

NUMBER 39

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

# RESEARCH COMMUNICATIONS

**2025**

# RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 39



2 0 2 5

**INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)**

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

*17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME*

*YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN*

# 公益財団法人発酵研究所

理事長	原島 俊	
常務理事	樽井 直樹	
理事	石井 正治 左子 芳彦 林 哲也 松下 一信	石野 良純 鈴木健一朗 原山 重明 横田 篤
監事	下元 高文	藤井 智幸
評議員	五十嵐泰夫 太田 寛行 笹川 千尋 園元 謙二 土屋 英子	大島 敏久 北本 勝ひこ 関 達治 武田 京子 中山 浩次

## 目 次

IFO の益々の発展を祈って .....	関 達治	1
----------------------	------	---

### ■ 2023年度大型研究助成

日本発の網羅的プラスミドデータベースの構築.....	新谷 政己	3
植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明.....	甲斐 建次	19
新規嫌気性アンモニア酸化代謝の遺伝・生化学研究.....	春田 伸	35
ゲノム情報とゲノム編集を用いた実用藻類ツノケイソウの 光エネルギー変換効率の最大化.....	伊福健太郎	43
脱窒細菌の Bet-Hedging 戦略は N <sub>2</sub> O 排出削減に寄与するか？： 進化生物学と環境工学の融合.....	寺田 昭彦	57

### ■ 2019年度寄付講座助成

多様な糸状菌類の固体基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

多様な糸状菌類の固体基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	65
糸状菌の菌糸撥水性発現及びハイドロフォビンの生理機能の多様化 .....	辻 健也, 寺内 裕貴, 河内 護之, 吉見 啓	75
糸状菌の基質及び環境認識に関わる因子の探索とその機能解析 .....	辻 健也, 河内 護之, 吉見 啓	89
糸状菌の細胞壁イメージング及び木材分解酵素の 効率的生産に向けた高密度液体培養の達成 .....	辻 健也, 吉見 啓, 河内 護之	103
白色腐朽菌における細胞壁合成制御系の解明及び その操作によるマッシュルームマテリアルの物性改変 .....	辻 健也, 吉見 啓, 河内 護之	117

## ■ 2023年度一般研究助成

母乳に分泌される乳酸菌の菌株ライブラリーの作製	錫谷 達夫	133
電気化学活性菌の市民参加型大規模スクリーニング	渡邊 一哉	134
全国の醤油醸造蔵から分離される耐塩性乳酸菌のゲノム多様性と菌株保全	和田 崇之	135
発酵食品に棲息する海洋細菌の多様性と系統分類学的研究	石川 森夫	136
日本ワインの自然発酵に関与する酵母の多様性解明と バイオリソース基盤整備	乙黒 美彩	137
スゲ属植物に寄生する日本産さび病菌の DNA バーコードデータベースの構築と多様性の解明	山岡 裕一	138
細胞融合技術を利用した新規バクテリオフェージ単離手法の開発	常田 聡	139
ヒト腸内における有益な難培養 <i>Clostridium</i> 属菌の分離・分類 ～腸内嫌気性菌のバイオリソースの拡充～	阪口 義彦	140
難培養アーキア <i>Candidatus Methanogranum caenicola</i> 共培養系のゲノムおよび培養特性解析	飯野 隆夫	141
ショウジョウバエ体内に存在する酵母叢の多様性解析	清家 泰介	142
難培養性細菌群 <i>Verrucomicrobiota</i> 門細菌をターゲットとした バイオリソース基盤の構築	田中 靖浩	143
大腸菌の炭素源代謝における酵素量と補酵素量の 統合的転写制御機構の解明	島田 友裕	144
病原性細菌の有する接触性増殖阻害蛋白質の反応制御分子機構	富田 耕造	145
小分子抗体を利用したオーキシン依存的タンパク質分解システムの開発	西村 浩平	146
酵母の GPI リモデリングが制御するタンパク質選別輸送機構の解明	船戸 耕一	147
ミトコンドリア分裂の分子機序と生理機能の解明	福田 智行	148
酵母減数分裂期に生じる新規のゲノム変化	篠原 彰	149
新規病原性レンサ球菌の細胞壁構成バリエーションと環境応答	小倉 康平	150
病原性ビブリオ属細菌が保有する CRISPR-associated transposon の機能構造解析	沼田 倫征	151
出芽酵母サイクリンの機能を再考する	田中 誠司	152
単細胞接合藻類の生殖様式進化の遺伝的背景	関本 弘之	153

DnaK シャペロンシステムの機能的ヒエラルキーを規定する 分子基盤の解明	杉本 真也	154
ヒト細菌叢形成に関与する V 型線毛の付着機構の理解と制御	柴田 敏史	155
バクテリア MutS パラログによる翻訳ストレス緩和の分子メカニズム	福井 健二	156
転写アテニュエーションは細菌固有のシステムか?	金井 保	157
黒麹菌が複数の細胞壁 $\alpha$ -グルカンを有する生理的意義の解明	水谷 治	158
ミトコンドリアに眠る機能未知の小さなタンパク質群の網羅的解析	古川健太郎	159
概日リズムの振動を生み出す構造-機能相関の解明	武藤 梨沙	160
グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを介した 真菌型ガラクトマンナンの細胞表層輸送モデルの解明	岡 拓二	161
微細藻類の鞭毛に存在する蛋白質合成系の解明	久保 智広	162
二形性油糧酵母 <i>Yarrowia lipolytica</i> における細胞形態制御に関する研究	福田 良一	163
環状染色体細胞が抱える未知のストレスとその応答機構の解明	田中 克典	164
単細胞生物のマイクロ RNA が制御する生命現象発見への挑戦	山崎 朋人	165
出芽酵母の mRNA 転写において TFIID 依存性を 後天的に付与する分子機構の解明	古久保哲朗	166
マルチモーダル顕微分光で明らかにする葉圏微生物の 光エネルギー利用ポテンシャル	菅野菜々子	167
様々なプラスミドが宿主に与える負荷の実体の解明	野尻 秀昭	168
<i>Bacillus subtilis</i> の膜変形を伴う膜小胞と洞穴の形成機構の解明	橋本 渉	169
麹菌における転写因子の分解を介した分生子形成制御機構の解明	田中 瑞己	170
ミトコンドリア代謝酵素前駆体の誤局在によって誘導される 異所性代謝ストレスの解析	中務 邦雄	171
酵母におけるリボフラビン代謝中間体依存的な メチルグリオキサール耐性機構	那須野 亮	172
クロストリジウム属の葉酸生合成におけるミッシングエンザイムの同定	佐藤 喬章	173
<i>Ruminococcus gnavus</i> の腸管定着機構の遺伝的解析	尾花 望	174
シアノバクテリアに内在する新たな DNA 複製開始機構の解明	大林 龍胆	175
細胞と核のサイズ運動性を制御する膜供給メカニズムの解析	久米 一規	176

新規作用機序を有する抗菌薬の開発 —透過性促進薬の開発に向けた基礎的研究— ……………	永野 恵司	177
吸着槽併設高層型界面ファーマンターの開発： 生物活性二次代謝物の生産への応用……………	小田 忍	178
機械学習を利用した変異導入による可溶性発現の概念の解明……………	松井 大亮	179
蛋白質間相互作用の合理的リデザインによる NRPS 生合成系の 分解および再構築……………	石川 文洋	180
AI 細胞選抜法による変異酵母株の単離 ……………	磯崎 瑛宏	181
フォトグラニュールによる排水処理での エネルギーキャリアとしての炭素循環の最大化……………	日高 平	182
腸内細菌が産生する膜小胞の特性解析とその応用……………	山崎 思乃	183
逆グリオキシル酸経路を利用して高収率に アセチル CoA を供給可能な大腸菌の開発 ……………	戸谷 吉博	184
ノンコーディング RNA の高い転写量と安定性を 利用した大腸菌物質生産法の開発……………	中村美紀子	185
紅色光合成細菌が生産する酵素と光・金属触媒複合系による 二酸化炭素を原料とするプラスチックモノマー合成……………	天尾 豊	186
食用昆虫の肥育における有用細菌の解析……………	後藤 和義	187
線虫共生細菌が生産する微生物シグナル分子の探索とその機能解析……………	今井 優	188
微生物を用いた物質生産能向上を指向した大腸菌における タンパク質過剰発現耐性機構の解明……………	中川 明	189
クオラムセンシングを活用したアナモックス群集形成の 迅速・安定化と温室効果ガス抑制型排水処理法への適用……………	西村 文武	190

#### ■ 2023年度若手研究者助成

日本産 <i>Cytospora</i> 属菌の分類学的再検討および種多様性の解明 ……………	服部友香子	191
「海獣の粘液」を用いた海洋細菌の分離培養技術の構築 ……………	中島 悠	192
二枚貝に生息する新規海洋性マイコプラズマの単離と分類体系の再構築……………	水谷 雪乃	193
新規菌根菌 Fine Root Endophytes の分離によるモデル菌株の確立 ……………	吉野花奈美	194

ムコール症原因真菌における細胞内共生細菌の保有実態と その多様性, および宿主伝搬性の解明	高島 勇介	195
活性硫黄シグナルを考慮した新たなレドックスシグナル伝達概念の構築	清水 隆之	196
ミトコンドリアにおけるタンパク質膜挿入プロセシングの解明	竹田 弘法	197
放線菌—糸状菌間相互作用の理解と物質探索への展開	二宮 章洋	198
肺炎球菌ホスホマイシン耐性に関与するピルビン酸キナーゼの機能解析	田口 厚志	199
ラン藻のクエン酸回路の流れを決める生化学的要因の解明	伊東 昇紀	200
グラム陰性細菌が環境中の鉄を感知する分子メカニズム	横山 達彦	201
iTRAQ 解析を基盤とする肺炎球菌侵襲化機構の解明	平山 悟	202
霊長類の食性に応じたビフィズス菌のユニークな糖代謝機構の解明: ビフィズス菌の適応進化の理解に向けて	佐々木優紀	203
リボソーム RNA を利用した環境適応機構の解明	佐藤 悠	204
<i>Cryptococcus</i> 属真菌の病原性因子「莢膜多糖」の 生合成を担う糖転移酵素の探索	門岡 千尋	205
糸状菌のリン脂質制御を介した気中菌糸形成メカニズムの解明	岩間 亮	206
リグニン由来芳香族化合物への耐性に関わる薬剤排出ポンプの機能解析	樋口 雄大	207
スギヒラタケ由来毒性タンパク質の構造機能解析	鎌田 健一	208

#### ■ 2023年度学会・研究部会助成

日本微生物資源学会における微生物の分類に関する支援活動について	矢口 貴志	209
公益社団法人 日本生物工学会 未培養微生物 (微生物ダークマター) 資源工学研究部会の研究推進活動について (第2報)	青柳 秀紀	211



## IFOの益々の発展を祈って

関 達 治\*

この春から財団法人発酵研究所の理事長に就任されました原島俊大阪大学名誉教授にお祝いを申し上げますとともに、この財団が微生物分野の研究に益々寄与できるように運営されますことをお願いしたいと思います。

原島先生は就任のご挨拶にも書かれていますように、各種学会、団体の運営に寄与されて来ました。その経験を活かした、また研究者の思いに寄り添ったIFO基金の運用を考えていただけると確信しております。

また、今まで財団の運営に献身的に携わっていただいた武田薬品工業出身の中濱一雄前理事長はじめ歴代理事長の並々ならぬご尽力に感謝を申し上げます。特に、いつも研究者の活動に思いを寄せ最適な援助方法を考え頂き、情熱を持って研究者支援をいただいたことに感服、感謝しております。今後とも強力なバックアップをよろしくお願いするところです。

さて、発酵研究所の前身である財団法人航空醗酵研究所が発足したのが1944年で、今年で81年目を迎えますが、私は1943年生まれでほぼ同時代を過ごしたことになります。ただし、私は赤子からスタート、発酵研究所はすでに青年からのスタートだったと思います。この間、サイエンスは大きく進歩しました。特に微生物学を含む生物学は、想像を超える発展を成し遂げたことは、みなさんも認めるところでしょう。

私は大阪大学工学部を受験し、希望学科の一つであった醗酵工学科に合格しました。第一希望ではなかったのですが、入学するか少々迷いました。母方の祖父が「これからは発展するから醗酵工学科に入学しろ」と熱心に薦めてくれました。祖父は1886年に設立された「大阪薬学校」の卒業生で、この薬学校は大阪大学薬学部の源流となっています。また、戦前に武田薬品工業に勤めており、武田薬品工業が十三に工場を造った頃まで勤めていたそうです。工場設置に合わせて阪急電鉄が十三駅を作ったとの本当か嘘かの話をしてくれました。

大阪大学工学部醗酵工学科に入学し教養課程終了後、現在のJR京橋駅近くの東野田にあった工学部キャンパスで大学院修士課程まで過ごしました。その後、前の万国博覧会の近くにできた吹田キャンパスに移りました。当初は工学部の一部と微生物研究所の一部が移転しましたが、泥だらけのキャンパスでした。1968年に醗酵工学科は3講座体制から6講座体制に突如拡充されました。私は照井堯造教授のもとで修士課程を終え博士課程に進学したところでしたが、新進気鋭の微生物遺伝学者である大嶋泰治先生がサントリーから第4講座の助

---

\*関 達治

大阪大学名誉教授、公益財団法人発酵研究所評議員

教授に就任されました。私は、東京大学理学部で博士を取得されたところの東江昭夫先生と一緒に助手に採用されました。東江先生は、大嶋先生と酵母遺伝を、私は助手（当時）の高田信男先生と微生物分類を担当することになりました。そこで、当時、脚光を受け始めたDNA-DNA交雑試験による*Bacillus*属細菌の分類を始めました。菌株の信頼性が重要と考え米国農務省に保管されていた*Bacillus*属の菌株コレクションを使いましたが、米研究者の生物保存に対する考え方に感心しました。これはIFOの皆さんの菌株保存に対する熱意と同じと感じました。

1972年に文部省とユネスコの共同事業としてユネスコ国際微生物大学院研修コースが始まり、中国、韓国を含むアジア諸国から毎年10名の研修生を受け入れる事業が開始されました。1978年には、この事業を推進するために工学部内に附属微生物工学国際交流センターが新設され私はセンターの助手に移管されました。これは私にとって大転換でした。研究分野では全く異なる田口久治教授のもと、吉田敏臣助教授（当時）とコンビを組んで留学生のお世話をしました。この事業は東北大学、東京大学、京都大学、大阪大学、九州大学の5大学の共同事業で、研修生は最初の1ヶ月大阪大学で微生物学一般の研修を受け、その後10ヶ月は5大学で研究に従事するプログラムでした。このプログラムは2003年まで30年間続き459名の研修修了生を送り出しました。東南アジアからの研修生の多くは帰国後それぞれの国で活躍しています。センターは全学組織となり、現在も種々のプログラムを実施してアジア諸国の研究者と交流を続けています。

私は63歳で定年後、大学のバンコク事務所で所長として研究者交流などのお世話をしていましたが、70歳を機に退職しました。私の後半は、前半とは全く異なった人生でしたが色々な国に滞在し、色々な人と交流をもち、また一味違った人生でした。

さて、私の経歴書のような散文になりましたが、日本が世界の中で生きていくには、日本の存在を如何に世界に示すかが重要なことと考えます。幸い生物工学分野の研究、実用の実績は世界に誇れるものがあります。今後のこのステータスを維持するためにもこの公益財団法人による研究支援は非常に重要であります。酒造や調味料などの歴史ある経験を糧に、この研究助成が有効に利用され、世界に向けて更なる新しい飛躍をサポートすることを祈念しています。

## 2023 年度大型研究助成の研究報告

助成期間：2023 年 4 月～2025 年 3 月

# 日本発の網羅的プラスミドデータベースの構築

新谷 政己

静岡大学工学部

〒432-8561 浜松市中央区城北3-5-1

## Establishment of a comprehensive plasmid database originating from Japan

Masaki Shintani

Faculty of Engineering, Shizuoka University

3-5-1, Johoku, Chuo-ku, Hamamatsu 432-8561

This study aimed to reconstruct the classification system of *Pseudomonas*-derived plasmids and establish a comprehensive database. We applied replicon typing based on nucleotide sequences of replication initiation proteins (RIPs) and replication origins (*oriV*). RIPs and *oriVs* were experimentally identified from representative plasmids, confirming their replication and transfer abilities. A curated reference library (repP library) was constructed and used to reclassify 846 *Pseudomonas* plasmids in PLSDDB, with 279 (~30%) newly assigned to PInc groups. RIP analysis revealed that ~60% of these plasmids have winged-helix (WH) domain-containing RIPs, and ~20% (180 plasmids) carry AEP-type RIPs. Similar patterns were found across all PLSDDB plasmids. We also developed a method to determine host ranges using GFP-based conjugation and droplet digital PCR (ddPCR) with water-in-oil emulsions. This study provides a refined framework for plasmid classification and host annotation, supporting advances in microbial genomics and antimicrobial resistance research.

