌種を含めた日本人優占種 16 菌種からなる合成細菌叢を調製し、糖源を、スターチ、ペクチン、アラビノキシラン、ムチンに変えて混合培養を行った。その結果、スターチにおいて他に比べて顕著に高い全細菌の増加と短鎖脂肪酸の生産を確認した。しかし、各細菌の増加は炭素源により異なり、特に腸内主要菌であるバクテロイデスはスターチにおいては増殖が悪く、他の炭素源において良好な増殖を示した。今後、このようにして調整した人工腸内細菌叢を用い、各種食成分の複合細菌叢における代謝のトレース実験を行う予定である。

地衣類チャシブゴケ属の新しい分類体系構築に向けた試み

橋本 陽（理化学研究所バイオリソース研究センター）

地衣類最大のグループの一つであるチャシブゴケ属（チャシブゴケ科・チャシブゴケ目）は、分類学的な複雑性により研究が遅れている。本研究ではチャシブゴケ属を微生物資源として効率的に有効利用するために本属の分類学的再整理の新たな指針となるDNA情報の整備と子実体発生様式に基づく形態観察を行った。本研究では特に本属内の代表的なサブグループであるモエギイボゴケおよびコナイボゴケについてその子実体形成様式と複数の遺伝子領域に基づく種内系統の把握を行った。遺伝子解析の比較の結果として、いずれの系統においても当初有望と思われた菌類のバーコード領域であるリボソームITS領域はRPB1やRPB2、ミトコンドリアSSU領域に比べて種内多様性が極めて高く、菌種の同定には必ずしも有用ではない可能性が示唆された。子実体形成様式については解釈が極めて困難であるが、グループ毎に形態形質の発生順序に一定の共通派生形質が存在することが明らかにされた。本研究では主にDNA配列と子実体形成様式に基づき調査が進められたが、正確な種同定のためには地衣成分の分析や正基準標本との厳密な比較が求められ、継続的な研究が求められる。

土壤微生物が産生する揮発性有機化合物（VOCs）の網羅的解析による土壤の微生物性評価法の開発

池永 誠（鹿児島大学学術研究院農水産獣医学域農学系）

土壤微生物の間には様々な相互作用が存在しており、環境条件によって常に影響を受けている。微生物間相互作用を理解し、状況を的確に判断できれば、土壤の微生物性評価に繋がるのが期待される。本研究では、土壤微生物が相互作用に用いる揮発性化合物（VOCs）（以降VOC）を網羅的に解析する方法を検討し、土壤の微生物性評価法に資することを目的とした。本研究では①大容量ヘッドスペース法と②モノトラップ捕集法を適用し、土壤中に存在する微生物VOCの網羅的解析法を検討した。前者は大容量の土壤ガスを吸引・凍結濃縮し、GC-MSでVOCを測定する方法、後者はモノトラップにVOCを吸着させ、GC-MSで測定する方法である。前者の測定条件を最適化し、植生の異なる土壤で測定した結果、土壤毎に異なるVOCパターンが検出された。土壤環境の違いで微生物活性が異なり、VOCパターンにも影響すると推測した。しかし、ピークそのものは極微量であった。一方、後者は比較的高感度で、土壤改良資材を加えた土壤と比較対照でVOCパターンに違いが認められた。また、微生物叢の変化とも一致しており、微生物性評価法として有効な手法と考えられた。

ワイン発酵におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用展開

西村 明 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類醸造に用いられ、酵母による原料の資化（細胞内への取込みと代謝）は多様な味・風味を生み出す。プロリン（Pro）はブドウなどの原料に最も多く含まれるアミノ酸であるが、酵母は Pro をほとんど資化できない。我々はいくつかの報告を、環境中のアルギニン（Arg）が Pro 資化抑制因子として働くことを報告しているが、その分子機構は解明されていない。まず、Arg によるプロリン資化抑制が解除された変異株を解析した結果、Arg トランスポーター Can1 が Pro 資化抑制機構に関わることを見出した。また、Can1 の Arg 取込み活性は Pro 資化抑制の制御と無関係であることが判明した。近年、トランスポーターの中で輸送活性以外に外部環境因子の受容体活性を併せ持つタンパク質（トランスセプター）が注目されており、トランスセプターは Protein kinase A (PKA) シグナルを活性化する。そこで、Arg 添加時の PKA シグナルの活性化レベルを検討したところ、Arg の添加によって Can1 依存的に PKA シグナルが活性化することが明らかになった。以上のことから、Arg は Can1 依存的に PKA を活性化させ、Pro 資化抑制を制御していることが示唆された。

病原細菌のインフラマソーム活性化因子の同定と応用

原 英樹 (慶應義塾大学医学部、現 旭川医科大学医学部)

微生物成分は宿主受容体で認識され様々な炎症応答を惹起する。一般的な炎症応答は感染防御に寄与するが、我々はリステリアや黄色ブドウ球菌などの病原菌が自然免疫機構インフラマソームを活性化することで生体内増殖を加速し、感染病態を悪化させることを見出した。インフラマソームは細胞内受容体、アダプター分子 ASC、タンパク分解酵素カスパーゼ 1 で構成されるタンパク複合体であり、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の産生を誘導する。本研究では、グラム陽性菌感染症におけるインフラマソームの活性化機序を解析した。

マクロファージにリステリアを感染させると病原因子 LLO 依存的にインフラマソームが活性化した。また、LLO が Syk などのリン酸化シグナルを活性化することでインフラマソーム応答を亢進することを見出した。さらに、黄色ブドウ球菌感染においては、マクロファージを JNK 阻害剤で処理するとインフラマソーム応答が抑制された。そこで、黄色ブドウ球菌を感染したマウスに JNK 阻害剤を投与したところ感染病態が改善した。以上の結果から、インフラマソームシグナルは感染症における新たな治療標的となりうることを示された。

幅広い単細胞生物のイオンチャネルの構造と機能から根源的な情報伝達手段であるイオン透過の成り立ちに迫る

入江 克雅 (名古屋大学細胞生理学研究所、現 和歌山県立医科大学薬学部)

原核生物のイオンチャネルは単純な構造であるため始祖イオンチャネルに近く、イオンチャネルの基本的な機能の詳細な解析に適したイオンチャネルである。二価カチオンの透過や機能阻害はイオンチャネルごとの重要な特徴であるが、この違いがどのように生み出されるかは不明であった。最も構造解析が進んだ原核生物のチャネルである NavAb は、二価カチオンの透過や機能阻害を受けない。そこで、このチャネルに二価カチオンによる透過や阻害が導入できれば、構造解析から詳細な分子メカニズムの解析が可能になると考えた。

イオン選択性フィルター内のアミノ酸に変異導入を行い二価カチオンによる阻害効果を再現する NavAb 変異体を取得した。阻害効果を示す変異は、親水性を高めるアミノ酸への変異であった。結晶構造解析と分子動力学計算から、これらの変異体では選択性フィルターが形成するイオン透過経路内にカルシウムイオンが滞留しやすくなることが示された。これにより、ナトリウムイオンが阻害されることが示唆された。この結果は、二価カチオンの透過と阻害の分岐となる分子機構を示しており、イオンチャネルの進化における機能獲得の過程も示唆している。

真核微生物の細胞表層糖鎖マーカーとしての酸性糖鎖の選別機構と生理的役割の解明

竹川 薫 (九州大学大学院農学研究院)

分裂酵母の表層ガラクトース (Gal) 含有糖鎖は、凝集素タンパク質 Gsf2 との相互作用を介して非性的凝集を引き起こす。さらに糖鎖末端の Gal に付加するピルビン酸 (Pv) により、凝集は抑制されるため、分裂酵母は糖鎖の Gal および PvGal を同種細胞間認識に活用している。糖鎖中の Gal はゴルジ体に局在する Gal 転移酵素が関与するが、詳細な機能は未解明であった。そこで、本申請研究では糖鎖への PvGal 付加を担う Gal 転移酵素の機能および基質特異性の解析を行い、以下のことを明らかにした。(1) 分裂酵母ゲノムに存在する推定 α ガラクトース転移酵素 (GalT) 10 遺伝子を、当研究室で取得した GalT の 10 重遺伝子破壊株 (Δ 10GalT) に単独で導入し、各株の糖鎖構造を比較解析して各 GalT の基質特異性を明らかにした。(2) PvGal 合成に関与する Pvg タンパク質の機能を解析した結果、Pvg5 を中心とした Pvg3-Pvg5-Pvg2 複合体の形成と、Pvg1/ピルビン酸転移酵素が相互作用することから、PvGal の生合成が Pvg5 を中心としたヘテロ複合体の形成を介して連続的に起こることが示唆された。

スピルリナ強光培養時に確認されたアルカリバチルス出現メカニズムの解析

渡辺 智 (東京農業大学生命科学部)