Key words: plasmids, *Pseudomonas*, replication, hosts, database

## 緒言

微生物は、地球上の全バイオマスの13%を構成し (Bar-On *et al.*, 2018), 全生物種の78%を占めるとされている (Larsen *et al.*, 2017). さらに、その細胞数は全宇宙にある恒星の数よりも多いと推定されている (Locey & Lennon, 2016). 微生物は、地球の物質循環や環境維持に重要な役割を果たすと同時に、私たちの食や健康にも深く関わっている。また人類は、下水処理、バイオガス生産、土壌浄化など多方面にわたって、多種多様な微生物の力を利用してきた。これは、微生物が地球上のあらゆる環境に適応できる多様性をもつため、地球は微生物に支配されていると言っても過言ではない。このように人類社会にも大きな影響を与える微生物の進化・多様化を促す因子として、プラスミドというDNAが重要

な役割を果たしている。プラスミドは、細胞内に染色体とは物理的に別に存在する遺伝因子であり、それを有する微生物に薬剤耐性や特殊な物質を代謝する能力を与える遺伝子(群)を含む。またプラスミドには、それをもつ供与菌から、もたない受容菌へと、接合伝達とよばれる機構で移動する接合伝達性プラスミドも含まれる (Frost *et al.*, 2005)。プラスミドは、微生物固有の機能の解析や、外来機能の導入に用いられる重要な分子ツールである。しかし、その研究は、主に大腸菌や酵母など、一部のモデル微生物を中心に行われてきており、多様な微生物種に適用可能なプラスミドの情報が不足している。この情報不足は、基礎・応用の両面で大きな障壁となっている。加えて、プラスミドは多剤耐性菌の出現と蔓延の一因ともなっており、これが今後、より深刻な公衆衛生上の課題を引き起こすことも懸念されている。現在、世界各国で見出され、その全DNA配列が解読されたプラスミドは70,000を越え、それらに対していくつかのデータベースが存在する (Carattoli *et al.*, 2014; Garcillán-Barcia *et al.*, 2020; Molano *et al.*, 2024)。しかし、現在のプラスミドの分類体系に関する整備が不十分であ

E-mail: shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

共同研究者：鈴木 仁人 (国立健康危機管理研究機構/国立感染症研究所)。

鈴木 治夫 (慶應義塾大学)

野田 尚宏 (産業技術総合研究所)

るため、こうした主要なデータベースには、分類名に重大な誤りがあるまま運用されることが多く、新たに見出されるプラスミドが次々に誤分類され、基礎学問上も応用上も大きな混乱を生じている (Shintani *et al.*, 2022, 2023). 以上の背景から、本研究ではプラスミドの網羅的なデータベースの作成を目指すこととした。まず、既存のデータベースでの整備の進んでいない、環境浄化や農作物との関連性が高い *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドを対象とした。

プラスミドの分類における歴史的な手法の一つに、「不和合性群 (incompatibility, Inc)」の概念がある。これは、同一宿主細胞内で二種類の異なるプラスミドが共存できるか否かという表現型の相互作用に基づく。共存できないプラスミドどうしは、同一の Inc グループに分類され、その2種類のプラスミドが、類似した複製・維持機構を有していることを示唆する (Novick, 1987). 1970年代以降、*Pseudomonas* 属由来のプラスミドは、IncP-1 から IncP-14 群に属すると提案された (Table 1) (Garcillán-Barcia *et al.*, 2023). 注意すべきは、同一のプラスミドであっても、宿主となる細菌の分類群によって異なる Inc グループに分類される点である。例えば、*Pseudomonas* における IncP-1 は、*Enterobacteriales* における IncA ~ IncZ のうちの IncP と同一であり、IncP-3 は IncA または IncC に、IncP-4 は IncQ に、IncP-6 は IncG に対応する。

近年、不和合性群に代わるプラスミド分類法として、レプリコンタイピング (replicon typing) がよく用いられる。これは、プラスミドの複製に関与する複製開始タンパク質 (replication initiation protein, RIP) や自律複製起点 (origin of vegetative replication, *oriV*)、および RNA を介した複製機構等の塩基配列情報に基づいて分類を行う手法である。例えばプラスミドの分類時に良く利用される MOB-typer というプログラムは、RIP 配列に基づくレプリコンタイピングを自動で行い、対応する不和合性群の名前を出力する優れた機能をもつ (Robertson & Nash, 2018). ただし、上述した不和合性群の名称の重複や対応関係により、特に *Pseudomonas* 由来のプラスミドの分類に混乱が生じている。異なる不和合性群に属するにもかかわらず、*Pseudomonas* 由来プラスミドを一括して「IncP」として出力してしまう。例えば、IncP-2 群、IncP-6 群、IncP-7 群、および IncP-9 群は、いずれも全く性状の異なるプラスミド群であるが、MOB-typer を使うと、「IncP」として誤ったプラスミド群の名前が付けられてしまう。このような誤分類により、IncP-1 群と他のプラスミド群の違いが認識できなくなり、進化的および機能的な特性の把握が困難になるという大きな問題が生じている。

このような背景のもと、我々は、*Pseudomonas* 属由来のプラスミドについて、正確なデータベースを構築することを目的として、本研究を実施した。研究開始当初、RIP や *oriV* を同定されていなかったプラスミドや、新たに環境から得られた未分類プラスミドについて、RIP や *oriV* を実験で同定した。並行して、プラスミドがどの微生物を宿主にするかを実験によって明らかにした。その後、前出のプログラム MOB-typer を利用することとし、このプログラムの根幹をなす参照ライブラリーの間違いを改めるとともに、実験結果に基づいたデータを反映させて、正確な網羅的プラスミドデータベースの構築を行った。

## 実験方法

プラスミドの RIP と *oriV* の同定 (概略を Figure 1 に示した)。

筆者らが先行研究で環境から収集した *Pseudomonas* 属細菌を宿主とする未分類のプラスミド (Hayakawa *et al.*, 2022) (Table 1) と、RIP と *oriV* が未同定の Rms139 (IncP-2), Rms163 (IncP-5), RP1-1 (IncP-11), R716 (IncP-12) の全塩基配列を基に、RIP と *oriV* を推定した。RIP については、国立遺伝学研究所の自動アノテーションプログラム DFAST (Tanizawa *et al.*, 2018) を用いた CDS アノテーションを実施し、生成された protein.faa ファイルを用いて、①BLAST を用いた配列ベースの検索と、②タンパク質構造予測と構造ベースの検索を行った。一方、*oriV* については、プラスミド中の GC skew  $[(G-C)/(G+C)]$  を利用し、その解析には、Webskew (<https://genskew.csb.univie.ac.at/webskew>) を使用して、複製起点または終結点を示唆する GC skew の変化点を検出した (Necşulea & Lobry, 2007). この GC skew の変化点周辺に存在する推定 CDS の塩基配列またはアミノ酸配列に対して、前述の手法①または②を適用した。また、RIP 遺伝子の推定プロモーター領域については、BPROM (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=help&subgroup=gfindb>) を用いて予測を行った (Solovyev & Salamav 2011). 各プラスミド由来の推定 RIP 遺伝子と *oriV* 配列を含む DNA 断片は、Azenta Life Science (Azenta, Inc., Burlington, MA, USA) のカスタムサービスで化学合成し、アンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドベクター pUC-GW-AMP にクローニングされた形で作出した。必要に応じて、各領域の PCR 増幅断片を、EcoRV により制限酵素処理した pUC-GW-AMP に、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Japan Inc.) を使用してアセンブルした後、大腸菌内でクローニングを行った。その後、*Pseudomonas putida* または *P. aeruginosa* に、

Table 1 Lists of representative plasmids in *Pseudomonas*.

PInc (s) (Inc group)	Representative plasmid [accession no.]	Number of plasmids in PLSDB	Number of WH domain	Clade	Reference
PInc-1 (IncP-1, IncP)	RK2/RP4 [BN000925]	321	2	F	Pansegrau <i>et al.</i> , 1994
PInc-2 (IncP-2)	Rms139 [LC653116]	87	2	E	Sawada <i>et al.</i> , 1976; Shintani <i>et al.</i> , 2022
PInc-3 (IncP-3, IncA/C)	pRA1 (IncA) [FJ705807] pR55 (IncC) [JQ010984]	921	2	E	Llanes <i>et al.</i> , 1996; Fricke <i>et al.</i> , 2009
PInc-4 (IncP-4, IncQ)	RSF1010 [M28829]	695	2	F	Scholz <i>et al.</i> , 1989
PInc-5 (IncP-5)	Rms163 [LC685027]	2	1	B	Sagai <i>et al.</i> , 1976
PInc-6 (IncP-6, IncG)	Rms149 [AJ877225]	119	NA	-	(Haines <i>et al.</i> , 2005)
PInc-7 (IncP-7)	pCARI [AB088420]	23	2	H	Maeda <i>et al.</i> , 2003; Shintani <i>et al.</i> , 2006; Takahashi <i>et al.</i> , 2009
PInc-9 (IncP-9)	pWW0 [AJ344068] NAH7 [AB237655] Rsu2 [LC685593]	34	2	A	Hedges & Jacob, 1975; Greated <i>et al.</i> , 2002; Sota <i>et al.</i> , 2006
PInc-10 (IncP-10)	R91-5 [X54695] pPAB546 [MN433456]	49	1	C	Cain & Holloway, 1984; Davies & Krishnapillai, 1990
PInc-11 (IncP-11)	RP1-1 [LC700336]	23	1	C	Ingram <i>et al.</i> , 1972
PInc-12 (IncP-12)	R716 [LC685026]	9	2	F	Bryan <i>et al.</i> , 1973
- (IncP-13)	pMG26 <sup>c</sup> [LC685025]	NA	NA	-	Jacoby, 1980; Bradley, 1983
PInc-15 (PromA)	pSN1104-11 [AP018707]	42	2	G	Hayakawa <i>et al.</i> , 2022
PInc-16	pSN1216-29 [AP018710]	24	2	E	Yanagiya <i>et al.</i> , 2018
PInc-17	pQBR103 [AM235768]	11	2	E	Tett <i>et al.</i> , 2007
PInc-18 (Inc <sub>pSTY</sub> )	pSTY [NC_022739] pPT23-C1_1 [AP040308]	15	2	H	Köhler <i>et al.</i> , 2013

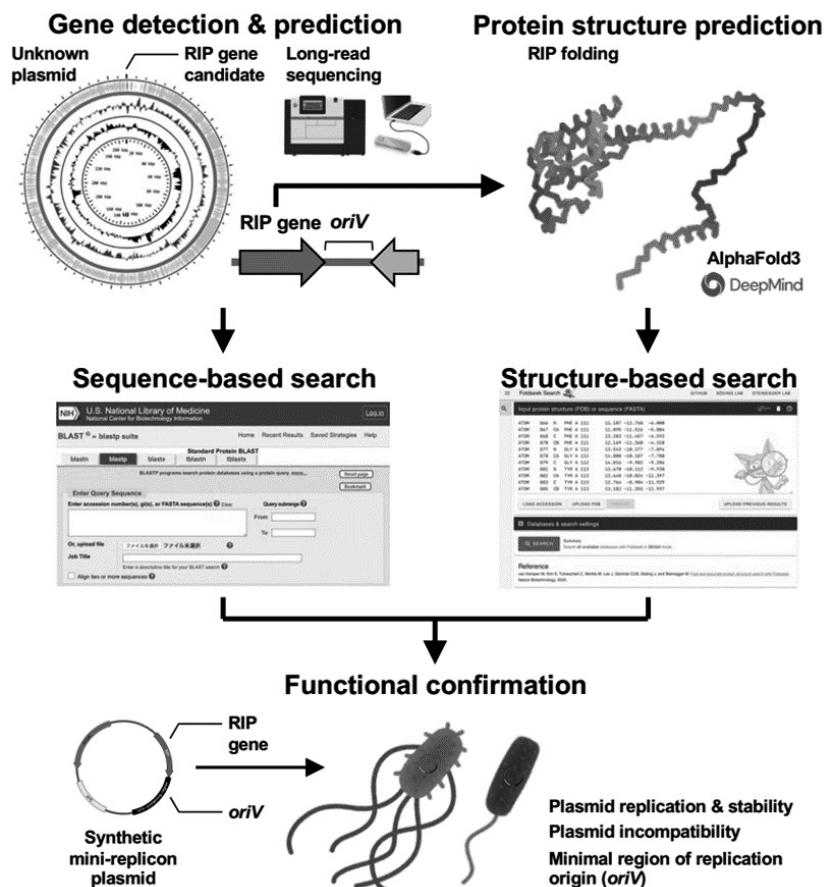


Figure 1. Methods to identify RIP genes.

Prediction methods by nucleotide or amino acid sequence-based search using BLAST, and by protein structure-based search using AlphaFold3 and FoldSeek.