スピルリナ (*Arthrospira platensis*) はタンパク質をはじめとする栄養素や色素を豊富に含んでいる糸状性の可食藍藻類である。高塩、高アルカリ環境を好むという特徴を利用し開放系大規模培養が行われているが、スピルリナ生産の現場ではスピルリナの細胞凝集と、それに伴う品質低下が問題となっている。

これまでの我々の研究から、スピルリナを強光ストレスに曝すことにより凝集体形成が促進されること、さらに凝集体には好アルカリ性のバチルス属細菌 (アルカリバチルス) が出現することが明らかになった。

アルカリバチルス出現メカニズムの解明を目的として、強光ストレス時に形成されたスピルリナ細胞塊の成分を解析した結果、糖代謝産物が減少し、代わりにグリコーゲンを豊富に含む多糖が検出された。凝集体に出現したアルカリバチルスを単離し、スピルリナ培地中での増殖を解析した結果、アルカリバチルスは pH 9 以上のスピルリナ培地においてグリコーゲン依存的に増殖を示した。これらの結果からアルカリバチルスはストレスにより損傷した細胞より漏出したグリコーゲンを栄養源として出現すると考えられた。

ビフィズス菌のヒト腸管共生・相互作用因子の構造生物学的解析

伏信 進矢 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

ヒトの健康に資する腸内細菌として有名なビフィズス菌の中には、糖質分解酵素を菌体外に多数持つものが存在する。近年、それらの菌体外酵素が食品中の難分解性糖質の分解だけではなく、ヒト腸管の糖タンパク質 (ムチン) の糖鎖に結合し、腸管への定着と宿主との共生に寄与していることがわかってきた。我々は *Bifidobacterium bifidum* の菌体外マルチドメイン糖質分解酵素群の立体構造解析を行い、それらのヒト糖鎖への結合・認識・分解に関する構造基盤を明らかにした。今回の成研究報告会では、GH20 に属するスルホグリコシダーゼの結晶構造から発見した硫酸化 GlcNAc に特異的に結合する新規な CBM32 ドメイン等、いくつかの研究成果についてポスター発表する。

環境メタゲノムから発見した新規な遺伝子発現調節機構の解明と生理学的意義

末永 光 (産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門)

バクテリアのゲノム上には、同一配列が繰り返す「反復配列」が存在することが知られているが、そのほとんどが未だに機能不明である。我々はメタゲノム手法を用いた芳香族化合物の変換酵素遺伝子の探索の過程で、環開裂酵素の上流に存在する連続した9塩基ユニットの単純反復配列と、その繰り返し数の多型を発見した。

人工合成した反復配列を含む環開裂酵素遺伝子を大腸菌プラスミドにクローニングし、異種発現することを試行した。その結果、本反復配列の繰り返し数の相違によって、下流に存在する遺伝子の発現量が変化するという、興味深い生命現象を見いだした。さらなる実験により、本配列は翻訳効率に影響を与えることで、微生物において汎用的に機能する遺伝子発現調節システムであることが示唆された。

本反復配列は、比較的毒性の強い芳香族化合物の分解を促進するために機能していると考えられ、宿主にとって極限的な環境における環境適応機構のひとつであると考えている。その一方で、タンパク質の大量発現や遺伝子発現のコントロールのための、新規な合成生物学的装置としてバイオテクノロジーにも転用できると期待される。

ストレス検知の場としてのオルガネラ膜：細胞内膜の相分離を利用した細胞成長調整システムの分子基盤

松浦 彰 (千葉大学大学院理学研究院)

種々のストレスに直面した細胞は、成長速度を一時的に低下させ適応後に再び成長を回復する。この制御はタンパク質合成速度の調節を介してなされるが、ストレスの違いによらずタンパク質合成速度を制御する共通の仕組みは未解明である。我々は、TORC1複合体がリソソームや液胞の膜上で活性化され下流に情報を伝達することで、タンパク質合成活性が制御されていることに注目した。ストレス暴露後の酵母細胞では、液胞膜脂質成分の相分離による一時的偏在と同じ時期にTORC1の下流因子Sch9が液胞膜に結合し再活性化される。しかし、この時期に存在量が増加するPI(3, 5)P₂の合成を遮断した場合にもSch9の活性化への影響は見られなかった。一方、H⁺に対するイオノフォアを用いて細胞質pHを人工的に操作する系を用いた解析から、液胞膜上に存在しているPI(3, 5)P₂の荷電状態の変化がストレスセンサーとして働いていることを示す結果を得た。この結果から、オルガネラ膜リン脂質が細胞質pH変化のセンサーとなってストレス状態を感知し、タンパク質合成活性を制御するという新奇情報伝達経路の存在が示唆された。

多細胞システムの機械受容シグナル伝達機構に関わる複数イオンの解明

森本 雄祐 (九州工業大学大学院情報工学研究院)

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の発生過程における Ca^{2+} シグナルを GCaMP6s プローブを用いてタイムラプス計測することにより、周期的な振動が観察できた。一方、多細胞体では、周期的なシグナル振動は見られないが、時折、一過的な Ca^{2+} シグナルが多細胞体全体に伝搬することが観察され、外部からの刺激実験により、機械刺激に応答してシグナルが発生していることが明らかとなった。細胞性粘菌では、単細胞期の機械刺激応答に Piezo ホモログによる細胞外からの Ca^{2+} 流入が主に働いていることが報告されている。これに対し、多細胞体の機械刺激に追従する Ca^{2+} シグナルでは、Piezo ホモログの寄与は小さく、細胞外からの Ca^{2+} 流入だけでなく、細胞内の小胞体からの IP3 受容体を介した Ca^{2+} 放出も同時に寄与していた。同じ細胞性粘菌の株でも、単細胞期と多細胞期で機械刺激応答のシグナル経路が異なり、経路が異なりながらも同じ Ca^{2+} シグナルが働いていることを示している。

出芽酵母可視化スクリーニングによる活性化ステロール分布領域制御因子の特定と制御機構の解明

岸本 拓磨 (北海道大学遺伝子病制御研究所)

細胞膜に最も多く含まれるステロールは、膜中に包埋された状態で膜外の物質との接触が制限される。一方、このような制限は周囲の膜環境の変化により解除され膜表面にステロール分子が露出する物理状態 (ステロール活性化) を示す。この現象は、主に細胞膜での様々な現象に関わると推測されるが、その制御機構は未解明である。

本研究では、真菌類ステロールの活性化状態を可視化する脂質プローブ (GFPen-D4H) を開発し解析を進めた。出芽酵母の野生株が示す GFPen-D4H の極性分布から、活性化が局所的に発生すると予測された。そこで、極性分布を指標に、細胞膜や表層小胞体に分布するタンパク質をコードする約 400 種類の遺伝子破壊株の中から、GFPen-D4H の分布が変化する遺伝子変異を選別した。これら変異のうち、ステロール輸送 Lam タンパク質やリン脂質合成酵素の遺伝子変異が、合成致死性を示すことを明らかにした。この条件致死変異株の表現型解析により、細胞膜の形態に劇的な異常が生じることが確認された。以上の結果から、複雑なメカニズムで制御されたステロールの活性化が、細胞膜の構造を維持するために機能する可能性が示唆された。

グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

千葉 志信 (京都産業大学生命科学部)

何らかの原因で終止コドンに欠いた mRNA はリボソームの停滞を引き起こすが、これらは、リボソームレスキュー機構によって解放される。多くのバクテリアは、SsrA-SmpB 複合体による *trans*-translation と呼ばれるレスキュー機構をもつが、枯草菌は、それに加え、第二のレスキュー因子 BrfA を有する。BrfA は、停滞したリボソームに翻訳終結因子である RF2 をリクルートし翻訳終結を引き起こす。本研究では、遺伝学的な解析から、BrfA と、RF2 やリボソームとの相互作用を詳細に解析した。BrfA に C 末端欠失変異や点突然変異を網羅的に導入し、生育を指標とした *in vivo* の表現型解析、および、*in vitro* 翻訳系でのリボソームレスキュー機能の解析を行った。ここから得られた結果と、過去に得られた立体構造データとをあわせて解析した結果、BrfA の Arg25 はリボソームと、また、Phe31、Arg36 は、それぞれ RF2 との相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、TnSeq 解析から、*ssrA* および *ssrA/brfA* 二重欠失変異との組み合わせで生育阻害を引き起こす変異を複数決定した。

土壌中での環境適応を標的とした防除技術開発を指向した、青枯病菌のシデロフォア産生機構の解明

曳地 康史 (高知大学農林海洋科学部)

土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia solanacearum* species complex (青枯病菌) の感染により 250 種以上の作物にもたらされる青枯病に対する持続性ある防除のための標的として、青枯病菌のシデロフォア (Sd) 産生機構とともに、Sd の病原性への関与について解明した。まず、青枯病菌 OE1-1 株が産生する Sd である Micacocidin (Mic) と Staphyloferrin B (StB) の化学構造を明らかにし、それらの検出系を開発した。そして、Mic と StB の産生に関わる遺伝子を同定した。さらに、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から、土壌環境に類似した二価鉄非存在下で、Mic と StB の産生に関わる遺伝子の発現が誘導されることとともに、StB 産生に関わる遺伝子の発現が、青枯病菌の病原性の制御の主たるシグナル系であるクオラムセンシング (QS) により抑制されることを明らかにした。そして、Mic 産生能喪失により、QS に依存した遺伝子発現制御が崩壊し、その結果、病原性の喪失をもたらすことを見出した。すなわち、土壌環境下で、Mic は、青枯病菌の病原性に不可欠な QS に依存した遺伝子発現制御に関わり、StB 産生とともに青枯病菌の病原性の制御に関わると考えられた。

酵母の細胞質局在型センサーによる新奇高浸透圧感知機構の解明

館林 和夫 (東京大学医科学研究所)

出芽酵母の高浸透圧応答性 HOG 経路は、高浸透圧順化に働く情報伝達経路である。2つの独立した上流支経路の膜局在型高浸透圧センサーが高浸透圧を感知すると、Ste11 MAP3K-Pbs2 MAP2K-Hog1 MAPK、および Ssk2/Ssk22 MAP3K-Pbs2 MAP2K-Hog1 MAPK からなる MAPK カスケードのリン酸化反応が半ば自動的に進むと考えられていた。

これに対し我々は、上流センサーだけでなく、高浸透圧が経路下流でも① Pbs2 による Hog1 のリン酸化を増強すること、② MAP3K → Pbs2 MAP2K のリン酸化反応も増強すること (本研究) を見出した。上流に加え細胞質局在キナーゼがセンサーとして働くことで、HOG 経路の応答が高浸透圧曝露時のみ適切に誘導される。

高浸透圧のリン酸化増強反応で、Pbs2 は酵素 (Pbs2 → Hog1)、基質 (MAP3K → Pbs2) として働くため、そのリン酸化制御の解明が重要である。本発表では、新たに明らかになった Pbs2 の活性化に働くリン酸化部位が 2C 型ホスファターゼにより脱リン酸化される活性制御機構を中心に報告する。

ビタミン B₆ の生体内恒常性維持機構の解明

伊藤 智和 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

ビタミン B₆ の補酵素型であるピリドキサルリン酸 (PLP) は、多くのアミノ酸代謝酵素の補酵素として機能し、生体代謝に必須の役割を果たす。一方、この前駆体であるピリドキシンリン酸 (PNP) は、強い細胞毒性・代謝攪乱作用を示す。生体内の各ビタミンレベルは必要十分量に厳密に制御される必要があるが、この恒常性維持機構には不明な点が多く残されている。

Escherichia coli の細胞破碎液の酵素活性測定は、*E. coli* の PNP レベルの制御に、既知のオキシダーゼ (PNP オキシダーゼ、PNPO) に加え、脱リン酸化酵素が関与することを示唆した。*E. coli* の PNP 依存的致死性株を利用したライブラリースクリーニング、その後の酵素活性測定、欠損株の解析などを経て、*E. coli* の主要な PNP および PLP ホスファターゼとして YigL および YigL/YbhA を同定した。また、大部分の生物における PNP レベルの新奇制御因子である PLP 結合タンパク質 (PLPBP) の機能解析を行なった。*plpbp* 欠損株は、PNP に対する反応性を示さないにも関わらず、*pnpo* 欠損株と類似した表現系を示した。PLPBP と PNPO との直接的な相互作用は認められず、何らかの間接的な作用によって PNPO の酵素活性制御に関与する可能性が示唆された。

トリコテセン系かび毒素合成制御の分子機構

木村 真 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

麦類の赤かび病を起こす *Fusarium graminearum* は、トリコテセン系毒素を大量に生産し、食の安全を脅かす。毒素生合成 (*Tri*) 遺伝子の転写には、遺伝子クラスター中の転写因子遺伝子 *Tri6* と調節因子遺伝子 *Tri10* が必須だが、*Tri6* 転写活性化の分子機構は明らかになっていない。本研究では酵母二形成に関わる転写調節因子をコードする *WOR1* のオルソログ *Fgp1* のトリコテセン生合成への関与を検証した。*Fgp1* の構成的発現は pleiotropic な効果を示し、培地によっては培養液 pH を上昇させ、毒素生産を阻害した。一方、pH 2.5 に保持すると毒素を生産しないグルコース培地でも大量に毒素を生産した。*Fgp1* のリン酸化サイト Thr-67 を Ala に置換すると *Tri6* が全く発現せず毒素生産性が失われた。しかし遺伝子クラスターコア領域にベクターを挿入して伸長したり、生合成を活性化する低分子化合物を添加したりすると *Tri6* 転写が活性化された。以上のことから、トリコテセン遺伝子クラスターは強固なヘテロクロマチン構造をとり、*Fgp1* リン酸化がその弛緩に必須であることが示唆された。

細菌の宿主定着能獲得や病原性獲得への進化のメカニズムの解明

坂本 啓 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、現 山口大学大学院医学系研究科)

大腸菌、肺炎桿菌等は院内感染の原因として重要である。しかし、検出された菌株全てが感染症の原因菌 (= 病原性を有する) という訳ではない。これらの多くは口腔内や腸管内の常在細菌叢の構成種であり、免疫抑制状態の患者に対してでさえ、大抵は感染症を引き起こさない。そこで、同じ種でありながらこのような病原性の差を示すに至る原因を解明するために、長崎大学病院で検出された肺炎桿菌約 40 株を用いて動物に対して感染実験を行い、重症度を比較した。また、使用した菌株全てについて全ゲノム解析を行い、重症化 (強毒化) に関わる因子の抽出を行った。すると、強毒株では特定の siderophore による鉄獲得システムを備えた株を複数認め、そのシステムを保持している株は弱毒株では認めなかった。一方で、既報で見られる重症化に関わる遺伝子 (*rmpA* や *magA*) は、強毒株でも保持しているものは少数にとどまった。また、強毒株が好中球による貪食に抵抗性であるとの既報から、好中球貪食アッセイを行ったところ、強毒株と弱毒株との間で被貪食数に有意差は認めず、鉄獲得能の強弱が毒性を直接左右する可能性が示唆された。

分岐鎖アルコール認識機構とその生理的意義の解明

黒田 浩一（京都大学大学院農学研究科，現 京都工芸繊維大学分子化学系）

イソブタノールなどの分岐鎖アルコールは、酵母の窒素飢餓時に誘導されるアミノ酸異化反応の副産物である一方、細胞毒性を示す。しかし、分岐鎖アルコールの生理的意義や、毒性を発揮する機構については不明のままだった。そこで、アルコールの中でも工業的利用価値の高い分岐鎖アルコールに着目し、酵母の分岐鎖アルコール認識機構とその生理的意義の解明を目指した。

発表者が以前に同定したイソブタノール耐性株について、各種アルコールに対する耐性を調べたところ、*gln3Δ* 株は分岐鎖特異的である一方、*gcn3Δ* 株は炭素数 5 以上のアルコールに対して構造を問わず *gln3Δ* 株よりも高い耐性を示した。両耐性株と野生株を 1-ペンタノール（直鎖）、イソペンタノール（分岐鎖）存在下にて培養した際の転写レベルを RNA-seq により比較した。その結果、構造の異なるアルコールに対する野生株の細胞応答に差異が見られた。また、両耐性株の間で、1-ペンタノールに対して異なる発現変動を示す遺伝子を同定した。これらの結果から、構造の異なるアルコールに酵母が及ぼす影響について新たな知見が得られ、アルコール認識機構やその生理的意義について考察した。

祖先型硫黄酸化経路の鍵となる未知酵素の同定

渡邊 友浩（北海道大学低温科学研究所）

初期の地球生命は、亜硫酸をエネルギー代謝に利用していた。亜硫酸エネルギー代謝は、シロヘム含有酵素によって推進される。このため、シロヘム含有酵素は亜硫酸エネルギー代謝の進化の指標である。一方で近年、現存する硫黄酸化菌のエネルギー代謝において、ヘテロジスルフィド還元酵素（sHdr）と未知の酵素の共役反応が亜硫酸を生じる可能性が指摘されている。この反応の進化起源は、亜硫酸エネルギー代謝の進化研究に新たな潮流を生み出すかもしれない。本研究では、未知酵素の存在を比較ゲノムと比較トランスクリプトームで検証した。この結果、未知酵素の存在は支持されなかった。一方で私は、sHdr 複合体を世界に先駆けて精製し、複合体のタンパク質構成から鉄硫黄クラスターを使った亜硫酸合成反応を予想した。つまり、複雑な構造のシロヘムではなく単純な構造の鉄硫黄クラスターが亜硫酸合成の場となる可能性がある。sHdr の進化系統樹は、その進化起源がバクテリアとアーキアの分岐以前にある可能性を示した。よって、本酵素と亜硫酸エネルギー代謝の進化起源はお互いに近い可能性がある。