MicroPulser エレクトロポレーター (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用したエレクトロポレーションによって、当該ミニプラスミドを挿入し、形質転換体の出現の有無をもって、複製の可否を検証した。なお、遺伝子操作の手順は、標準的なプロトコルに従って実施した (Sambrook & Russell, 2001)。

#### 網羅的プラスミドデータベースの構築

##### (1) repP ライブラリーの作製とプラスミド分類

まず、ミニプラスミドを用いて同定された、*Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドの RIP 遺伝子の配列情報と、既知の RIP 配列の情報とを併せて、誤った命名法等を除去した参照ライブラリー (repP ライブラリー) (<https://figshare.com/s/28e3204f6991d6ce0c11>) を作製した。その次に、PlasmidFinder や MOB-suite に含まれる既存の参照ライブラリーと照合し、repP と重複している配列や、誤って登録された RIP 配列を手動で削

除して、修正済みの参照ライブラリーを作製した (<https://figshare.com/s/3e3ced8633136259f678>)。このライブラリーを用いて、公的なプラスミドデータベースの一つである PLSDB (2023\_11\_03\_v2) (Galata *et al.*, 2019; Schmartz *et al.*, 2022) に登録された 846 の *Pseudomonas* 属由来のプラスミドについて、配列一致率 90% 以上、カバレッジ 60% 以上の条件で再度分類を行った。このとき、完全長のプラスミド配列は Entrez Programming Utilities (E-utilities) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK25501/>) を用いてダウンロードした (<https://figshare.com/s/915a336484ee084ffbea>)。また、このライブラリーを用いて、PLSDB に登録された 59,895 種類の全プラスミドについても同様に分類を行った。

##### (2) RIP の大系統樹の作製

*Pseudomonas* 属由来の複製開始タンパク質 (RIP: Replication Initiation Protein) の系統関係を明らかにす

るため、repP ライブラリーに登録された RIP 配列を中心に、以下の方法で類縁配列を網羅的に探索し、系統樹解析を行った (Nishimura *et al.*, 2024). repP ライブラリーを用いて、PLSDB 全体のプラスミドを分類し、2,351 の配列を得た。その後、CDS を DFAST にて予測後、RIP 候補を抽出した。MMseqs2 (Steinegger & Söding, 2017) を用いてクラスター化し、最長の代表配列を抽出し、非冗長 RIP 群を 11 グループ得ることができた。このようにして *Pseudomonas* 属由来のプラスミドの RIP 配列群を再分類・統合した後、さらなる多様性の把握を目的として、非 *Pseudomonas* 属細菌由来の RIP 配列も解析に加え、ホモログ探索の出発点 (シード配列) として、PLSDB に含まれるプラスミドの全タンパク質配列に対して diamond blastp による検索を行った。 *Pseudomonas* 属由来の 11 グループと、これら非 *Pseudomonas* 属由来の 8 グループを合わせた計 19 グループについて、MAFFT (Katoh & Standley, 2013) による配列整列と、HMMER (Eddy, 2011) による HMM プロファイルの構築を行い、UniParc (<https://www.uniprot.org/help/uniparc>) のタンパク質配列 (約 6.07 億件) を対象とした hmmsearch により広範なホモログ探索を実施した。得られたヒットの中から、e-value の閾値を満たし整列長の条件を満たす配列を抽出し、Pfam によるドメインスクリーニングによって転写因子等の RIP とは無関係な配列を手動で除去した上で、最終的に 63,179 配列を統合し、全体を 14 グループに整理した。この配列集合に対して、50% の配列同一性を基準に非冗長化を行った。その結果、5,488 配列からなる代表配列群を得ることができ、これを以降の系統解析に用いた。

### プラスミドの宿主域の決定

(1) プラスミドの「行き先」の決定 (Figure 2A 参照)

pJBA28 (Andersen *et al.*, 1998) と *Escherichia coli* S17-1  $\lambda$ pir (Simon *et al.*, 1983) を用い、 $P_{Al/04/03}$ -RBSII-*gfpmut3\** とカナマイシン耐性遺伝子を含む mini-Tn5 を、宿主域を調べたいプラスミドに挿入した。挿入は以前の論文に記した方法で実施した (Tokuda *et al.*, 2020). *gfp* 遺伝子を挿入したプラスミドの供与菌は、*Pseudomonas putida* SMDBS (Shintani *et al.*, 2014) とした。受容菌には、環境細菌群集 (土壌・湖水由来) を用いて実施した。環境細菌群集は、密度勾配遠心によって抽出した菌体を用いた。この抽出には、密度勾配溶媒として Histodenz (Sigma-Aldrich) を使用した。供与菌と受容菌 (環境試料) を等量 (各 100 $\mu$ L) 混合し、孔径 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルター (ADVANTEC) を介して、LB 寒天培地 (LBA) または寒天のみの培地 (Agar) 上で接合させた。接合は 30 $^{\circ}$ C で 3 時間静置培養により行い、その後、栄養源を含まない寒天培地に移して 3 日間静置培養した。

また、供与菌と受容菌を一種類ずつ用いた実験では、門や綱の異なる、培養可能な 127 株を受容菌候補として用い、至適培地で 30 $^{\circ}$ C, 180rpm にて 18 時間培養した (必要に応じ、一部の受容菌株は 48~72 時間培養した)。その後、供与菌培養液と、受容菌培養液を、それぞれの菌体数がおおよそ 1:10 となるように混合し、その混合液を洗浄後、孔径 0.45 $\mu$ m のフィルター上にろ過して捕捉した。混合液を捕捉したフィルターは、寒天培地上に移し、30 $^{\circ}$ C で 48 時間静置し、フィルター接合を行った。その後、フィルター上の混合液を、PBS に再懸濁した。接合完了体の検出と分取には、フローサイトメトリーお

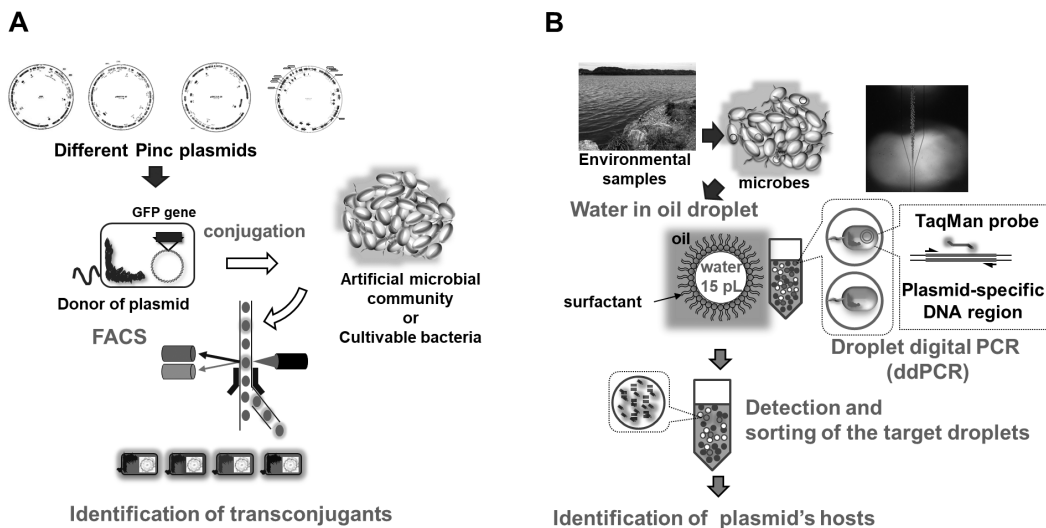


Figure 2. Methods to identify plasmid transconjugants (A) and original host of plasmids (B).



よびセルソーター (FACS) を用いた。FACS には、Moflo XDP Intellisort II (Beckman Coulter) または Cell Sorter SH800S, SONY, Tokyo, Japan を使用し、488nm のアルゴンレーザーと、70 $\mu$ m ノズル (MoFlo) または 100 $\mu$ m ソーティングチップ (SH800S) を用いて、接合完了体の緑色蛍光を検出した。

## (2) プラスミドの「持ち主」の決定 (Figure 2B 参照)

(1) では網羅しきれないプラスミドの宿主について、油相中で安定な微小液滴、water in oil (w/o) droplet を用いた手法によって決定を試みた。まず w/o droplet を用いて、対象プラスミドが微生物細胞内に存在するかどうかを検証する digital droplet PCR (ddPCR) を行うために、以下の溶液を調製した。2 $\times$  ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) 対象プラスミドの RIP 遺伝子特異的プライマー、16S rRNA 遺伝子 (V3-V4 領域) 特異的プライマー、RIP 遺伝子検出用 TaqMan MGB プローブ (緑色蛍光標識, Thermo), および dsDNase 処理済み微生物細胞懸濁液。最終反応液量は 30 $\mu$ L とし、w/o droplet 1 個あたりの細胞数が 1 未満となるよう調整した。w/o droplet 内の細胞封入数は、ポアソン分布から算出し、 $\lambda=0.29$  の場合、封入率は 25.2% となった。On-chip<sup>®</sup> Droplet Generator (On-chip Biotechnologies) と 2D chip-800DG を用いて、30 $\mu$ m 径の w/o droplet を作製した。その後、w/o droplet を 0.2mL チューブ (Nippon Genetics) に回収し、ddPCR を、95 $^{\circ}$ C で 10 分加熱後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒・60 $^{\circ}$ C で 3 分のサイクルを 50 回行った。ddPCR 後の w/o droplet は、蛍光顕微鏡で観察し、TaqMan プローブ由来の緑色蛍光の有無を確認した。その後、On-chip<sup>®</sup> Droplet Selector (On-chip Biotechnologies) を用い、緑色蛍光を示す w/o droplet を回収した。回収後の w/o droplet から DNA を抽出し、遺伝子解析に供した。

## 結 果

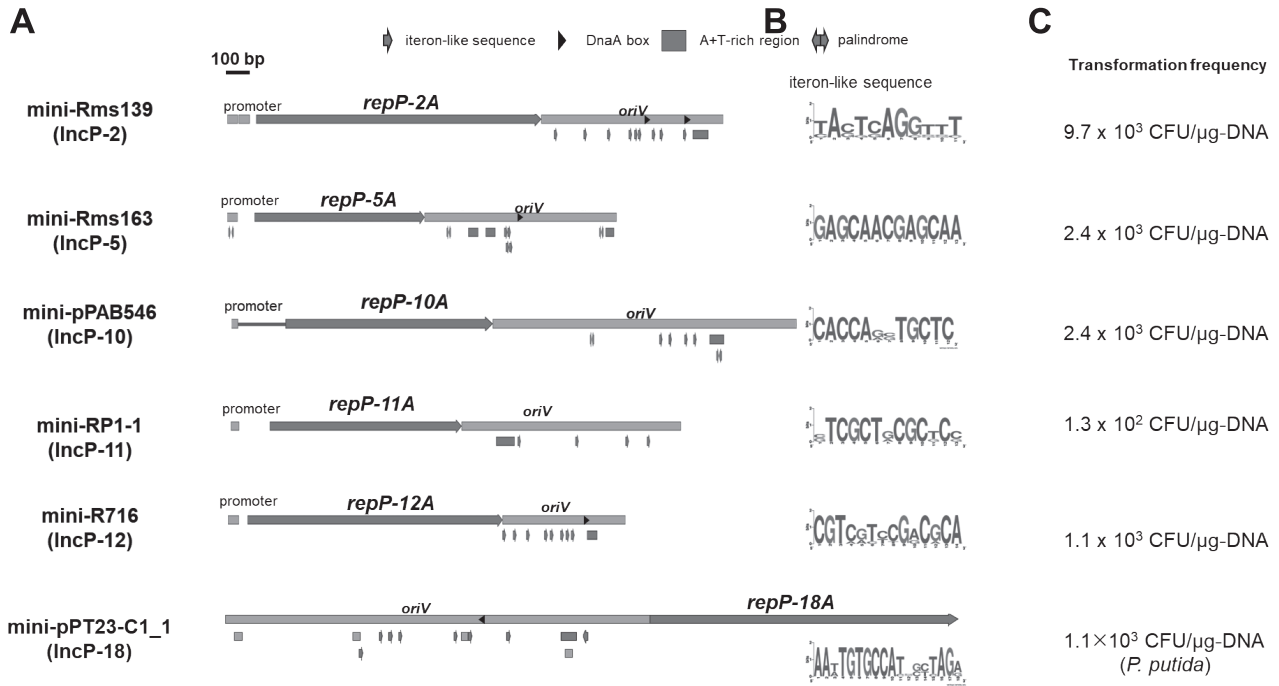
本研究で対象とした *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドは、不和合性に基づいて分類された IncP-1 から IncP-14 群プラスミドと、筆者らが環境から新たに収集したプラスミドを含む。また、本研究で採用する分類方法は、RIP 配列に基づくレプリコンタイピングであり、旧来の不和合性という表現型に依存しない。そこで以前の名称と区別するために PInc というグループ名を新たに作ることにした。命名については、PInc- の後に、旧来の IncP- の後にある番号を付けて示し、亜群はギリシア文字で記す (例: IncP-1 $\alpha$  = PInc-1 $\alpha$ )。

## プラスミドの RIP と *oriV* の同定

筆者らが完全塩基配列を決定した 6 種のプラスミド Rms139 (PInc-2) (Sawada *et al.*, 1976), Rms163 (PInc-5) (Sagai *et al.*, 1976), pPAB54 (PInc-10), RP1-1 (PInc-11) (Ingram *et al.*, 1972), R716 (PInc-12) (Bryan *et al.*, 1973) および pPT23-C1\_1 (PInc-18 と命名) について RIP と *oriV* を実験で同定することに成功した。なお、PInc-10 群プラスミドについては、代表株 R91-5 の部分配列 (Cain & Holloway, 1984; Davies & Krishnapillai, 1990) のみが利用可能であったことから、代わりに、当該領域の DNA 配列が高い一致度を示した、全塩基配列解読済みの pPAB546 (accession no. MN433456) を代表プラスミドとして選定した (Table 1)。また、従来 IncP-13 群のプラスミドとして分類されていた pMG26 (Jacoby, 1980; Bradley, 1983) については、詳細な分子解析を行った結果、IncP-8 とされていたプラスミドと同様に (Kawalek *et al.*, 2020)、プラスミドではなく integrative and conjugative element (ICE) であると結論付けた (データは示さない)。また、IncP-14 とされたプラスミド (Boronin, 1992) は、塩基配列情報もプラスミドの実体も入手することができなかった。これらのプラスミド (Table 1) の RIP 遺伝子および *oriV* 領域については、配列ベースおよび構造ベースの検索に基づき推定した後、ミニレプリコンを作製して、*Pseudomonas* 属細菌内で複製できるかどうかを検証した。その結果、いずれのプラスミドについても、複製に必要な領域を同定することに成功した (Figure 3)。

加えて、Rms139, Rms163, RP1-1, R716 および pPT23-C1\_1 の 5 種のプラスミドについては、フィルター接合により、接合伝達性の検証を行ったところ、全てのプラスミドは、*Pseudomonas* 属細菌に接合伝達可能であることが示された (データは示さない)。

以上によって、明らかにした PInc 群の RIP 配列情報と、既知の情報とを併せて整理し、87 種の RIP 配列を含む参照ライブラリー (repP ライブラリー) を作製した。その後、公開された PLSDB (2023\_11\_03\_v2) に登録された 846 の *Pseudomonas* 属由来のプラスミド (本研究の開始前には 33 のプラスミドにしか、既知の不和合性群等の分類の情報が付与されていなかった) について、配列一致率 90% 以上、カバレッジ 60% 以上の条件で再度分類を試みた。その結果、846 のうち 279 のプラスミドについて、PInc 群に分類することができた。また、このライブラリーを用いて、PLSDB に登録された全プラスミドについても同様に分類を行ったところ、Table 1 に示すように 2,351 のプラスミド (マルチレプリコンによるダブルカウントを排除) の分類が可能になった。



**Figure 3.** Genetic structure of mini-replicon of PInc plasmids. (A) The mini-replicon of each plasmid was constructed by using DNA regions shown in an arrow (replication initiation protein RIP gene) with its promoter (box) and a solid line (*oriV*). Putative iterons and palindromes are shown by short arrows, and A+T-rich regions are shown in boxes below the *oriV* region, respectively. Putative DnaA boxes are shown by black arrowheads in the *oriV* region. (B) Consensus sequences of putative iterons are shown. (C) Transformation efficiency of *P. aeruginosa* PAO1 (or *P. putida*) with the mini-replicons are shown.

### 網羅的プラスミドデータベースの構築

repP ライブラリーを用いて分類された PLSDb 由来の 2,351 のプラスミドから、2,374 の RIP のアミノ酸配列を同定した。その後、MMseqs cluster v15-6f452 を用いて、非冗長タンパク質セット (251 個) を選抜し、BLASTp により各アミノ酸配列間の相同性を評価した。これにより、RIP を 11 のグループに分けた。この時点で、PInc-6 以外のプラスミドの RIP には、Winged-helix (WH) ドメインを 1 つ含むタイプの RIP (sWH) と 2 つ含むタイプの RIP (dWH) が存在することが明らかになった。また、PInc-6 については、WH ドメインではなく、primase ドメインと PriCT ドメインを有する RIP (archaeo-eukaryotic primases, AEP スーパーファミリーの一員) (Iyer *et al.*, 2005) を含み、他の PInc 群とは全く異なる複製様式を取ることが明らかになった。

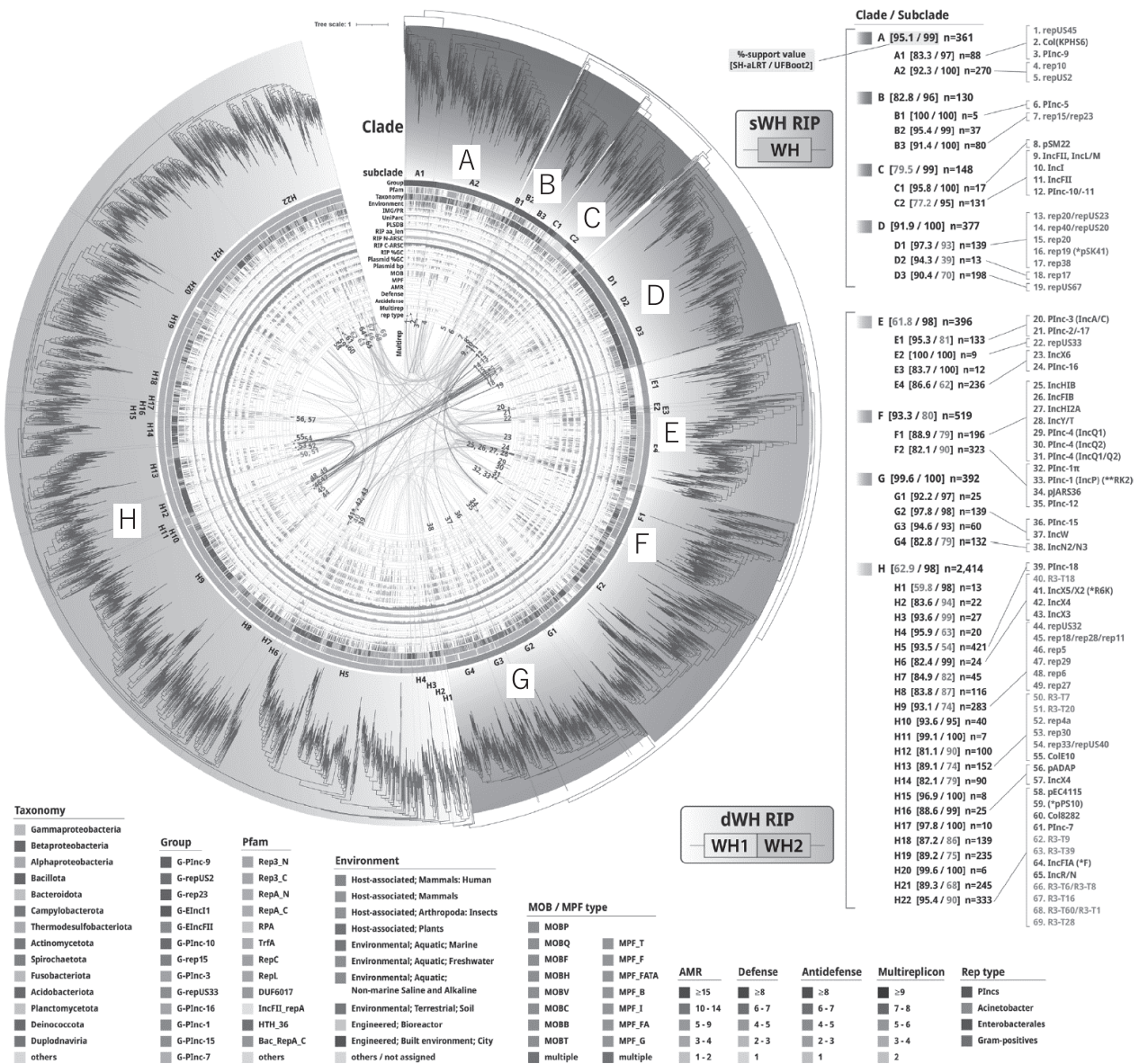
次に、より遠縁のタンパク質を検出し、多様な RIP 配列を包括的に収集するために、多段階のホモログ探索プロセスを実施した。第 1 段階では、orfM (Woodcroft *et al.*, 2016) で予測された PLSDb プラスミドの全タン

パク質 (n=20,331,985) を対象に、HMMER v3.3.2 の hmmsearch を用いてホモログ検索を行った。加えて、既知の RIP から距離のある 8 つの RIP グループを手動で選び、diamond blastp を用いて、同じく PLSDb の全タンパク質に対してホモログ検索を行った。その結果、上の 11 グループと合わせて、合計 19 の RIP ホモロググループを得た。第 2 段階では、UniParc タンパク質配列 (2024 年 2 月にダウンロード、n=607,912,929) に対し、前段で構築した 19 の HMM を用いて hmmsearch を行い、得られた UniParc 配列を各ホモロググループに統合した。その後、Pfam データベースに対する hmmsearch により、転写因子など、RIP とは機能が異なると推定されたタンパク質のアミノ酸配列を除去した。その結果、UniParc 配列の重複に基づき、19 のグループが 14 に統合され、最終的に 5,488 個の代表配列が抽出された。次に、14 グループ間の相同性を評価するため、HHblits v3.3.0 を用いて HMM 対 HMM の比較を行った。その結果、13 グループから相同性のあるアミノ酸配列の領域が見出された。この 13 のグループに由来する WH 型

RIPについて、同定された相同性領域を用いて系統樹を再構築した (Figure 4). 最大尤度法により得られた系統樹は、50%の配列同一性でクラスタリングされた4,769の代表配列から構成されており、これらはPLSDBの34,724のプラスミドと、UniParcの95,057のタンパク質に対応する。また、8つのクレードと42のサブクレードを定義した (Figure 4). すべてのクレードおよびサブクレードは、UFBoot2 (Hoang *et al.*, 2018) が  $\geq 95\%$ , SH-aLRT (Guindon *et al.*, 2010)  $\geq 80\%$ のいずれか、または両方の高い支持値によって支持された。系統

樹全体の構造として、sWH型およびdWH型RIPは、樹内の1箇所での明確な分岐を示し、その分岐も高い支持値を示した (UFBoot2: 89.4%, SH-aLRT: 88%)。得られた系統樹は、sWH型RIPがクレードA~Dに、dWH型RIPがクレードE~Hに含まれた (Figure 4)。

以上のデータを用いて、846の *Pseudomonas* 属由来のプラスミドを再分類したところ、全体の約6割にあたる、505のプラスミドがWHドメインを含むRIPをもつことが判明した。残りのプラスミドについては、前述したAEP型RIPをもつプラスミドが180、どちらのタイプ



**Figure 4.** A maximum-likelihood tree of WH RIPs based on the conserved region. The defined 8 clades and 42 subclades are shown. The tree was rooted by the split of sWH RIPs (clade A-D) and dWH RIPs (clade E-H).

にも属さない可能性がある RIP をもつプラスミドが 32 見出され、717 のプラスミド (全体の 85%) について分類できるようになった。

### プラスミドの宿主域の決定

本研究で対象とした *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドのうち、先行研究で実施したプラスミドキャプチャリングによって新たに環境から得たプラスミド (主に PInc-15, PInc-16) については、環境中でどの微生物を宿主としているのかという情報は得られない。そこで、得られたプラスミドが、どのような微生物間を伝播するのか (「行き先」)、また、元来どの微生物がそのプラスミドを保有していたのか (「持ち主」)、を明らかにした。ここでは PInc-15 群プラスミドについて実施した例を中心に記す。

#### (1) プラスミドの「行き先」の決定

亜群の異なる PInc-15 群プラスミドに、接合伝達後後のみ発現する、緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子を挿入し、環境試料 (土壌・湖水) 中に生息する微生物群集を混合して接合実験を行った。プラスミドを受け取った接合完了体を、緑色蛍光を指標にフローサイトメトリーとセルソーター (FACS) によって分取した。分離した接合完了体の 16S rRNA 遺伝子配列を解読することで、どの微生物がプラスミドを受け取ったのか同定した。その結果、PInc-15 群プラスミドは門や綱の異なる微生物間を伝播する広宿主域プラスミドであること、またその宿主域は亜群ごとに異なることが判明した (Table 2) (Tokuda *et al.*, 2023)。

上で述べた手法は、一度に網羅的にプラスミドの接合完了体を同定するためには適している一方、接合完了体として検出されなかった細菌の情報を得ることはできない。そこで、プラスミドが接合伝達可能な細菌に加え、接合伝達できない細菌の情報も得るため、培養可能な 127 株を 1 種類ずつ使用した接合実験を実施した。対象プラスミドは、上記 PInc-15 群プラスミドに加え、他の *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミド群 12 種類について、総当たりの接合実験を行った。本実験では、接合後の菌体懸濁液をフローサイトメトリーに供して、200 万細胞を解析した際の蛍光細胞の有無より、接合完了体細胞の有無を検証した。各菌株における接合完了体検出の可否を Figure 5 に示す。127 株の受容菌のうち、プラスミドごとに、27~87 株が接合完了体として検出された。接合伝達が認められた細菌が最も多いプラスミドは pSN1104-11 (PInc-15 $\gamma$ ) で、87 株、少ないプラスミドは pMNBM077 (PInc-1 $\kappa$ )、pYKAM101 (PInc-1 $\lambda$ ) でそれぞれ 27 株および 47 株であった。同定された接合

完了体は *Pseudomonadota* 門に留まらず、*Bacillota* 門、*Actinomycetota* 門、*Bacteroidota* 門の 4 の門に属した (Figure 5)。以上より、12 種類のプラスミドと 127 株の受容菌を用いた合計 1,523 の接合実験の結果、723 の接合伝達可能な (プラスミドと細菌の) 組み合わせ、801 の接合伝達不可能な組み合わせを同定した。また、同じ PInc 群に属するプラスミドであっても、同一細菌に対する接合伝達の可否が異なることが示された。

#### (2) プラスミドの「持ち主」の決定

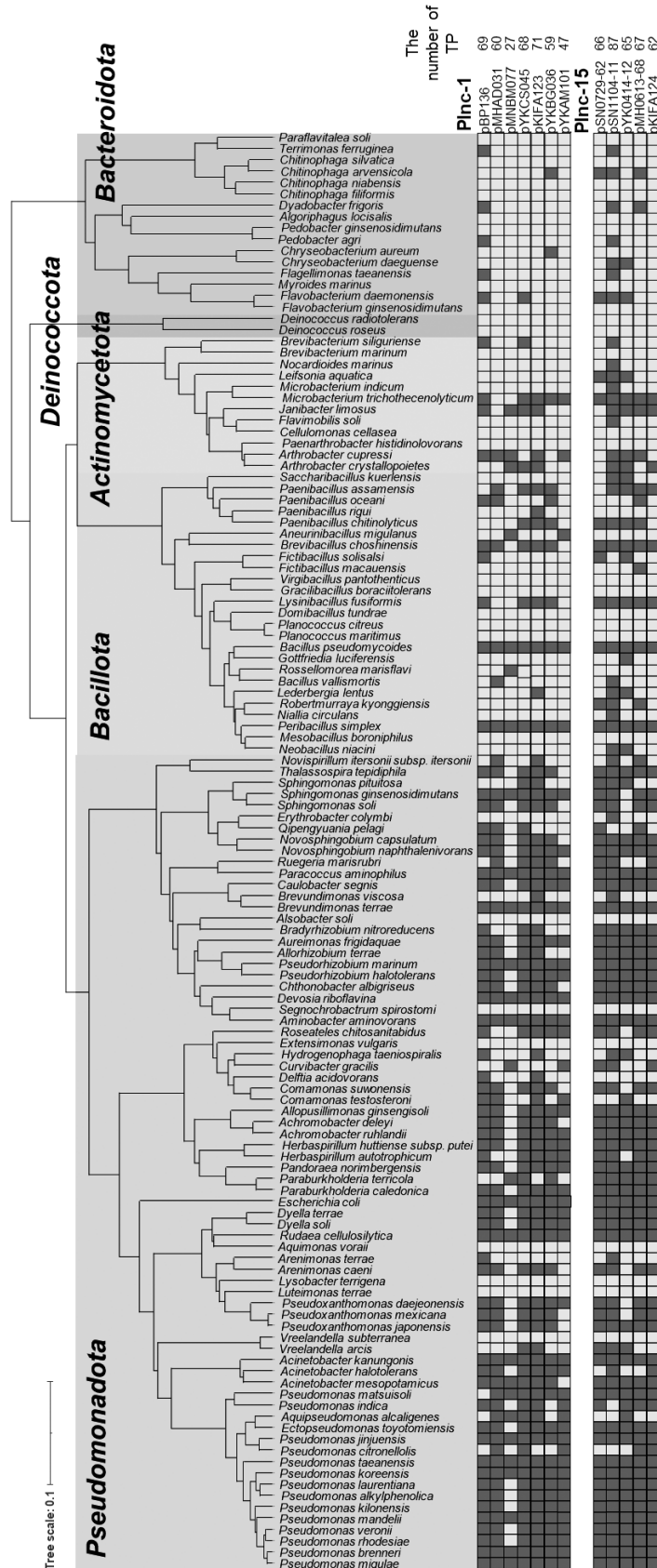
上述した「行き先」の同定と並行して、環境中の微生物のうち、PInc-15 群プラスミドを元来保有する天然の宿主の同定を、w/o droplet を用いた ddPCR と、目的 w/o droplet のソーティング後のシングルセル解析によって行った。解析対象となったドロップレットの総数は 2,296,472 個であり、そのうち 68,890 個に微生物細胞が封入されていると推定された。548 個のドロップレットから緑色蛍光が検出され、PInc-15 群プラスミドを保有する細胞の存在が示唆された。この 548 個のうち、373 個を個別にソートし、31 個が PInc-15 群プラスミドをもつ微生物を含むことが判明した。16S rRNA 遺伝子配列に基づく宿主候補株の同定を行ったところ、17 の属の細菌であることが示された (Table 3)。また、*Leifsonia*、*Cutibacterium*、*Anoxybacillus*、*Methylobacterium* および *Sphingomonas* は、複数の w/o droplet から検出された。一方、6 個の w/o droplet からは、属レベルで既知の 16S rRNA 遺伝子領域 (V3-V4) との配列一致度が 97% 未満の細菌が見出された (Table 3)。そのほかの 3 株は、異なる 3 つの科に属すると推定されたが、残りの 3 株は科レベルでも同定が困難であった。

## 考 察

プラスミドは、長期にわたって微生物と共存してきた染色体外遺伝因子であり、基礎学問上も応用上も重要な存在である。しかし、分類体系が不完全・不正確であるうえ、既存のデータベースには間違った情報が混在し、研究開発に混乱を引き起こしている。そこで、本研究では、プラスミドの分類体系の再構築と、正確な情報に基づくプラスミドデータベースを構築することを目指した。環境と臨床等、様々な場所から見出される、*Pseudomonas* 属細菌を宿主とするプラスミドを対象として、塩基配列情報と実際の機能に基づき、正確な分類体系の構築を行った。その結果、本研究で定義した PInc 群の RIP と *oriV* の同定に成功し、既存の参照ライブラリーを改善した、repP ライブラリーを構築することに成功した。さらに、このライブラリーを基に、WH ドメ