ビスフェノール S 分解微生物系の人工構築と生物処理への応用

武尾 正弘 (兵庫県立大学大学院工学研究科)

ビスフェノール S (BPS) は、スーパーエンジニアリングプラスチックの原材料として大量に使用されているが、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質である。ビスフェノール類の中でも難分解性であり、これを基質として良好に増殖できる微生物は報告されていない。

本研究では、BPS をヒドロキノン、フェノールスルホン酸、ヒドロキノンスルホン酸に容易に分解できる *Sphingomonas* 属細菌のノニルフェノールモノオキシゲナーゼの遺伝子 (*nmoA*) を、これらの中間体を資化できる *Pseudomonas putida* TSN1 株及び *Delftia lacustris* HQS1 株に導入し、BPS 分解微生物系の人工構築を試みた。その結果、得られた TSN1 (*nmoA*) 株及び HQS1 (*nmoA*) 株はともに良好に BPS を分解し、そこで生じた上記中間体をも減少させることに成功した。一方、この研究中に、高濃度の BPS (500mg/L 程度) を単独で分解資化する真菌 (NBRC115858) の分離に世界で初めて成功した。その菌体を固定化した場合、800mg/L の BPS を 48h 以内に完全に分解し、繰り返し分解も可能であった。

ATP-grasp リガーゼにより修飾される新規ペプチドの異宿主生産

小谷 真也 (静岡大学大学院農学領域)

リボソーム合成および翻訳後修飾ペプチド (RiPP) には、20 を超えるサブクラスが含まれる。ゲノムマイニングにより、新しいクラスの RiPP である graspetide の生合成遺伝子クラスター (BGC) がバクテリアのゲノムに見出されている。このクラスの RiPP は、生合成システムに環状ペプチドの生産に不可欠な ATP-grasp リガーゼが含まれている。我々は海洋プロテオバクテリア *Marinomonas fungiae* のゲノムに graspetide の新規生合成遺伝子クラスターを見出した。その生合成遺伝子クラスターには、前駆体ペプチド (*marA*) と ATP-grasp リガーゼ (*marB*) をコードする 2 つの遺伝子が含まれていた。そこで、大腸菌による異宿主発現を行った結果、予想される新規ペプチド marinomonasin の生産がみられた。NMR を用いた構造解析により marinomonasin の構造には分子内にイソペプチド結合 2 つ、エステル結合 1 つが含まれていることが明らかとなった。そのことから、ATP-grasp リガーゼ MarB は新しい二機能性酵素であることが示された。

プラスチック廃棄物の微生物分解の効率化を目指した生化学・工学的アプローチ

渡邊 崇人（京都大学生存圏研究所）

環境中のプラスチック廃棄物の問題が深刻化している。我々は、この問題を解決するための一助として「どうすれば生分解の主役となる微生物の分解能を向上させることができるのか?」という「分解する側」と、「どうすれば廃プラスチック類を生分解され易くできるのか?」という「分解される側」の両方に焦点を当てる必要があると考えている。

これまでに我々は、数多くの環境汚染物質分解細菌、特に、ビフェニル/PCB分解細菌の遺伝・生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた。今回、これらの分解細菌がプラスチック類の分解にも利用できるかどうか注目した。まず、既に得られているゲノム情報により、プラスチック類やそれらの原料の分解に関与すると予想される酵素遺伝子を探索した。また、その内、候補となる分解酵素遺伝子の一部については単離及び異種発現を試みた。一方、微生物分解の促進のためにプラスチック類の物理的・化学的な処理（前処理）にも注目した。例えば、裁断したペットボトル等のプラスチック片に対しマイクロ波処理やプラズマ処理を行い、微生物による資化性等に変化があるかどうかを検討した。

大規模ゲノム再編成を用いる休眠型二次代謝産物生産法の開発

浅井 禎吾（東北大学大学院薬学研究科）

糸状菌のゲノム上には数多くの天然物生合成遺伝子クラスターが存在する。一方で、それらの大半は、実験室条件下での培養では、十分に発現が誘導されないいわゆる休眠遺伝子である。これら休眠遺伝子は新規天然物の有望な資源とみなされており、これらを活用した天然物の生産法の開発が数多く試みられている。私たちの研究室でも、エピジェネティック酵素阻害剤を利用する休眠遺伝子活性化法を確立し、数多くの新規天然物の獲得を報告してきた。しかし、開発されてきた多くの休眠遺伝子活性化法は、限定的な生合成遺伝子クラスターに由来する二次代謝物の獲得しかできず、未だ、膨大な数の休眠遺伝子が利用されずに残っている。そこで、本研究では、一つの手法で、多様な休眠遺伝子の活性化を実現できる方法の確立を目指した。

特許出願中のため、詳細な記載は控えるが、大規模ゲノム再編成技術を糸状菌に適用することで、多様な形質変化株を作製に成功し、また、二次代謝プロファイルの異なる複数の株の取得に成功した。本研究により、本手法が、多様な休眠遺伝子の活性化を実現し、多様な休眠型二次代謝物の獲得を可能にする手法になることが期待される結果を得た。

病原微生物の侵襲進化の解明と新規天然物の探索

荒井 緑 (慶應義塾大学理工学部)

放線菌や真菌には多くの休眠遺伝子が存在しており、それらを活性化して新規天然物を得ようと世界で試みられている。そのような中、我々は病原微生物が受ける一つのストレスに気がついた。それは、病原微生物が生体内に侵入した際に受ける免疫排除のストレスである。そこで、疑似感染状態を作り出すべく、病原微生物とマクロファージ細胞との共培養を行ったところ、共培養特異的に出現するあるいは生産が増強する化合物を見いだすことに成功した。本手法は新規天然物を得るための新規手法である。着目したのは千葉大学真菌医学研究センターが保有する、臨床検体から分離された病原放線菌 *Nocardia* 属および病原真菌 *Aspergillus* 属である。これらを動物細胞（マクロファージ様細胞株等）と共培養することで、新規天然物を単離・構造決定した。興味深いことにそのうちのいくつかの化合物は、NO 産生阻害など免疫抑制作用を示した。このことは、病原菌が免疫作用を抑えようと免疫抑制化合物を生産したとも捉えられる。現在、病原真菌に加え、麹菌、耐熱真菌や乳酸菌との共培養も行っており、興味深い結果を得ており発表で紹介したい。

ヒト病原性真菌の内在性ストレス応答機構を活用した神経変性疾患治療薬開発のための新規戦略

小菅 康弘 (日本大学薬学部)

小胞体機能の不全により生じる小胞体ストレスは、脳梗塞、パーキンソン病やアルツハイマー病などで認められる神経細胞死に関与することが報告されている。これまでに、我々は、病原菌や分解菌として知られる糸状菌を標的とした二次代謝産物の探索研究を行っている。本研究では、マウス海馬由来神経様細胞の HT22 を用いて、神経細胞保護作用を有する代謝産物の探索を行った。

試料は、菌株をブドウ糖ペプトン培地、ポテトデキストロース培地もしくはジクロラン・グリセロール培地で振盪培養した培養液を酢酸エチル抽出し、乾固したものをジメチルスルホキシドに溶解した。小胞体ストレスの誘導薬であるツニカマイシンの曝露により、HT22 細胞で生じる細胞死に及ぼす影響を検討した。その結果、Hirose & Watanabe により新種記載された *Mariannaea imbricata* NUH319 の代謝産物に細胞死抑制効果が認められた。その成分探索を行ったところ、4 種類の新規化合物が単離され、そのひとつが細胞保護作用を示した。以上より、我々が保有する糸状菌二次代謝産物ライブラリは、有用な生物活性を持つ新規化合物を含有することから、小胞体ストレスが関与する神経変性疾患の新たな治療薬開発ツールとなることが期待される。

細菌性血管新生因子 BafA の社会実装を目指した高活性オルソログ探索ならびに活性部位の特定

塚本 健太郎 (藤田医科大学医学部)

バルトネラ属細菌はヒトに感染すると血管新生を惹起し、血管増殖性病変を形成する。この病態形成の責任因子として申請者は最近、菌から分泌されるタンパク質性因子 BafA を発見した。BafA はヒトの血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体に作用して血管新生シグナルを活性化させる。血管新生因子は血管研究をはじめ、創傷治癒・心筋梗塞など虚血性疾患への適用、再生医療での臓器構築等様々な用途で用いられる。本研究では、BafA の実用化・社会実装に向け、より高活性な BafA オルソログの探索と活性に必須な最小領域の特定を目的とした。