Table 2 Transconjugants of the four Pinc-15 plasmids

Phylum	Class	Family	Genus	Pinc-15 $\gamma$	Pinc-15 $\beta$ -1	Pinc-15 $\beta$ -2	Pinc-15 $\delta$
Actinomycetota	Actinomycetia	Promicromonosporaceae	<i>Krasilnikoviella</i>	1	0	0	0
Bacillota	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	0	0	1	0
Bacteroidota	Flavobacteriia	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	0	0	0	1
			<i>Chryseobacterium</i>	1	0	1	0
			<i>Myroides</i>	0	0	0	1
Pseudomonadota	Sphingobacteriia	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	1	0	0	0
	Alphaproteobacteria	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	1
			<i>Agrobacterium</i>	1	0	0	0
			<i>Beijerinckia</i>	1	0	0	0
			<i>Ensifer</i>	4	0	0	0
		Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	0	54	0	6
			<i>Variovorax</i>	2	0	0	0
		Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	0	1	0	1
			<i>Delftia</i>	2	0	0	2
		Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	4	0	3	5
		Xanthomonadaceae	<i>Aquimonas</i>	0	0	0	1
Gammaproteobacteria			<i>Stenotrophomonas</i>	5	2	16	6
		Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	3	17	1	5
			<i>Klebsiella</i>	9	5	1	2
			<i>Kosakonia</i>	4	2	0	0
			<i>Lelliottia</i>	0	0	0	1
			<i>Leclercia</i>	0	4	0	0
			<i>Siccibacter</i>	0	1	0	0
			<i>Pluralibacter</i>	0	1	0	1
			<i>Yokenella</i>	2	0	0	0
			<i>Raoultella</i>	34	6	2	21
			<i>Citrobacter</i>	0	2	1	5
			<i>Buttiauxella</i>	0	2	0	0
			<i>Kluyvera</i>	0	2	0	0
		Erwiniaceae	<i>Erwinia</i>	0	0	0	1
		Hafniaceae	<i>Hafnia</i>	0	1	0	0
		Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	22	9	4	62
		Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	0	0	3	0
		Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	18	26	25	37
		Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	0	0	1	5
		Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	0	1	0	7



**Figure 5.** The ability of conjugative transfer identified by one-on-one conjugation assays. Phylogenetic tree was constructed by 16S rRNA sequences using UPGMA method. Gray boxes indicate GFP positive (the plasmid were able to be transferred to the strain), while white boxes indicate GFP negative (the plasmid were not detected to be transferred to the strain).

Table 3 Original host candidates of PInc-15 plasmid in the lake sediments

Phylum	Class	Order	Family	<sup>a</sup> Genus	Identity (%)		
<i>Actinomycetota</i>	<i>Actinomycetia</i>	<i>Geodermatophilales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i>	100.0		
			<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Leifsonia</i> (4)	99.70/99.71/99.71/99.73		
		<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcales bacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>		99.40	
				<i>Leucobacter</i>		100.0	
<i>Bacteroidota</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Microbacteriaceae bacterium</i>		95.82		
			<i>Micrococaceae</i>	<i>Kocuria</i>	100.0		
			<i>Micrococcales bacterium</i>		77.31		
			<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cultibacterium</i> (2)	100.0/100.0		
			<i>Cytophagia bacterium</i>		87.70		
			<i>Flavobacteriales</i>		98.85		
			<i>Saprospirales</i>	<i>Saprospiraceae bacterium</i>		95.81	
			<i>Bacilli</i>	<i>Anoxybacillaceae</i>	<i>Anoxybacillus</i> (2)	98.70/99.28	
			<i>Bacillales</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	99.72
				<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	98.95
<i>Cyanobacteriota</i>	<i>Chroococcales</i>	<i>Paenibacillales</i>	<i>Paenibacillaceae bacterium</i>		93.63		
		<i>Chroococcales</i>	<i>Prochlorococcaceae</i>	<i>Prochlorococcus</i>	100.0		
<i>Cyanobacteriota bacterium</i>					93.05		
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiales</i>	<i>Lichenihabitantaceae</i>	<i>Lichenifusis</i>	98.52		
			<i>Methyllobacteriaceae</i>	<i>Methyllobacterium</i> (2)	100.0/98.80		
		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus</i>		99.71	
		<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i> (2)		99.08/99.71	
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Moraxellales</i>	<i>Lysobacteriales</i>	<i>Lysobacteraceae</i>	<i>Luteimonas</i>	99.73		
			<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella</i>		100.0	

<sup>a</sup>Digits in blank indicate the number of isolates.

インを有するRIPを網羅的に検索し、4,769の代表配列からなる、大系統樹を描画することに成功した。この系統樹は、PLSDBおよびUniParcの多くの配列と関連付けられた。葉の大部分(73%, n=3,466)はUniParc由来のタンパク質配列のみに対応しており、PLSDBに含まれるプラスミドのRIPとは一致しなかった。この事実は、地球上に多数の未発見のプラスミドが存在していることを示唆している。一方、PLSDBに含まれる34,711のプラスミドは、残りの1,303の葉に対応し、PLSDB全体のおよそ6割がWH型RIPの系統樹に含まれることを意味している。またこのうち5,369のプラスミドについては、今回新たに分類ができた。PIncを含む既知のプラスミドもこの系統樹上にマッピングされており、その位置は広く分布していた(Figure 4)。PInc群プラスミド由来のRIPは、15の葉と対応し、クレードDを除く7つのクレードに含まれた。また、PInc-1, PInc-4, PInc-15のRIPは配列多様性が高く、複数の葉と対応した。一方、その他のPIncは単一の葉と対応しており、これは高い配列の類似性(identity >73%)を反映している。また、PInc-2とPInc-17や、PInc-10とPInc-11のように、複数のPInc群が1つの葉に集約される例も認められ、PInc群を超えた高度な配列類似性を示していた。

各クレードのプラスミドは、それぞれ特徴的な宿主の分類と環境分布を示した。sWH型RIPのクレード(A-D)は宿主に偏りが認められた一方、dWH型RIPのクレード(E-H)は多様な宿主を含んでいた(Figure 4)。例えばクレードBおよびDでは*Bacillota*、クレードCでは*Gammaproteobacteria*が優占であった。また、*Bacteroidota*, *Campylobacterota*, *Fusobacteriota*に由来するRIPの80%以上はクレードHに分類された。これらの分布は、プラスミドの進化における宿主の起源と、その変遷を反映している可能性が高い。環境分布に関しては、sWH型RIPは、動植物のマイクロバイオームから見出される割合が高い傾向にあった。特にクレードBとDはヒトおよび哺乳類関連マイクロバイオームに、クレードAは昆虫、クレードCは植物に関連するマイクロバイオームに富んでいた。これらのRIPは、特定の環境における生態学的役割や病原性と関係しているのかもしれない。一方、dWH型RIPは、環境由来のマイクロバイオームに多く含まれ、クレードEとFは水環境、クレードGは陸上環境から見出される傾向があった。こうした環境分布がどのように形成されたかについては、今後さらなる研究が求められる。

大系統樹の作出と並行して行った、PInc群プラスミドの宿主域の比較については、天然の宿主が得られにくい、PInc-15を中心に実施した。その結果、本群プラスミド

は門や綱の異なる微生物間を伝播する広宿主域プラスミドであること、またその宿主域は亜群ごとに異なることが判明した(Tables 2, 3, Figure 5)。特に、本研究で導入した、w/o dropletを用いたddPCRとソーティングによって同定された「持ち主」候補のうち、*Cutibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Sphingomonas*および*Moraxella*属細菌は、「行き先」を決定する手法で、PInc-15が伝達することが示唆されており、w/o dropletを用いた手法が、プラスミドの天然の宿主を同定する方法としての信頼性を裏付けるものである。また、*Actinomycetota*および*Bacilliota*に属する細菌(*Mycobacterium*, *Blastococcus*, *Kocuria*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Leucobacter*, *Anoxybacillus*および*Prochlorococcus*の7属)は、グラム陽性菌であり、PInc-15群プラスミドの宿主としては報告されていなかったが、本研究で宿主となりうることが示された。また、3株については、NCBIおよびSILVAのデータベースにおける16S rRNA(V3-V4領域)配列との相同性が90%未満であり、未知あるいは新規の宿主細菌である可能性が示された。

PInc-15は大系統樹のG2に含まれ、類縁のRIPが比較的多様な宿主から見出されていることも、PInc-15の宿主域が広いという結果を支持している。また、同時に行ったPInc-1やPInc-16は、それぞれ大系統樹のF2, E4に含まれ、いずれも広い宿主域を示すことが予想された。

本研究で構築した分類体系に基づき、正確な情報を含むプラスミドデータベースの作製に向け、現在PLSDBとの連携を模索している。また、世界3大DNAデータベースの一つ、国立遺伝学研究所のDDBJと連携して、プラスミドの塩基配列登録時に、既存のRIPライブラリーを基に、正確なプラスミドの分類とアノテーションを行えるオプションの実装も行った(DFAST, <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/dfc/>)。この仕組みを利用すれば、本研究で得られた参照ライブラリーに基づき、日本から精度の高いプラスミド分類・アノテーション情報を発信することが可能になる。その情報はNCBI, EMBLにも反映される。

我が国には、古くからの発酵産業の伝統もあって、ユニークな微生物がストックされている。本研究で開発したプラスミドデータベースを利用すれば、こうした微生物の研究が加速し、その強みを発揮できると期待される。また、本データベースが充実すれば、出現した多剤耐性菌のもつ薬剤耐性プラスミドが、他の細菌に伝播するかどうかを予測可能になり、その危険度が高い場合には、予め隔離することで伝播を遮断し、予防対策にも貢献できると期待される。



## 要 約

本研究は、*Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドに着目し、分類体系の再構築と網羅的なデータベースの構築を目的とした。従来の不和合性群（Inc 群）に基づく分類は不正確で、誤りを招きやすいことから、複製開始タンパク質（RIP）や複製起点（*oriV*）の配列情報に基づくレプリコンタイピングを採用し、新たに PInc 群として体系化した。代表的なプラスミドについて、RIP と *oriV* を実験的に同定し、複製能や接合伝達能を検証したうえで、修正済みの参照ライブラリー（repP ライブラリー）を作成した。このライブラリーを用いて、公開データベース PLSDb に登録された 846 の *Pseudomonas* 由来プラスミドの再分類を行い、その約 3 割（279）を新たに PInc 群に分類した。さらに、RIP の配列を大規模に収集・系統解析することで、*Pseudomonas* 属由来のプラスミドの約 6 割（505）が winged-helix (WH) ドメインを含む RIP を有することが判明した。残りのプラスミドは、WH 型とは別の AEP 型 RIP をもつプラスミドが 180、その他の RIP をもつプラスミドが 32 見出され、717 のプラスミド（全体の 85%）について分類できた。また、WH ドメインを含む RIP について、PLSDb に登録されたプラスミド全体に拡張すると、8 つの主要なグループに整理され、こちらも約 6 割について体系分類ができることが判明した。また、PInc-15 を中心に行った GFP を用いた接合実験と、w/o droplet を用いた ddPCR 法とソーティングを組み合わせることで、各プラスミドの宿主域を決定する手法も確立した。本研究は、正確な分類と宿主情報に基づいた新たなプラスミドデータベースの基盤を提供し、今後の微生物研究や薬剤耐性対策への応用が期待される。

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 口頭発表

- 川北鈴香, 陶山哲志, 高木妙子, 大田悠里, 野田尚宏, 金原和秀, 新谷政己. 2023. water-in-oil (w/o) droplet で PromA 群プラスミドの「天然の宿主」を同定する. 日本農芸化学会 2023 年度大会 (3月14日-17日, オンライン)
- 白木友博, 上條達哉, 新谷政己, 金原和秀. 2023. これまで見過ごされてきた PromA 群プラスミドの性状解析. 日本農芸化学会 2023 年度大会 (3月14日-17日, オンライン)
- 敦賀俊太, 梅木穂乃花, 上條達哉, 徳田真穂, 金原和秀, 新谷政己. 2023. 新規 IncP/P-1 群プラスミドの性状の分子遺伝学的比較. 日本農芸化学会 2023 年度大会 (3月14日-17日, オンライン)
- Shintani, M., Suzuki, H., Nojiri, H. & Suzuki, M. 2023. Behaviors of plasmids in different natural environments. Power of Microbes in Industry and Environment 2023 (May 18, Ploče, Croatia)

- Shintani, M., Suzuki, H., Nojiri, H. & Suzuki, M. 2023. *Pseudomonas* plasmids revisited: new insights and comprehensive analysis of their features for horizontal gene transfer. Bageco2023 (June 26-30, Copenhagen, Denmark)
- Tokuda, M., Tsuruga, S., Maeda, S., Yamazaki, R., Suzuki-Minakuchi, C., Nojiri, H., Kimbara, K. & Shintani. 2024. Prediction of the transconjugants of plasmids from nucleotide sequences. 10th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU2024) (March 6, online)
- 徳田真穂, 敦賀俊太, 前田壮, 山崎凜, 金原和秀, 新谷政己. 2024. プラスミドが接合伝達する細菌を塩基配列の特徴から予測する. 日本農芸化学会 2024 年度大会 (3月25日-28日, 東京)
- 新谷政己, 前田壮, 徳田真穂, 敦賀俊太, 上條達哉, 金原和秀. 2024. IncP/P-1 群プラスミドの異なる亜群に属するプラスミドの性状の違いとその原因の解析. 日本農芸化学会 2024 年度大会 (3月25日-28日, 東京)
- 磯貝菜々子, 徳田真穂, 水口千穂, 金原和秀, 野尻秀昭, 鈴木仁人, 新谷政己. 2024. *Pseudomonas* 属細菌由来のプラスミドの複製に必要な DNA 領域の同定. 日本農芸化学会 2024 年度大会 (3月25日-28日, 東京)
- 山崎凜, 徳田真穂, 敦賀俊太, 前田壮, 金原和秀, 新谷政己. 2024. プラスミドの接合伝達の可否と、プラスミドと細菌染色体間の塩基組成類似性の関係. 日本農芸化学会 2024 年度大会 (3月25日-28日, 東京)
- Tokuda, M., Tsuruga, S., Maeda, S., Yamazaki, R., Suzuki-Minakuchi, C., Nojiri, H., Kimbara, K. & Shintani, M. 2024. Development of a sequence-based prediction method to determine which bacteria receive plasmids by conjugation. International Symposium on Plasmid Biology 2024 (September 2-6, Hamamatsu, Japan)
- Shintani, M. 2024. Single-cell analysis of 'plasmid holders' in microbial communities. International Symposium on Plasmid Biology 2024 (September 2-6, Hamamatsu, Japan)
- 新谷政己. 2024. 薬剤耐性遺伝子を伝播するプラスミドの動態研究. 令和 6 年度「知」の集積による産学連携支援事業 事業化可能性調査、「カキ殻を利用した堆肥中の薬剤耐性菌削減に関する事前検討」第一回検討会 (10月9日, 岡山)
- Shintani, M., Nishimura, Y., Tokuda, M., Isogai, N. & Xie H. 2025. Development of a custom replicon typing database for the comprehensive classification of plasmids in *Pseudomonas*. Bageco2025 (July 1-4, Graz, Austria)

## 原著論文

- Suzuki, M., Suzuki, H., Nishimura Y., Nojiri, H., & Shintani M. 2025. Enhancing plasmid typing with MOB-typer: resolving IncP and other incompatibility group misclassifications in *Pseudomonas*. *Microbial Genomics*, 11, 001491.
- Nishimura, Y., Kaneko, K., Kamijo, T., Isogai, N., Tokuda, M., Xie, H., Tsuda, Y., Hirabayashi, A., Moriuchi, R., Dohra, H., Kimbara, K., Suzuki-Minakuchi, C., Nojiri, H., Suzuki, H., Suzuki, M. & Shintani, M. 2024. A large-scale phylogeny of replication initiation proteins illuminates plasmid macroevolutionary landscape. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.03.610885>.

## その他 (総説・書籍・特許など)

- Tokuda, M. & Shintani, M. 2024. Microbial evolution

through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microbial Biotechnology*, 17(1), e14408. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14408>.

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、JAMSTECの西村陽介先生、東京大学の野尻秀昭先生、水口千穂先生、謝暉先生、静岡大学の金原和秀先生、道羅英夫先生、森内良太先生、徳田真穂先生（現・東京都立大学）、産業技術総合研究所の陶山哲志先生、国立遺伝学研究所の谷澤靖洋先生、東北大学の津田雅孝先生、群馬大学の伊豫部志津子先生、La Trobe UniversityのSteve Petrovski先生に深く感謝いたします。

## 文 献

- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2240-2246.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115, 6506-6511.
- Boronin, A.M. (1992). Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent? *FEMS Microbiology Letters*, 100, 461-467.
- Bradley, D.E. (1983). Specification of the conjugative pili and surface mating systems of *Pseudomonas* plasmids. *Journal of General Microbiology*, 129, 2545-2556.
- Bryan, L.E., Semaka, S.D., Van den Elzen, H.M., Kinnear, J.E., & Whitehouse, R.L. (1973). Characteristics of R931 and other *Pseudomonas aeruginosa* R factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3, 625-637.
- Cain, D., & Holloway, B.W. (1984). Prime plasmids derived from the IncP-10 plasmid R91-5 in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, 24, 97-101.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 3895-3903.
- Davies, S., & Krishnapillai, V. (1990). DNA sequence analysis of the replication region of the *Pseudomonas aeruginosa* plasmid R91-5. *Journal of Genetics*, 69, 101-112.
- Eddy, S.R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Computational Biology*, 7, e1002195.
- Fricke, W.F., Welch, T.J., McDermott, P.F., Mammel, M.K., LeClerc, J.E., White, D.G., et al. (2009). Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *Journal of Bacteriology*, 191, 4750-4757.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 722-732.
- Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., & Keller, A. (2019). PLSDb: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D195-D222.
- Garcillán-Barcia, M.P., Redondo-Salvo, S., & de la Cruz, F. (2023). Plasmid classifications. *Plasmid*, 126, 102684.
- Garcillán-Barcia, M.P., Redondo-Salvo, S., Vielva, L., & de la Cruz, F. (2020). MOBscan: Automated annotation of MOB relaxases. *Methods in Molecular Biology*, 2075, 295-308.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 307-321.
- Haines, A.S., Jones, K., Cheung, M., & Thomas, C.M. (2005). The IncP-6 plasmid Rms149 consists of a small mobilizable backbone with multiple large insertions. *Journal of Bacteriology*, 187, 4728-4738.
- Hayakawa, M., Tokuda, M., Kaneko, K., Nakamichi, K., Yamamoto, Y., Kamijo, T., et al. (2022). Hitherto-unnoticed self-transmissible plasmids widely distributed among different environments in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 88, e0111422.
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., & Vinh, L.S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 518-522.
- Ingram, L., Sykes, R.B., Grinstead, J., Saunders, J.R., & Richmond, M.H. (1972). A transmissible resistance element from a strain of *Pseudomonas aeruginosa* containing no detectable extrachromosomal DNA. *Journal of General Microbiology*, 72, 269-279.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., Leipe, D.D., & Aravind, L. (2005). Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Research*, 33, 3875-3896.
- Jacoby, G.A. (1980). Plasmid determined resistance to carbenicillin and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Plasmids and Transposons* (pp. 83-96).
- Katoh, K., & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780.
- Kawalek, A., Kotecka, K., Modrzejewska, M., Gawor, J., Jagura-Burdzy, G., & Bartosik, A.A. (2020). Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1161, a PAO1 derivative with the ICEPae1161 integrative and conjugative element. *BMC Genomics*, 21, 14.
- Köhler, K.A.K., Rückert, C., Schatschneider, S., Vorhölter, F.-J., Szczepanowski, R., Blank, L.M., et al. (2013). Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain VLB120, a solvent-tolerant, styrene-degrading bacterium isolated from forest soil. *Journal of Biotechnology*, 168, 729-730.
- Larsen, B.B., Miller, E.C., Rhodes, M.K., & Wiens, J.J. (2017). Inordinate fondness multiplied and redistributed:

- The number of species on Earth and the new pie of life. *Quarterly Review of Biology*, 92, 229–265.
- 26) Llanes, C., Gabant, P., Couturier, M., Bayer, L., & Plesiat, P. (1996). Molecular analysis of the replication elements of the broad-host-range RepA/C replicon. *Plasmid*, 36, 26–35.
  - 27) Locey, K.J., & Lennon, J.T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 113, 5970–5975.
  - 28) Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., & Omori, T. (2003). Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *Journal of Molecular Biology*, 326, 21–33.
  - 29) Molano, L.-A.G., Hirsch, P., Hannig, M., Müller, R., & Keller, A. (2024). The PLSDB 2025 update: enhanced annotations and improved functionality for comprehensive plasmid research. *Nucleic Acids Research*. 53(D1), D189–D196.
  - 30) Neçşulea, A., & Lobry, J.R. (2007). A new method for assessing the effect of replication on DNA base composition asymmetry. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 2169–2179.
  - 31) Nishimura, Y., Kaneko, K., Kamijo, T., Isogai, N., Tokuda, M., Xie, H., et al. (2024). A large-scale phylogeny of replication initiation proteins illuminates plasmid macroevolutionary landscape. *bioRxiv*. doi:10.1101/2024.09.03.610885v3
  - 32) Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51, 381–395.
  - 33) Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., et al. (1994). Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP $\alpha$  plasmids: compilation and comparative analysis. *Journal of Molecular Biology*, 239, 623–663.
  - 34) Robertson, J., & Nash, J.H.E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, 4(8), e000206.
  - 35) Sagai, H., Hasuda, K., Iyobe, S., Bryan, L.E., Holloway, B.W., & Mitsuhashi, S. (1976). Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 573–578.
  - 36) Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - 37) Sawada, Y., Yaginuma, S., Tai, M., Iyobe, S., & Mitsuhashi, S. (1976). Plasmid-mediated penicillin  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9, 55–60.
  - 38) Schmartz, G.P., Hartung, A., Hirsch, P., Kern, F., Fehlmann, T., Müller, R., & Keller, A. (2022). PLSDB: advancing a comprehensive database of bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 50, D273–D278.
  - 39) Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M., & Scherzinger, E. (1989). Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 75, 271–288.
  - 40) Shintani, M., Yano, H., Habe, H., Omori, T., Yamane, H., Tsuda, M., & Nojiri, H. (2006). Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3206–3216.
  - 41) Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., et al. (2014). Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 138–145.
  - 42) Shintani, M., Suzuki, H., Nojiri, H., & Suzuki, M. (2022). Precise classification of antimicrobial resistance-associated IncP-2 megaplasmids for molecular epidemiological studies on *Pseudomonas* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77, 1203–1205.
  - 43) Shintani, M., Suzuki, H., Nojiri, H., & Suzuki, M. (2023). Reconsideration of the previously classified incompatibility groups of plasmids, IncP-1 and IncP-11. *Environmental Microbiology*, 25, 1071–1076.
  - 44) Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1, 784–791.
  - 45) Solovyev, V., & Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In R.W. Li (Ed.), *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (pp. 61–78). Nova Science Publishers.
  - 46) Steinegger, M., & Söding, J. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature Biotechnology*, 35, 1026–1028.
  - 47) Takahashi, Y., Shintani, M., Yamane, H., & Nojiri, H. (2009). The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole-degradative plasmids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 744–746.
  - 48) Tanizawa, Y., Fujisawa, T., & Nakamura, Y. (2018). DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics*, 34, 1037–1039.
  - 49) Tett, A., Spiers, A.J., Crossman, L.C., Ager, D., Ciric, L., Dow, J.M., et al. (2007). Sequence-based analysis of pQBR103, a representative of a unique, transfer-proficient megaplasmid resident in the microbial community of sugar beet. *The ISME Journal*, 1, 331–340.
  - 50) Tokuda, M., Suzuki, H., Yanagiya, K., Yuki, M., Inoue, K., Ohkuma, M., et al. (2020). Determination of plasmid pSN1216-29 host range and the similarity in oligonucleotide composition between plasmid and host chromosomes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1187.
  - 51) Tokuda, M., Yuki, M., Ohkuma, M., Kimbara, K., Suzuki, H., & Shintani, M. (2023). Transconjugant range of PromA plasmids in microbial communities is predicted by sequence similarity with the bacterial host chromosome. *Microbial Genomics*, 9, mgen001043.
  - 52) Woodcroft, B.J., Boyd, J.A., & Tyson, G.W. (2016). OrfM: a fast open reading frame predictor for metagenomic data. *Bioinformatics*, 32, 2702–2703.
  - 53) Yanagiya, K., Maejima, Y., Nakata, H., Tokuda, M., Moriuchi, R., Dohra, H., et al. (2018). Novel self-transmissible and broad-host-range plasmids exogenously captured from anaerobic granules or cow manure. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2602.

# 植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明

甲 斐 建 次

大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻  
〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

## Elucidation of the strategy of *Ralstonia solanacearum* that parasitizes not only plants but also fungi

Kenji Kai

Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University  
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531

*Ralstonia solanacearum* infects both plants and fungi. The *phc* quorum-sensing (QS) system of *Ralstonia* is important for parasitism of plants, because it enables invasion and proliferation within the host by ensuring appropriate activation of the QS system at each stage of infection. In this study, we confirmed that ralstonin A is important not only for *Fusarium oxysporum* (*Fo*) chlamydospore induction but also for *Ralstonia* biofilm formation on *Fo* hyphae. Exopolysaccharide I (EPS I) is also essential for biofilm formation, while the *phc* QS system controls the production of the factor. The present results advocate a new QS-dependent mechanism by which a bacterium invades a fungus.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum*, invasion, quorum sensing

### 緒 言

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* はナス科を中心に390種以上の植物に感染して、青枯病（萎凋、枯死）を引き起こすグラム陰性細菌である。その被害は甚大で、世界各地の熱帯および温帯地域で発生している。青枯病菌は、根の形成原基や傷口などから侵入し、細胞間隙でコロニー化をしつつ維管束系にまで到達する（Genin & Denny, 2012）。するとそこで、爆発的に増殖し、大量の細胞外多糖（EPS）を作る。細胞とEPSが物理的に導管内の通水を阻害し、植物を萎凋させ、最終的には枯死させる。本病の有効な化学防除法はなく、発生圃場では感染植物を除去するしかできないのが実情である。さらに、本病が発生した土壤には青枯病菌が長く生育し続けるため、再び青枯病が発生するリスクがある。そのため、本病の病原力発現機構と土壤における潜伏様式の解明は、適切な病害コントロールを達成する上でなくてはな

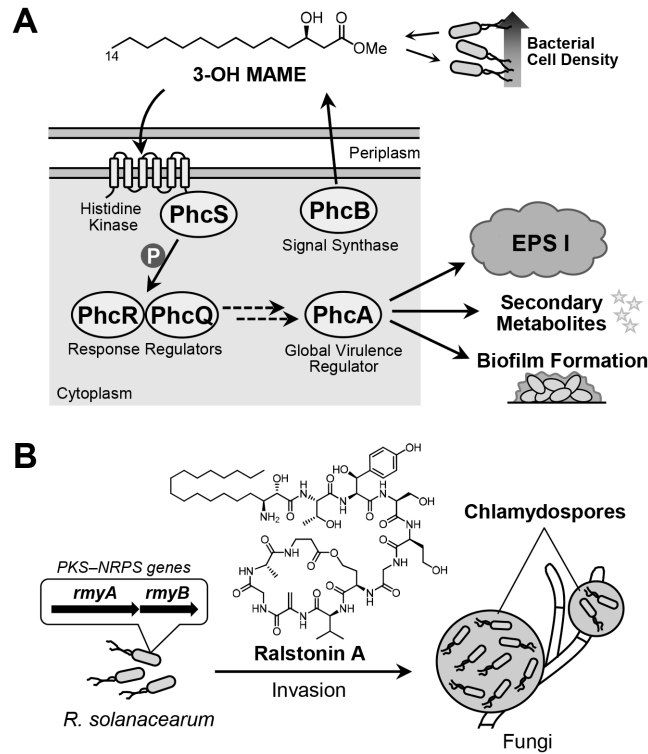
らない知見である。

青枯病菌の植物に対する病原力は、菌密度依存の遺伝子発現調節機構であるクオラムセンシング（QS）によって制御されている（Kai, 2023）。青枯病菌のQS機構は、Phcタンパク質群が関与するものであり、これは *Ralstonia* 属と近縁の一部の属にのみ限定されたユニークなシステムとなっている。QSシグナル分子合成酵素PhcBによりQSシグナル分子であるmethyl 3-hydroxymyristate（3-OH MAME）が生合成され、菌体外へと分泌される（Kai *et al.*, 2015; Ujita *et al.*, 2019）（Fig.1A）。菌密度が増加すると、環境中の3-OH MAME濃度が高まり閾値に達すると、ヒスチジンキナーゼPhcSに受容され、レスポンスレギュレーターPhcR/PhcQへとシグナルが伝達される。すると、ビルレンスレギュレーターであるPhcAが機能化し、様々な遺伝子の発現誘導が引き起こされる。このQS機構は、青枯病菌全遺伝子のおよそ30%を発現調節する。

2016年に、Kellerらによって衝撃的な論文が報告された。彼女らは、青枯病菌を色々な土壤真菌（いわゆるカビ）と共培養すると、青枯病菌が広範な真菌に対して厚膜胞子形成を誘導し、さらに青枯病菌が形成された胞子

E-mail: kenjikai@omu.ac.jp

共同研究者：大西 浩平（高知大学総合研究センター）、  
谷 修治（大阪公立大学大学院農学研究科）。



**Fig. 1** The *phc* QS system of *R. solanacearum* and its endoparasitism in fungi. (A) Schematic diagram of the *phc* QS system in *R. solanacearum* strain OE1-1. As bacterial density increases, 3-OH MAME concentrations rise, and the molecule is received by PhcS–PhcRQ. Then, PhcA is functionalized and induces the production of virulence factors, such as EPS I, secondary metabolites, and biofilms. (B) The possible endoparasitism of *R. solanacearum* coupled with chlamydospore induction. Ralstonin A synthesized by the PKS–NRPS induces chlamydospore formation in many fungi and may facilitate endoparasitism.

に寄生することを発見した (Spraker *et al.*, 2016). さらに, polyketide synthase–nonribosomal peptide synthetase (PKS–NRPS) をコードする *rmyA/rmyB* に変異が入ると厚膜胞子形成が消失し, 寄生能が失われることが確認され, この酵素の産物が青枯病菌が真菌に寄生する上での鍵分子として機能していることが示唆された (Fig.1B). しかし, 本物質は生産量が微量であったこと, 化学構造が複雑であったことから, 単離・構造決定には至らなかった. 当時, 筆者は別視点で *rmyA/rmyB* に注目して研究していたことから, 単離には既に成功し, いくつかの部分構造を明らかにしつつある状況であった. そこで, 研究を加速し, この厚膜胞子誘導因子の構造決定を達成し, ラルストニン類と名付けたリポペプチドの構造決定に成功した (Murai *et al.*, 2017). ラルストニンは, 試験菌を *Fusarium oxysporum* として厚膜胞子誘導能を調べると, 非常に低濃度で活性を示すことが分かった. また, *Aspergillus* 属に対しても厚膜胞子を誘導することが確認された. しかし, ラルストニンによる厚膜胞子形成が真菌への寄生に必須であるのかどうか, どのような

メカニズムを使って青枯病菌は真菌に寄生するのか, などについてはほとんど分かっていない状態であった. そこで本研究では, これらの問いに一定の解を見出すことを目指した.