ゲノム配列情報が得られたバルトネラ属細菌 28 種類について、BafA オルソログを組換えタンパク質として精製し、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞増殖促進活性を調べた。その結果、BafA オルソログは菌種ごとに活性や構造安定性が異なることがわかった。さらにそれらの配列を組み合わせ、VEGF よりも高活性な BafA 変異体を作成することに成功した。また、活性部位について欠失変異体を用いて検討した結果、BafA の少なくとも N 末端 100 残基と C 末端領域にある約 20 残基は活性に必須であることがわかった。

黄麹菌における光遺伝学的手法を用いたメンブレンレスオルガネラ形成による有用物質生産

樋口 裕次郎 (九州大学大学院農学研究院)

微生物による有用物質生産においては、必要な酵素群を細胞内で高発現させる戦略が多く用いられる。しかし、複数段階の酵素反応の場合、中間代謝物が次反応の酵素と空間的に効率良く反応できず、目的産物が多く得られないケースが考えられる。そこで本研究では、黄麹菌における有用物質高生産を目指し、層分離して形成されるメンブレンレスオルガネラによって各酵素群を空間的に近接させるための光遺伝学の導入を目的とした。

高い抗酸化活性を有するエルゴチオネイン (EGT) の推定合成酵素である AoEgtA/B/C の N 末端および C 末端に緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合発現する黄麹菌株をそれぞれ作製し、蛍光顕微鏡による局在解析を行った。その結果、AoEgtA により細胞質で中間体が生成され、AoEgtB 及び AoEgtC によって EGT がドット様構造において生成される可能性が示唆された。さらに、黄麹菌において光遺伝学的手法の一つである CRY2-CIBN システムの導入に成功した。今後は黄麹菌細胞において RNA 相分離を含めたメンブレンレスオルガネラ形成によって、有用物質生産のさらなる向上を目指した研究の展開が期待される。

嫌気性ベンゼン分解菌の分解力を引き出す：「本当に現場で分解する」菌を目指して

水口 千穂（東京大学大学院農学生命科学研究科）

Azoarcus sp. DN11 株は好気・嫌気の両環境下でベンゼンを分解する。過去の研究から、DN11 株は嫌気条件でベンゼンをフェノールに変換し、フェノールの嫌気性代謝経路で分解を進めることが示唆されていた。しかし ^{18}O 標識水を使用しても ^{18}O 標識フェノールの生成が確認できなかったことから、フェノールへの変換反応に分子状酸素が関与する可能性が考えられた。そこで本研究では (1) 硝酸還元条件において脱窒過程で酸素が発生する可能性、(2) 培地から除ききれなかった溶存酸素が使用される可能性、について検証を行った。(1) について、培地中の硝酸塩濃度を上昇させると DN11 株のベンゼン分解力は上昇したものの、 ^{18}O 標識亜硝酸塩を添加した際には ^{18}O 標識フェノールの生成は確認できなかった。一方 (2) に関連して、培地に添加する還元剤の濃度を上昇させると DN11 株のベンゼン分解力は低下した。以上より、酸素の由来は (2) の可能性が高いと考えられた。実際の汚染現場では、酸素への暴露を恐れず DN11 株を培養し嫌気環境下へ投入することで、前培養液中に残存する酸素によりベンゼンからフェノールへの変換が起り、その後は曝気せずとも嫌気性代謝経路でフェノールの分解が進むと期待される。

一般研究助成報告 … P-34

ニトリルゴムのバイオリサイクル法の開発

杉森 大助（福島大学理工学群共生システム理工学類）

ニトリルゴム (NBR) は、オイルシールや使い捨てグローブなど世界中で広く利用されている。製造時の端材および使用済み NBR のほとんどが焼却処分されており、有効なリサイクル方法の開発が望まれている。本研究では、NBR のバイオリサイクル法の開発を目指し、NBR 分解菌の探索および NBR の酵素分解メカニズム解明を目的とした。NBR 分解菌の同定、ゲノム解析、RNA seq 解析、酵素反応生成物分析等を行った結果、NBR 分解酵素は細胞膜画分に局在し、天然ゴム酸化酵素とは類似性が極めて低く、MPAB_Lcp_cat domain-containing protein と高い類似性があることがわかった。NBR の酵素分解生成物として、気相から有用物質 X が、水相からは 1 あるいは 2 個の酸素原子を含む NBR オリゴマーと予想される化合物が検出された。以上の結果から、取得した NBR 分解菌はブタジエンユニットとアクリロニトリルユニット (AN) 間の C-C 結合を主に酸化分解し、AN が脱離、その際生じたラジカルが再結合することによって AN 含量が減少したと考えられる。

ポリエチレンテレフタレート分解微生物・酵素の探索

飯塚 怜（東京大学大学院理学系研究科）

近年、様々な環境からポリエチレンテレフタレート（PET）を分解する酵素が発見され、PETのケミカルリサイクルへの応用が期待されている。PETを効率よく分解するには、そのガラス転移温度（65–70°C）以上で安定かつ活性を示す酵素が必要である。本研究では、新たな耐熱性PET分解酵素を取得することを目的とした。高いPET分解能を示す酵素の多くは、堆肥由来の好熱性放線菌のクチナーゼである。そこで、高温発酵堆肥より抽出したメタゲノムを鋳型にし、好熱性放線菌のクチナーゼ遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いてPCRを行った。得られた増幅産物をクローニングし、32種類の候補遺伝子を得た。いずれの遺伝子産物も、好熱性放線菌（*Thermobifida* 属細菌、*Actinomadura* 属細菌、*Thermoanaerobacterales* 目細菌）のクチナーゼ、エステラーゼなどと高い相同性（ $\geq 84\%$ ）を示した。各遺伝子は大腸菌で組換え発現させ、26種類のタンパク質を可溶性画分に発現させることに成功した。当日は、各遺伝子産物のPET分解活性について報告する。

水環境中の多様な捕食性細菌による捕食特性の解明とその持続的なウキクサバイオマス高効率生産への応用

井上 大介（大阪大学大学院工学研究科）

ウキクサ科植物は水質浄化と資源生産の両面で有望な水生植物であるが、その成長は共生細菌群集に大きく依存している。本研究では、他の細菌を溶解し、細胞成分を栄養源として生育する捕食性細菌を活用した細菌群集制御に基づく持続的かつ効率的なウキクサバイオマス生産の実現を目指し、水環境中に生息する捕食性細菌を取得し、ウキクサ共生細菌群集の改変効果について検討した。池水や汚泥から捕食性細菌の分離を試みた結果、偏性捕食性細菌4株（*Bdellovibrio*、*Bacteriovorax*）及び通性捕食性細菌5株（いずれも *Myxococcota*）の分離に成功した。分離菌株の中で、捕食可能な細菌種はグラム陰性菌に限られるものの、捕食速度・強度に優れる偏性捕食性細菌 *Bacteriovorax* sp. HI3 を用い、コウキクサ共生細菌群集の改変について検討した結果、HI3株がウキクサ表面で特定の細菌種を選択的に捕食することで共生細菌群集が別の安定形にシフトすることが見出された。本研究により、捕食性細菌を Population Modifier として活用し、ウキクサ共生細菌群集を制御可能であることが示された。

Aureobasidium pullulans の細胞壁構造から超高分子 β - グルカンの分泌機構を学ぶ

東 雅之 (大阪公立大学大学院工学研究科)

Saccharomyces cerevisiae の β -1,3- グルカンは細胞内の UDP- グルコースを基質とし細胞膜酵素 FKS1 によって合成され、細胞壁の GAS1 蛋白質等の作用によって細胞壁に局在する。変異株で僅かな β -1, 3- グルカンの分泌が報告されているがほとんど分泌されない。 β -1,3- グルカンは自然免疫活性化作用が知られおり、*S. cerevisiae* で β -1,3- グルカンを分泌できれば発酵食品への機能付与に繋がりその意義は大きい。一方、*Aureobasidium pullulans* は FKS1 と相同な酵素による β -1,3- グルカン合成が推定されているが β - グルカンを大量に分泌する。本研究では、*A. pullulans* の β - グルカン分泌機構の理解から *S. cerevisiae* の β -1,3- グルカン分泌株構築に役立つ情報を得ることを目的とした。これまでに、生化学的な解析から *A. pullulans* と *S. cerevisiae* の細胞壁構造の違いを明らかにした。また、 β - グルカン分泌量を高めるアスコルビン酸の添加による遺伝子発現量の変化から β - グルカン分泌に関与する遺伝子を推定した。

α - アミノ酸の二量化による有用芳香族複素環化合物の創製

榊尾 俊介 (筑波大学生命環境系微生物サステイナビリティ研究センター)