## 実験方法

ナイロンネットサンドイッチアッセイ (Tsumori *et al.*, 2023)  
 GFP 発現ベクター (pDKS-gfp, カナマイシン耐性) を有する青枯病菌 (*R. solanacearum* OE1-1 株) を, カナマイシン (50µg/mL) を含む 2×BG 培地 (2mL) に接種し, 振盪培養で一晩培養した. ナイロンネットフィルター (細孔 11µm, 外径 47mm, Merck) を, カナマイシン (100µg/mL) を含む BG 寒天培地 (25mL, 90mm プラスチックディッシュ) (Tsumori *et al.*, 2023) の表面に配置した. ネットの上部に B 培地 (50µL) (Tsumori *et al.*, 2023) を加え, さらに別のナイロンネット (細孔 20µm, 外径 47mm, Merck) をその上に配置した. 青枯病菌細胞懸濁液 (5µL) と *F. oxysporum*

NBRC 31213 胞子懸濁液 (5 $\mu$ L) を、互いに 15mm 離れた位置に上部のネット上に滴下した。プレートを 30 $^{\circ}$ C で 3 日間培養した。上部のネットフィルターを培地から取り除き、MilliQ 水で十分に洗浄して *R. solanacearum* 細胞を除去した。カバーガラスで表面を擦り、厚膜胞子を回収した。回収した厚膜胞子を MilliQ 水 (0.5mL) で洗浄し、蛍光顕微鏡 (BZ-X810, Keyence) で観察した。各条件の侵入率 (% = 青枯病菌が侵入した厚膜胞子/総厚膜胞子  $\times$  100) は、3~5 枚のプレートから算出した。

#### バイオフィーム形成アッセイ (Tsumori *et al.*, 2023)

青枯病菌株を CPG 培地 (2mL) (Tsumori *et al.*, 2023) 中で 30 $^{\circ}$ C で一晚培養した。培養液を 2mL のチューブに移し、15,000 $\times g$  で 3 分間遠心分離した。古い培地を廃棄し、細菌細胞を CPG 培地 (1mL) に懸濁し、OD<sub>600</sub> を 0.1 に調整した。新しい CPG 培地 (95 $\mu$ L) と細菌細胞懸濁液 (5 $\mu$ L) を、96 ウェルマイクロタイタープレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルに分配した。プレートは Breathe-Easy シート (Sigma-Aldrich) で密封し、30 $^{\circ}$ C で 20 時間静置培養した。培養液に 1% (w/v) クリスタルバイオレット溶液 (25 $\mu$ L) を加え、室温で 25 分間放置した後、ピペットで過剰なクリスタルバイオレットを除去した。ウェルを MilliQ 水 (200 $\mu$ L) で 2 回洗浄し、エタノール (200 $\mu$ L) を加え、10 分間放置してクリスタルバイオレットを抽出した。溶液を平底 96 ウェルプレート (Iwaki) に移し、プレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) を用いて 595nm の波長で吸光度を測定した。

#### ガラスボトムディッシュアッセイ (Tsumori *et al.*, 2023)

熱した BG 寒天培地 (600 $\mu$ L, 1% (w/v) 寒天) をガラスボトムディッシュ (マツナミ) に入れた。冷却後、*F. oxysporum* の胞子懸濁液 (2 $\mu$ L) を BG 寒天の表面に滴下し、ディッシュを 30 $^{\circ}$ C で 36 時間培養した。BG 培地中の青枯病菌細胞懸濁液 (OD<sub>600</sub>=0.25, 2 $\mu$ L) を、ディッシュ内の *F. oxysporum* コロニーの表面にピペットで添加した。30 $^{\circ}$ C で 9 時間または 24 時間培養後、BG 培地をピペットで除去した。MilliQ 水 (1mL) で 2 回洗浄し、過剰な青枯病菌細胞を除去した。必要に応じて、洗浄前に染色操作を追加した。細胞外多糖 I (EPS I) の染色には DBA-FITC (VECTOR LABORATORIES)、細菌細胞の染色には SYTO9 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。ディッシュは蛍光顕微鏡 (BZ-X810) で観察した。

#### TEM 観察

ラルストニン A または OE1-1 株との共培養により誘

導された *F. oxysporum* の厚膜胞子を使用した。厚膜胞子の超微細構造解析は、Tokai-EMA (日本) において実施した。

#### 統計解析

平均値と標準誤差 (SEM) は、GraphPad Prism 6.0 を使用して計算した。有意水準は、GraphPad Prism 6.0 を使用して一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、その後、Tukey の多重比較検定または Dunnett の多重比較検定で評価した。

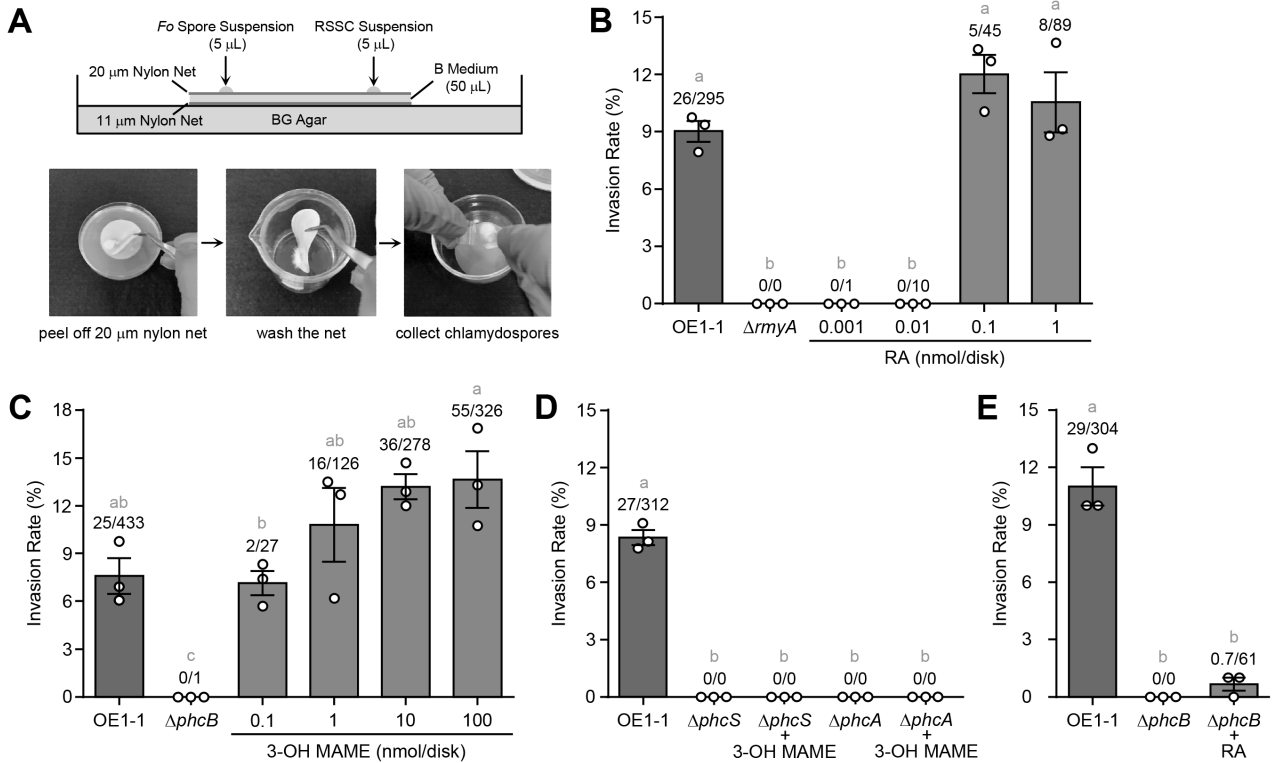
## 結 果

ラルストニンによる *F. oxysporum* の厚膜胞子形成は青枯病菌の真菌寄生に必須である

青枯病菌は *F. oxysporum* NBRC 31213 の厚膜胞子形成を誘導し、その後、誘導された厚膜胞子に侵入する (Kai, 2023)。 *F. oxysporum* 株は *Aspergillus* 属よりも厚膜胞子形成量が少ないため、顕微鏡観察に適している。 *F. oxysporum* の厚膜胞子へのこの細菌の寄生率を評価するため、恒常的 GFP 発現ベクター (pDSK-GFP) を用いたナイロンネットサンドイッチアッセイを開発した (Fig.2A)。この方法では、ナイロンネットを洗浄して過剰な青枯病菌細胞を除去し、形成された厚膜胞子をカバーガラスで回収することで、寄生率を効率的に算出できる。野生株 OE1-1 は、形成された厚膜胞子への寄生率が 8.8% であった (Fig.2B)。野生株の侵入率は、本論文で実施した実験全体を通じて約 10% であった。OE1-1 株のラルストニン欠損変異株 ( $\Delta$ rmvA) (Murai *et al.*, 2017) は、厚膜胞子の形成を誘導せず、内寄生を確立できなかった (Fig.2B)。外因性のラルストニン A は、 $\Delta$ rmvA の厚膜胞子形成と内寄生侵入を回復させた。これらの結果から、ラルストニン依存性の厚膜胞子形成は青枯病菌の胞子への侵入に必要であり、このアッセイは青枯病菌株の寄生率を定量的に評価できることが示された。

QS 欠損変異株は *F. oxysporum* の厚膜胞子への侵入能力を失う

青枯病菌の植物に対する病原性は、*phc* QS システムによって厳密に調節されている (Kai, 2023)。したがって、*phc* QS システムが青枯病菌と *F. oxysporum* の相互作用にも関与することを予想した。これを調べるため、QS シグナル合成酵素欠損変異株である  $\Delta$ phcB を使うことにした。 $\Delta$ phcB は *F. oxysporum* の厚膜胞子形成を誘導せず、菌糸への内寄生も確立しなかった (Fig.2C)。外因性の 3-OH MAME は、 $\Delta$ phcB の寄生率を用量依存的



**Fig. 2** Analysis of endoparasitism of *R. solanacearum* strain OE1-1 and its mutants in *F. oxysporum*. (A) A nylon net sandwich assay to evaluate the invasion rate of *R. solanacearum* strains. The images of assay plate (upper) and chlamydo spore recovery method (lower) are shown. (B) Invasion rates of *R. solanacearum* OE1-1 and  $\Delta rmyA$  into *F. oxysporum* chlamydo spores. The addition of ralstonin A (RA) rescued the invasion ability of  $\Delta rmyA$ . (C) Evaluation of the invasion ability of  $\Delta phcB$  into *F. oxysporum* chlamydo spores and the effect of 3-OH MAME. The addition of 3-OH MAME rescued the invasion ability of  $\Delta phcB$ . (D) Invasion rates of  $\Delta phcS$  and  $\Delta phcA$  and their response to 3-OH MAME (1 nmol/disc). (E) The effect of ralstonin A (0.1 nmol/disc) on the invasion of  $\Delta phcB$ . The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). The numbers above the bars indicate infected chlamydo spores/total chlamydo spores. The letters above the bars show a significant difference ( $p < 0.05$ , Tukey's test).

に回復させた。3-OH MAMEを添加した場合、 $\Delta phcB$ は野生株と類似した寄生率を示した。また、3-OH MAMEは高濃度で野生株よりも寄生率を増加させた。 $\Delta phcS$  (QSシグナル受容体欠損)と $\Delta phcA$  (病原力調節因子欠損)では、3-OH MAMEの有無に関わらず寄生能できなかった (Fig.2D)。これらの結果から、3-OH MAMEによって活性化される *phc* QSシグナル伝達は、*F. oxysporum*の厚膜胞子への青枯病菌侵入に重要であることが示唆された。

OE1-1株において、ラルストニンの産生は *phc* QSシステムによって制御されている。そこで、 $\Delta phcB$ および関連変異株の寄生能の喪失が、ラルストニンの産生欠損のみに起因するかどうかを確認した。その結果、ラルストニンAは多くの厚膜胞子の形成を誘導したが、この化合物は $\Delta phcB$ の寄生率をOE1-1株のレベルまで回復しなかった (Fig.2E)。ここで使用したラルストニンA

の濃度は、 $\Delta rmyA$ の侵入率を回復させた濃度と同じであった (Fig.2B)。したがって、*phc* QSシステムによって調節される他の因子 (または因子群) が、青枯病菌が真菌への寄生を確立するために不可欠であることが強く示唆された。

細胞外酵素およびタイプII/III分泌系は青枯病菌の侵入には関与しない

*F. oxysporum*の厚膜胞子に侵入するためには、青枯病菌細胞は物理的バリア (例:細胞膜や細胞壁)を克服する必要がある。予想通り、この細菌は2つのキチナーゼ遺伝子 (*RSp0275*と*RSp0924*)、3つのグルカナーゼ遺伝子 (*cbhA*, *egl*, および*RSc0818*)、および2つのリパーゼ (またはエステラーゼ) 遺伝子 (*RSp0138*と*RSp0161*)を保有していた (Salanoubat et al., 2022)。さらに、OE1-1と $\Delta phcB$ のRNA-Seq比較では、これらの遺伝子の発現

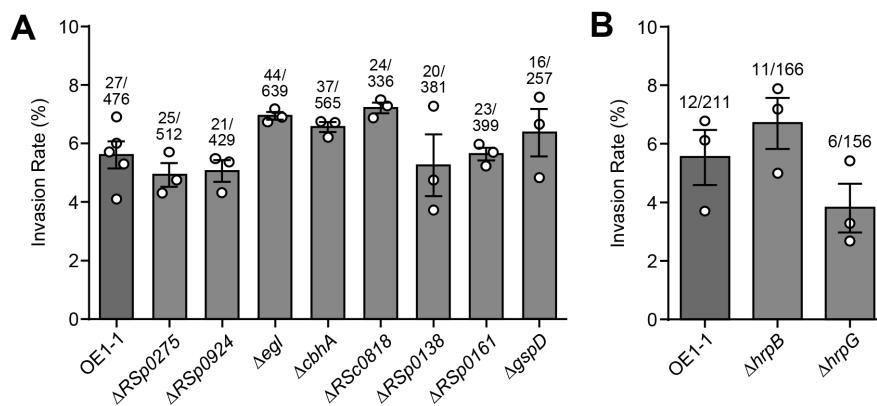
が *phc* QS システムによって制御されていることが示されていた (Ujita *et al.*, 2019). そこで、遺伝子欠失変異株を作製し、*F. oxysporum* の厚膜胞子への侵入能を評価した。しかし期待に反し、これらの欠失変異株は野生株とほぼ同じ割合で厚膜胞子に侵入した (Fig.3A)。多くの細胞外酵素 (未同定のものを含む) がタイプ II 分泌系 (T2SS) によって分泌されるため (Genin & Denny, 2012)、その欠損変異株 ( $\Delta gspD$ ; *gspD* は T2S 機械装置の重要なタンパク質をコードする) を作製し、侵入試験を実施した。 $\Delta gspD$  も OE1-1 株と類似した侵入率を示した (Fig.3A)。真菌の細胞膜や細胞壁は青枯病菌の侵入を阻害するバリアではない可能性、または完全に異なる方法を青枯病菌が使用している可能性が示唆された。したがって、細胞外酵素群は寄生因子として機能しないと結論付けた。