ピラジンは医農薬、香料、化成品原料として利用される含窒素芳香族複素環化合物である。これまで我々は、 α - アミノ酸からピラジン化合物を生産する新規な生合成経路を明らかとした。本生合成経路の PapD は、 α - アミノ酸の 4- アミノフェニルアラニン (4APhe) からピラジン前駆体のアミノケトンを生成する。本研究では、 α - アミノ酸を原料とした多様なピラジン生産系の構築を目指し、PapD の基質特異性の改変に取り組んだ。PapD 変異体のハイスループットスクリーニングを実施するため、water in oil in water (W/O/W) ドロップレットの作製法を開発した。独自に設計したマイクロデバイスをを用いて、直径 $\sim 20 \mu\text{m}$ の W/O/W ドロップレットを安定的に作製することに成功した。ドロップレット内に大腸菌 1 細胞を封入し、液滴内で大腸菌が増殖することを確認した。PapD の三次元構造予測モデルと、4APhe のドッキングシミュレーションにより、基質認識に重要なアミノ酸残基を特定した。基質認識部位とその周辺をターゲットとした PapD への変異導入とハイスループットスクリーニングが実施可能となった。

腸内細菌が産生する芳香族アミノ酸による腸管病原菌の感染制御

西山 啓太（慶應義塾大学医学部、現 東北大学大学院農学研究科）

腸管病原菌の多剤耐性化は脅威であり、医療現場における腸管感染症の制御は重要な課題である。多剤耐性菌の対応策の一つに、健常者の便移植療法の有効性が知られる。これは、腸内細菌叢がもつ外来細菌への抵抗性を利用し、多剤耐性菌の腸管定着を排除するものである。このように、多様な細菌から構成される腸内細菌叢は、その均衡性を維持するための共生機構、すなわち colonization resistance を持つ。本研究では、腸内細菌の共生関係を司る芳香族アミノ酸 PPA の抗菌作用を利用し、腸管病原菌に対する感染予防を目的とした。

PPA は腸内細菌科細菌の生育を顕著に抑制した。この抑制機序は、PPA が細胞膜透過性を高め、細胞内 pH が低下したことが考えられた。また、PPA 産生にかかわる細菌として、既知の *Clostridium* に加え、*Bacteroides* と *Lactobacillus* の共代謝により PPA が産生されることが明らかとなった。さらに、PPA 産生菌は、マウスにおける *Salmonella* 感染菌数を顕著に抑制した。以上より、腸内細菌が産生する芳香族アミノ酸による病原菌の感染制御の有用性が期待される。

日本人の腸内に特異な酢酸生成菌の多様性解析および新規分離株の取得

山田 千早（東京大学大学院農学生命科学研究科、現 明治大学農学部）

腸内フローラとヒトの健康との関連性が注目を浴びているが、その形成機構には不明な点が多い。嫌気的な腸内において糖などの発酵により発生する水素は主に酢酸生成菌・メタン生成菌により消費され、そのどちらが優占するのには個人差がある。特に日本人では酢酸生成菌が優占する傾向にあり、その健康・長寿との関連が期待されている。しかしこれまでにヒト腸内酢酸生成菌として分離され詳細に研究されている例は少なく、腸内における酢酸生成菌の多様性、生理生態、健康への影響は不明な点が多い。本研究では、日本人の糞便サンプルを対象とした酢酸生成菌の機能遺伝子解析、集積・分離培養により、腸内における酢酸生成菌の多様性を解明し新規分離株を取得することを目指した。集積培養方法として、低水素供給培養システム（Kato S. et al., *Sci. Rep.*, 2020）を利用し、より実環境に近い条件下で酢酸生成菌の集積培養を試みた。コントロールとして、高水素条件にてそれぞれ集積を行ない、メタ 16S rRNA 遺伝子解析の比較を行なった。また、糞便 DNA から酢酸生成菌に特徴的な ACS と FTHFS 遺伝子多様性の解析を行なったので報告する。

国内における外生菌根性担子菌類 *Tomentella* 属の分類学的研究と分離培養法の確立による菌株拡充

早乙女 梢（鳥取大学農学部）

広義 *Tomentella* 属菌は汎世界的に分布し、外生菌根性樹種のみでなく草本類とも共生する担子菌類である。NCBI データベースには約 9,000 を超える本属菌の DNA 配列が登録されるが、ほぼ菌根由来で、子実体の形態的特徴から種同定された DNA 配列は少数である。Index Fungorum には、広義 *Tomentella* 属種として、200 種以上が登録されるが、日本既報告種は 4 種と少数で、日本産本属菌の分類学的研究は未着手に近い。そこで、国内に分布する広義 *Tomentella* 属の種構成を明らかにすることを目指し、子実体（標本）を収集し、分類学的検討を行った。また、本属菌が難培養性であるため、菌株保存機関が提供可能な菌株が限られることを踏まえ、多孢子分離法による菌株拡充も試みた。結果、国内各地より 55 標本を採集した。ITS および LSU 領域に基づく分子系統解析と形態的特徴の検討により、これらは 32 系統に分割し、日本既報告種 2 種や日本新産報告種 4 種が含まれること明らかにした。また、本属および類似属の *Pseudotomentella* 属種も含め、6 菌株の培養株の取得に成功した。

細菌のセカンダリータンパク質分泌モーター SecDF の活性状態の構造の基盤

塚崎 智也（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域）

細菌は、ペットボトルを分解する酵素やベロ毒素など様々なタンパク質を細胞外へと分泌する。この分泌過程は Sec タンパク質群が担っている。膜タンパク質 SecY、SecE、SecG から構成される SecYEG 複合体がタンパク質膜透過チャンネルを形成し、2つのモータータンパク質が関与する。1つは細胞質に存在する SecA ATPase であり、もう1つが膜タンパク質 SecDF（プロトン駆動のモーター）である。SecDF は SecYEG と相互作用することではじめてモータータンパク質として機能するとされているが、その詳細は SecDF と SecYEG の複合体の構造報告がないため不明である。また、SecDF がどのように基質タンパク質認識しているのかについても不明である。本研究では、SecDF を含む膜タンパク質の複合体の構造解析を達成すべく研究を進めるとともに、SecDF の基質との相互作用を明らかとすべく生化学的解析を進めた。本発表では、最新の SecDF によるタンパク質分泌過程モデルを紹介し、本研究の進行状況を紹介する。

出芽酵母におけるリボソーム品質管理の分子機構

北島 真 (京都大学医生物学研究所)

真核生物のリボソームは、4本のrRNAと約80個のタンパク質が精巧に組み合わさり構築される巨大複合体である。このうち重要な構造はrRNAにより担われていることが分かっている。これらのrRNAの重要塩基に変異が入るとリボソームの活性は失われるが、このような「機能不全リボソーム」は細胞内ですみやかに分解を受けることが分かっている。本研究ではペプチド結合形成の起こらない25S rRNA変異体が分解される分子機構を分子遺伝学と生化学を用いて解明することを目的とした。

変異25S rRNAを含む60S粒子が分解に先立ってユビキチン化を受けること、この段階にMms1-Rtt101といった因子を含むE3リガーゼ複合体が必要であることが分かっていた。本研究ではこの経路に関与する因子として機能未知であった新規因子を見出した。この因子はC末を介して機能不全変異25S rRNAを含む異常60S上に結合しており、N末を介してE3複合体に結合することで60Sの選択的ユビキチン化を誘導することが明らかになった。N末における重要なセリンリン酸化の発見など、明らかになった多くの知見から全体のモデルを議論したい。

植物病原細菌が感染植物組織中に形成するバイオフィーム高次構造と植物病原性との相関解析

別役 重之 (筑波大学生命環境系微生物サステナビリティ研究センター、現 龍谷大学農学部)

近年、植物病原細菌の病原性発揮機構に関する遺伝学的・生化学的理解が深まっている。一方、環境中の細菌はしばしばバイオフィーム(BF)と呼ばれる機能分化した集合体として存在するが、植物病原細菌の病原性とBF形成の関連はよくわかっていない。そこで本研究では、蛍光タンパク質を常発現する*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000株(*Pst*)とシロイヌナズナを用いて、蛍光*Pst*株の植物体への感染過程を経時的に捉える実験系を開発した。その結果、葉組織への菌懸濁液注入接種と、自然感染を模した表面接種とでは、生じたBF様集合体形態やその拡大様式が異なることを見出した。また、*Pst*が生産する植物毒素コロナチンの合成遺伝子*cmaD*、*cfl*のプロモーター活性可視化株を用いて、葉内部のBF様集合体内では、いずれも一部の*Pst*細胞のみが強い活性を示していること、そしてその部位が接種法により異なることを見出した。以上より、*Pst*は感染経路によって形態や質の異なるBFを形成することが示唆された。現在、BF内でのコロナチン合成活性の偏り・不均一性と植物病原性の関連を調査中である。

氷河微生物の地球規模での地域比較と寒冷適応戦略の解明

瀬川 高弘（山梨大学総合分析実験センター）

極地や高山に分布する氷河には、寒冷環境に適応したシアノバクテリアや藻類などの光合成生物、従属栄養細菌などの微生物が生息している。しかし、氷河微生物の生理機能や系統的多様性、さらに地域多様性に関する知見はほとんど知られていないのが現状である。そこで本研究では、氷河微生物群集のメタゲノム情報を幅広い地域の氷河から収集して解析した。その結果、細菌群集の系統や機能遺伝子組成が、地域ごと、特に北極域とアジア山岳域の氷河とで大きく異なることが判明した。また、主要構成種であるシアノバクテリアの組成にも差異が見られ、緑色光アンテナタンパク質の遺伝子を有するシアノバクテリア種はアジア域から顕著に検出された。さらに、広域の雪氷圏に生息している雪氷藻類 *Raphidonema* 属の分子進化解析をおこなった。その結果、地域固有のエンデミック系統は、広域に分布するコスモポリタン系統から派生したことが明らかとなった。本研究により、微生物の地理系統と分散過程、自然環境下における微小進化による微生物群集形成の理解が促進されるとともに、氷河生態系構造の実態解明を進める上で重要な知見が得られた。

適応育種的変異を利用した酢酸菌セルロース合成酵素変異体の作成とそのセルロース合成能の解析

松谷 峰之介（東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）

セルロースは植物や細菌によって生成され、細菌が生成するものはバクテリオセルロース（BC）と呼ばれ、高い強度で生体適合性も高いため医療への応用が期待される。一部の酢酸菌はBCを生成するが、その合成能は、振とう培養によりセルロース合成オペロン（*bcs*）への変異を伴って消失し、反対に静置培養によって変異を伴って復帰する。その結果、BCの大量生産株や微細繊維BCを産生可能な株が得られている。本研究では、BCを生成する *Komagataeibacter oboediens* MSKU3 株について、多数のセルロース非生産株と、そこからさらに得られた復帰株を取得し有用復帰変異を探索することを目的とした。MSKU3 株の振とうによる継代培養によってセルロース非生産株を多数取得した。ゲノムリシーケンスの結果から、非生産株の *bcs* には重複を除いた21株のすべてで何らかの変異が生じていた。これら非生産株からの復帰変異株の取得を目的として、静置条件により継代培養を行った結果、1塩基挿入によるフレームシフト変異が生じていた3株から、それぞれ1株の復帰変異株が得られた。現在、復帰変異株の取得に最適な条件を検討中である。

要旨 (若手研究者助成)

医療施設で分離される *P. putida* グループ新菌種の分類とサブグループ形成関連因子の検索

遠矢 真理 (順天堂大学大学院医学研究科)

Pseudomonas 属菌は、系統分類学的に 14 のグループに分類され、*P. aeruginosa* グループや *P. putida* グループ等があり、ヒト、動物、土壌および環境サンプルから分離される。私たちは、医療施設で *Pseudomonas* と分離・同定された 42 菌株について解析を行った。

各菌株から DNA を抽出し、次世代シーケンサーで全ゲノム配列を決定した。全ゲノム配列を用いた解析によって菌種同定を行った。42 株中 30 株は 14 の既存菌種に分類されたが、残り 12 株は既存菌種に分類されない同定不能株であった。この 12 株は、全ゲノム解析により 9 種類の新菌種に属していることが明らかとなった。さらに、既存菌種である *P. protegens* と *P. lactis* と再同定された株は、菌種特異的にコリスチンに対して耐性であることを見出した。

本研究から、緑膿菌以外の *Pseudomonas* 属の菌種分類は不完全であり、これまで *P. putida* や *P. fluorescens* と同定されていた菌株の疫学を見直す必要があること、さらに菌種特異的に薬剤耐性を示す菌種が存在することが明らかとなった。以上から *Pseudomonas* 属菌株の全ゲノム配列を基にした更なる疫学調査が必要であることが示唆された。

同型配偶子生殖を行う単細胞性緑藻クラミドモナスを用いた葉緑体母性遺伝の分子機構の解析

小林 優介 (茨城大学大学院理工学研究科)

葉緑体やミトコンドリアには独自のゲノム DNA (オルガネラ DNA) が存在し、それらはメンデルの遺伝法則から逸脱し、雌親からのみ子孫に遺伝する (母性遺伝)。母性遺伝は多くの真核生物において、配偶子が接合するとすぐに雄由来のオルガネラ DNA が選択的に分解されることで引き起こされる。しかし、雄由来のオルガネラ DNA を選択的に分解し、そして雌由来のものを分解から保護する分子機構はあまり理解されていない。本研究は、同じ大きさの配偶子 (同型配偶子) で生殖を行う緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を材料として、母性遺伝の分子機構の解明に挑んだ。その結果、葉緑体 DNA が父性遺伝する変異体を作成することに成功し、さらに当該遺伝子がコードするタンパク質に DNA 結合性があることがわかった。興味深いことに、この遺伝子は両性のゲノムにコードされているが、雌ゲノムからのみ発現し、雄ゲノムからの発現は見られなかった。つまり母性遺伝には、このタンパク質が雌から発現することが重要であり、さらにその発現はエピジェネティックに制御されていると考えられる。

遊離脂肪酸を介した細菌間コミュニケーションによる環境応答機構の解明

神保 晴彦（東京大学大学院総合文化研究科）

シアノバクテリアや大腸菌、黄色ブドウ球菌など多くのバクテリアは、膜脂質から切り出した遊離脂肪酸（FFA）を細胞外に放出したり、細胞外の FFA を取り込んだりすることがわかっているが、これらにどのような生物学的意義があるのかは明らかではない。本研究から、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 および *Synechococcus elongatus* PCC 7942 は、強光ストレス下で特にパルミトレイン酸 (16:1) の放出が高まることが明らかとなった。FFA を ACP 化する酵素であるアシル ACP 合成酵素 (Aas) の変異株においては、16:1 以外の FFA の放出が増加した。また、これらのシアノバクテリア株は、16:1 に対して、生育や光合成活性が耐性示したが、大腸菌株は、16:1 に対して、生育が感受性を示した。本研究から、シアノバクテリアによる 16:1 を細胞外に放出することで、16:1 感受性を持つ細菌の生育を抑制し、シアノバクテリアが優位に生育できるという競争戦略が示唆された。また、16:1 によってシアノバクテリアの生育を促し、環境中から特異的に単離する技術も考えられる。

地衣化菌が共生藻を認識する仕組みに関する研究

升本 宙（筑波大学山岳科学センター、現 京都大学大学院地球環境学堂）

菌類－藻類間の地衣共生において、両者が互いをどのように認識し、共生を成立させるのか、その機構は未だ謎に包まれている。本研究では、地衣共生機構の解明に向けた研究の一環として、地衣化菌の *Multiclavula mucida*（以下 Mm）とその共生藻である緑藻の *Elliptochloris subsphaerica*（以下 Esub）の地衣共生系を研究対象に選定した。そして、①本来の共生の組み合わせである「Mm と Esub」、②本来の共生藻の同属別種の藻類を相手とした「Mm と *Elliptochloris* sp.」、③本来の共生藻の姉妹属を相手とした「Mm と *Coccomyxa* sp.」の 3 通りの共培養、並びに、④同一培養条件下での「Mm のみ」の単独培養を実施し、各培養条件下での Mm の遺伝子発現を RNA-seq で網羅的に解析し、共生成立時に発現量に差のある遺伝子を地衣共生に関与する可能性があるものとして抽出した。共培養実験の結果、①では共生が安定的に成立し、②では共生が部分的に成立し、③では共生は成立しなかった。共生成立時には、GPR1/FUN34/YaaH family protein の遺伝子発現が顕著に上昇し、また、GAL4 様転写因子や MFS 型輸送体、リシン B 鎖様レクチン、推定低分子量分泌タンパク質などの遺伝子発現も上昇した。今後、これらの遺伝子に注目した機能解析が行われることにより、地衣共生機構の解明がより進展すると期待される。

盗葉緑体生物群から探る葉緑体獲得進化の共通原理の解明

大沼 亮（神戸大学内海域環境教育研究センター）

藻類は捕食栄養性だった祖先種と取り込んだ光合成性生物との細胞内共生によって誕生したとされる。しかし、捕食栄養性から細胞内共生を経て藻類化する進化過程には不明な点が多い。本研究は真の葉緑体を獲得する前の進化段階であると考えられる盗葉緑体性渦鞭毛藻類 *Nusuttodinium* spp. を主な対象とし、葉緑体を一時的に維持する機構を解明することを目的とした。明暗に応じたトランスクリプトーム解析の結果、捕食に近い盗葉緑体现象を示す *N. poecilochroum* は硝酸輸送体、硝酸還元酵素の遺伝子群が発現していないのに対し、真の葉緑体に近い現象を示す *N. aeruginosum* ではそれらの遺伝子群が明期で発現上昇することがわかった。さらに、後者の硝酸還元酵素はクリプト藻からの水平転移によって獲得されたものであり、細胞外の窒素源応じて発現が変動することも明らかとなった。また、盗葉緑体性ユーグレナ *Rapaza viridis* でも宿主が硝酸還元酵素を持っており、硝酸同化に重要であることがわかった。これらから、現生の藻類が持つ硝酸同化能は、盗葉緑体性の生物でも獲得しうることが示唆された。

植物病原細菌の感染プロセスに重要なホスファチジルコリン生合成機構の構造基盤解明

渡邊 康紀（山形大学理学部）

植物病原菌 *Agrobacterium tumefaciens* 等、一部の細菌は生体膜中にホスファチジルコリン (PC) を含んでおり、PC の合成は *A. tumefaciens* の植物への感染に重要であることが知られている。PC は、ホスファチジルエタノールアミン (PE) から S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体とした三段階のメチル化反応によって生合成される。リン脂質メチル基転移酵素 PmtA が PE のメチル化反応を担うが、詳細な PC 生合成機構は明らかになっていない。そこで本研究では、構造生物学的手法を用いて PmtA による PC 生合成機構の解明をめざした。

A. tumefaciens 由来 PmtA と、SAM からメチル基が脱離した S-アデノシルホモシステイン (SAH) との共結晶を得ることに成功し、その結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定した。PmtA はロスマンフォールドを形成しており、そのフォールド中の溝に SAH が結合していた。NMR 法を用いた滴定実験および結晶構造に基づいた変異実験から SAM の認識に重要なアミノ酸残基を同定した。PE の最初の二段階のメチル化反応のみ触媒する根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* 由来 PmtA との比較から、両者の基質特異性の違いに起因するアミノ酸残基を同定した。

マウス腸内細菌におけるゲノム進化速度の解明

高安 伶奈（東京大学大学院医学系研究科）

一日にヒト腸内細菌で起こりうるゲノム変異は実に 10^9 乗～ 10^{12} 乗とも試算されている。腸内細菌は今も宿主とともに共進化していると考えられているが、腸内細菌が実際に腸内で進化している様子を時系列で追った研究はまだ非常に少なく、一生の中でどのような菌が、どのくらいの速さで、どのような宿主の行動に紐付いて変化していくのか、その実態はほとんどわかっていない。

われわれは2年半以上にわたり、マウスが生まれてから死ぬまで一生にわたる腸内細菌をサンプリングし、腸内細菌種の動的変化が様々なライフイベントに関連することを発見してきた。今回、ロングリード (PacBio Sequel II) と、ショートリード (Illumina Novaseq 6000 system) のシーケンス技術を組み合わせた最新のメタゲノム解析により、細菌株レベルのゲノム比較を行うことが可能となった。これらの解析から、菌の増殖速度が一生の各時期によって異なること、増殖が増えるタイミングで多くの変異が出てくること、宿主の一生にわたって細菌ゲノムが受ける1塩基変異は数千-数万のオーダーであること、エラーが入りやすい遺伝子領域はゲノム上で島状にまとまって存在していること、などが示唆された。

要旨 (寄付講座助成・中間報告)

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、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。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]

うま味を呈する核酸であるイノシン酸 (IMP) を直接発酵生産する微生物 *Corynebacterium stationis* の IMP 排出膜輸送タンパク質、ラン藻チラコイド膜のイオンチャンネルの機能について最先端の手法で解析した。

[結果・考察]

C. stationis の IMP 排出膜輸送タンパク質遺伝子を同定した。推定アミノ酸配列から当該タンパク質は major facilitator superfamily (MFS) に属する H^+ と薬剤を対向輸送する多剤排出膜輸送タンパク質と考えられた。IMP 生産菌の当該タンパク質に、その活性を向上させるアミノ酸置換を見出した。これは、MFS に属する多剤排出膜輸送タンパク質において、初めて同定された活性向上アミノ酸置換である。AlphaFold2 で予測した構造を用いた全原子 MD シミュレーションの結果、当該アミノ酸置換によって、置換残基を含む N 末側 -bundle を構成する膜貫通ヘリックス間の相互作用が強化され、この相互作用は IMP の結合でさらに強化されることが示された。膜輸送タンパク質は輸送の過程で構造を大きく変えるが、N 末側 -, C 末側 -bundle は輸送前後で構造を保つと考えられている。前記置換による N 末側 -bundle の構造安定化が、内向きから外向きへの全体構造変化の効率化を通じて高排出活性化に寄与すると考察している。

ラン藻の SH1024 はシロイヌナズナのチラコイド膜に発現して強光ストレス耐性に寄与する陰イオンチャンネル AtVCCN1 のホモログである。しかし、 K^+ 取り込み能を欠損させた *E. coli* での当該遺伝子発現が当該 *E. coli* の低濃度 K^+ での生育を相補したこと、陽イオン選択への関与が推定されるアミノ酸残基の置換によって相補能が失われたことから、SH1024 は陽イオンチャンネルであることが強く示唆された。

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

河内 護之（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]

一般に糸状菌の細胞表面疎水性には両親媒性分泌タンパク質ハイドロフォビン（HP）が関与すると考えられている。しかしながら、トウモロコシごま葉枯病菌における HP 遺伝子の完全欠損株および *NPS4* (non-ribosomal peptide synthase 4) 遺伝子変異株の解析から、本菌における細胞の表面疎水性は、HP よりむしろ環状ペプチド化合物依存的事であることが示唆された。また昨年度同定した本菌における細胞外マトリクス（ECM）合成に関与する 2 種の遺伝子解析から、本菌の ECM はグルコースを主体とする糖鎖から構成され、細胞表層近傍で合成されることが示唆された。担子菌ヒラタケの細胞壁構成多糖の解析から、ヒラタケの細胞壁は表層が β -グルカン、内層が α -グルカンで構成されており、表層に α -グルカン、内層に β -グルカンが分布するとされる子囊菌 *Aspergillus* 属とは、細胞壁における糖鎖の空間配置が異なることが明らかになった。また、ヒラタケと *Aspergillus* 属では細胞壁中のキチンやグルカン等の糖鎖組成も異なっていた。したがって、子囊菌と担子菌で細胞壁の構造が大きく異なることが示唆された。

全ゲノム塩基配列に基づく酵母の高次分類体系の再構築および発酵・醸造に重要な酵母のタイピングに応用できる高解像度の実用的同定識別システムの確立と応用

高島 昌子（東京農業大学総合研究所酵母多様性生物学・分類学研究室）

[背景・目的]

ゲノム解析データの増加や解析技術の発展により、ゲノム情報を用いた高品質な基幹系統樹の作成が菌類においても進行している。並行して分類体系の更新を推進するには、ゲノム情報を分類にうまく取り入れ、従前の技術と融合させていくことが必要不可欠である。本研究では「ゲノムを取り込み、分類のシステムのアップデート」を図ることを目的とする。

[方法・結果・考察]

「テーマ1：ゲノム情報を利用した酵母分類基盤の構築」

先端技術と従来の分類同定技術の融合のため、①ゲノム情報を用いた基幹系統樹作成には、数個の遺伝子において十分な解像度が得られていない分類群を対象に実施する。現在は、Sporidiobolales 目酵母の複数菌株（24 株）でゲノム解析、アセンブリおよびデータ解析を進めている。②種概念への貢献を視野に入れたゲノム情報を用いた種内多様性の解析では、*Cutaneotrichosporon* 属について従来の種の指標とゲノム情報との比較を実施した。③ゲノムオルソログの「ある」「なし」マトリクスを用いた数値分類学的解析では、子嚢菌と担子菌、また子嚢菌内の Pezizomycotina と Saccharomycotina それぞれに特有のオルソログを得た。

「テーマ2：新しい分類方法の開発と検証」

担子菌酵母の多様な核相（核型、核数、核動態）に着目し、① Sporidiobolales 目酵母（33 種 54 株）と Trichosporonales 目酵母（28 種 33 株）の核動態を調べたところ、Sporidiobolales 目ではすべての株が従来の担子菌型の核分裂様式であったのに対し、Trichosporonales 目の 7 種の酵母においては、従来型とは異なる核分裂が観察された。Trichosporonales 目の根付近で遺伝的多型が生じたと推定している。また、菌糸形成機構に着目して② *Trichosporon asahii* の菌糸生長に関わる因子を、貧栄養培地に Yeast nitrogen base 内の各栄養素を分割して加えて細胞を培養し、顕微鏡下で細胞長を測定することにより探索した。その結果、MgSO₄ の添加によって菌糸が生長することを見出した。同様の性質は 30 種の Trichosporonales 目酵母中、10 種でも確認できたため、菌糸型を有する二形成酵母の新たな表現型になると期待される。