以前、*Mycetohabitans rhizoxinica*–*Rhizopus microsporus* 相互作用における III 型分泌系 (T3SS) の重要性が報告されている (Lackner *et al.*, 2011)。T3SS は、病原性グラム陰性細菌が宿主細胞に毒性タンパク質 (効果因子) を注入するために使用する特殊な注射器状のタンパク質輸送系であり、多くの場合、細菌の病原性において重要な役割を果たす (Deng *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2018)。青枯病菌において、T3SS 成分の発現は *phc* QS システムによって調節され、培養条件に応じて上調節または下調節される (Jacobs *et al.*, 2012; Perrier *et al.*, 2018)。T3SS が青枯病菌–*F. oxysporum* 相互作用における重要性を確認するため、 $\Delta hrpB$  および  $\Delta hrpG$  の寄生

率を調べた。*HrpB* と *HrpG* は青枯病菌の T3SS の正の調節因子であり、*hrpB* 遺伝子の転写は *HrpG* によって活性化される (Vasse *et al.*, 2000; Valls *et al.*, 2006)。*hrpB* 欠損株は、野生株と比較して *F. oxysporum* の厚膜胞子への侵入率に有意な減少を示さなかった (Fig.3B)。また、 $\Delta hrpG$  は依然として菌への侵入能を示した。これにより、青枯病菌は少なくとも侵入段階で T3SS を使用しないことが示された。全体として、*F. oxysporum* への青枯病菌の侵入メカニズムは、*M. rhizoxinica*–*R. microsporus* 相互作用におけるものとは異なった。*phc* QS システムによって制御される寄生因子は、依然として謎のままであった。

EPS I は青枯病菌が *F. oxysporum* の厚膜胞子に侵入する際に重要である

EPS I (青枯病菌の主要な細胞外多糖) と LecM (RS-IIL レクチン) の産生は、*phc* QS システムの活性化に依存している (Senuma *et al.*, 2020; Takemura *et al.*, 2021)。EPS とレクチンは、青枯病菌細胞の細胞外マトリックスを構成する可能性がある。EPS I と LecM の重要性を調べるため、EPS I 欠損株 ( $\Delta epsB$ ) と LecM 欠損株 ( $\Delta lecM$ ) の厚膜胞子への寄生率を調べた。これらの欠損変異株では *F. oxysporum* への寄生は観察されなかったが、遺伝子相補株 (*epsB*-comp と *lecM*-comp) は寄生した (Fig.4A)。筆者は以前、 $\Delta epsB$  と  $\Delta lecM$  では *phc* QS システムが適切に機能しないことを確認している (Hayashi *et al.*, 2019a, 2019b)。EPS I と LecM の真



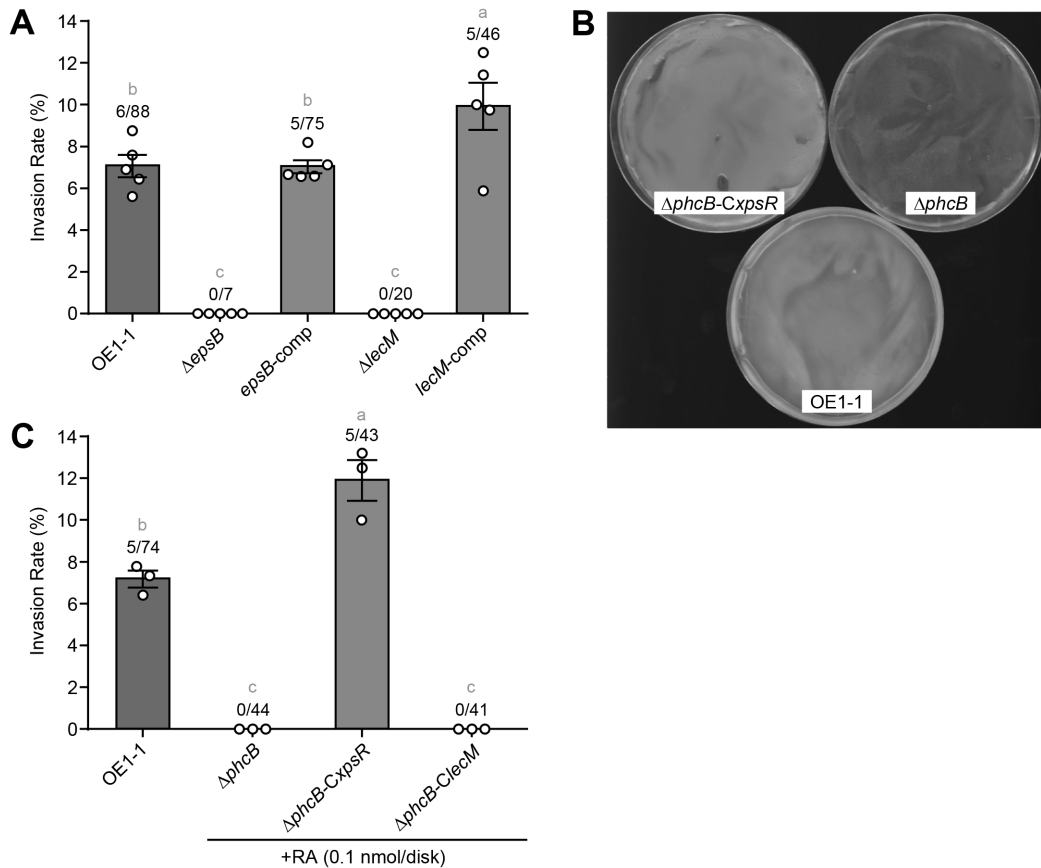
**Fig. 3** Evaluation of extracellular enzymes, T2SS, and T3SS on *R. solanacearum* endoparasitism in *F. oxysporum*. (A) Invasion rates of the gene-deletion mutants of extracellular enzymes and the T2SS component into *F. oxysporum* chlamydospores. Chitinase genes (*RSp0275* and *RSp0924*), glucanase genes (*cbhA*, *egl*, and *RSc0818*), lipase genes (*RSp0138* and *RSp0161*), and a T2SS machinery gene (*gspD*). (B) Invasion rates of  $\Delta hrpB$  and  $\Delta hrpG$  into *F. oxysporum* chlamydospores. The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  or 5). The numbers above the bars show infected spores/total spores. No statistically significant differences in data set values were recorded against the control ( $p$ -values for both strains were  $>0.05$ , Dennett's test).



の重要性を調べるため、これらの因子の生産を pDSK ベクターに組み込んだ *xpsR* と *lecM* で  $\Delta phcB$  に相補し (それぞれ  $\Delta phcB$ -*CxpsR* と  $\Delta phcB$ -*ClecM* とした), これらの遺伝子相補株の寄生率を調べた. *XpsR* は青枯病菌における *eps* 生合成遺伝子クラスターの転写調節因子であるため (Huang *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2000),  $\Delta phcB$ -*CxpsR* は EPS I を恒常的に産生した (Fig.4B). 寄生試験の結果, ラルストニン A 存在下で  $\Delta phcB$ -*CxpsR* は OE1-1 株よりも高い寄生率を示したが,  $\Delta phcB$  および  $\Delta phcB$ -*ClecM* は厚膜胞子に寄生できなかった (Fig.4C). ラルストニン A の添加なしでは,  $\Delta phcB$ -*CxpsR* は厚膜胞子形成の欠如により寄生を観察できなかった. したがって, EPS I の産生は *F. oxysporum* 厚膜胞子への青枯病菌の侵入に不可欠であることが分かった.

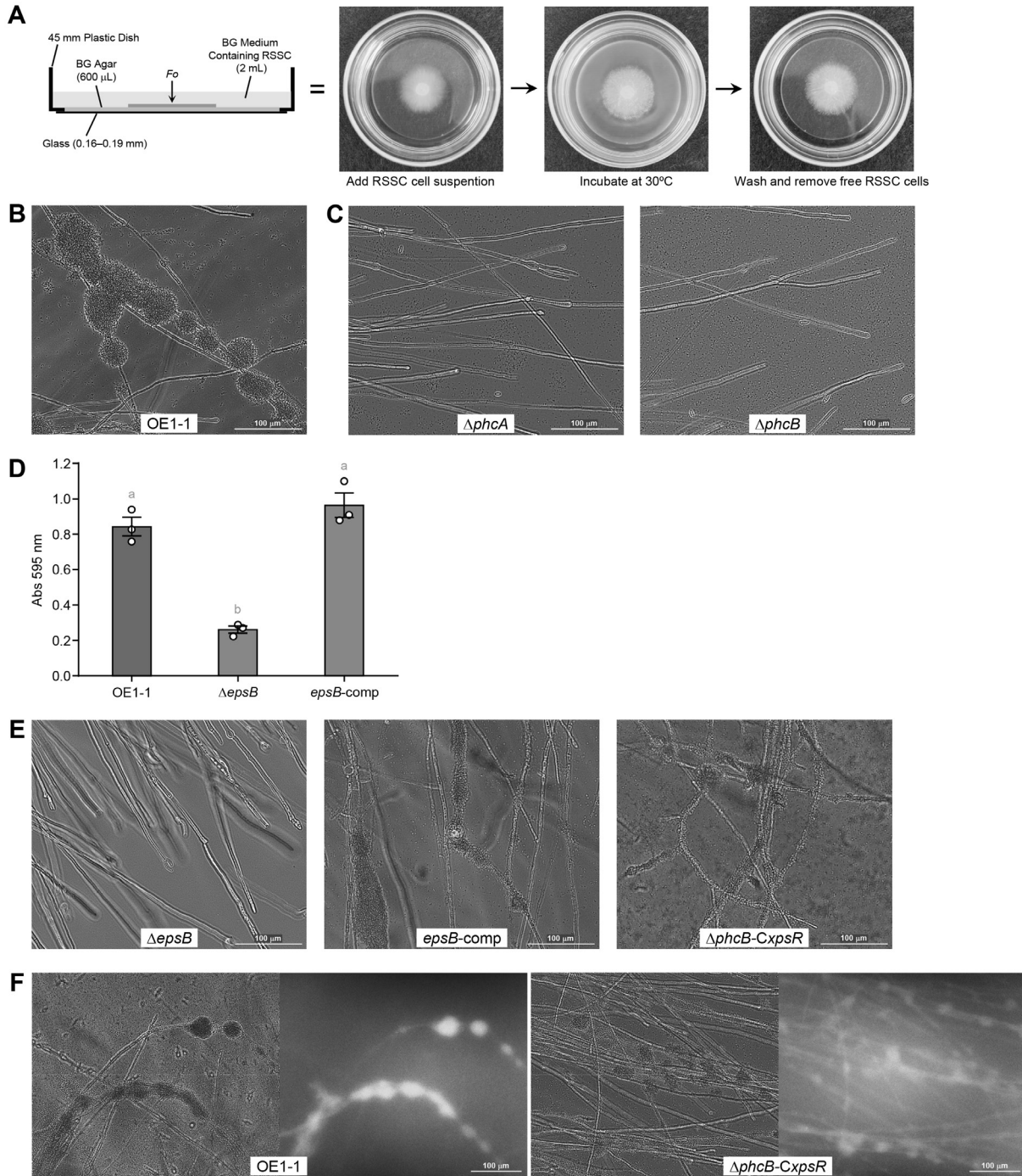
EPS I は青枯病菌が *F. oxysporum* の菌糸上にバイオフィルムを形成する際に重要である

EPS I が青枯病菌の寄生にどのように関与するかを調べるため, ガラスボトムディッシュでの共培養実験において OE1-1 と *F. oxysporum* NBRC 31213 の相互作用を観察し (Fig.5A), EPS I が関与する可能性のあるイベントを探した. その結果, 青枯病菌細胞は, 厚膜胞子の誘導前に菌糸上にバイオフィルム様構造を形成することが判明した (Fig.5B). これは, バイオフィルム形成が青枯病菌-*F. oxysporum* 相互作用に関与する可能性を示唆した. QS 欠損変異株である  $\Delta phcA$  と  $\Delta phcB$  は, *F. oxysporum* の菌糸に付着せず, またそこでバイオフィルムを形成しなかった (Fig.5C). したがって, *phc* QS システム (Perrier *et al.*, 2018; Ujita *et al.*, 2019) によって調節される細胞の付着とバイオフィルム形成は, 青枯病菌が *F.*



**Fig. 4** Effects of EPS I and LecM on the endoparasitism of *R. solanacearum* in *F. oxysporum*. (A) Invasion rates of  $\Delta epsB$ , *epsB*-comp,  $\Delta lecM$ , and *lecM*-comp into *F. oxysporum* chlamydo spores. (B) The colonies of  $\Delta phcB$ -*CxpsR*,  $\Delta phcB$ , and OE1-1 on BG agar plates. EPS I quantities differed among strains ( $\Delta phcB$  < OE1-1 <  $\Delta phcB$ -*CxpsR*). (C) Invasion rates of  $\Delta phcB$ ,  $\Delta phcB$ -*CxpsR*, and  $\Delta phcB$ -*ClecM* into *F. oxysporum* chlamydo spores. Ralstonin A (RA) was used to induce *F. oxysporum* chlamydo spores. The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  or 5). The numbers above the bars show infected spores/total spores. The letters above the bars show significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey's test).

植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明



**Fig. 5** Importance of EPS I on *R. solanacearum*'s biofilm formation on *F. oxysporum* hyphae. (A) A glass-bottom dish assay to observe the interaction between *R. solanacearum* and *F. oxysporum*. The images of the assay plate (left) and the assay method (right) are shown. (B) The biofilms of *R. solanacearum* OE1-1 on *F. oxysporum* hyphae. *R. solanacearum* cells form biofilms like a grape cluster on the hyphae. (C) The photos of coculturing of *F. oxysporum* with  $\Delta phcA$  and  $\Delta phcB$ . These mutants did not form biofilms. (D) The biofilms of *R. solanacearum* OE1-1,  $\Delta epsB$ , and *epsB-comp* on a plastic plate. The vertical axis represents the amount of biofilm as the absorbance of the recovered crystal violet. The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). The letters above the bars shows significant differences ( $p<0.05$ , Tukey's test). (E) The photos of coculturing of *F. oxysporum* with  $\Delta epsB$ , *epsB-comp*, and  $\Delta phcB-CxpsR$ . The biofilm formation was observed in *epsB-comp* and  $\Delta phcB-CxpsR$ . (F) DBA-FITC staining of the biofilms of OE1-1 and  $\Delta phcB-CxpsR$ . The bright field image is on the left, and the fluorescence image is on the right. RSSC = *R. solanacearum* species complex.

*oxysporum* に寄生する上で必須の特性であることが強く示唆された。

青枯病菌細胞の固体表面（例えばプラスチック）への付着とそこでバイオフィームを形成する能力は、EPS I の産生量に依存している（Fig.5D）（Mori *et al.*, 2018）。しかし、EPS I が青枯病菌の菌糸への付着やバイオフィーム形成に関与するかどうかは不明であった。*epsB* の欠失または相補の影響は、*F. oxysporum* との共培養試験で評価した。*epsB* 欠失株 ( $\Delta epsB$ ) は *F. oxysporum* 菌糸体上でバイオフィームを形成しなかったが、*epsB* 遺伝子の相補後にはバイオフィームを形成した（Fig.5E）。注目すべきは、 $\Delta phcB$ -*CxpsR* は *F. oxysporum* の菌糸上で高頻度でバイオフィームを形成したが、バイオフィームの厚さは野生株よりも薄かったことである。したがって、EPS I 量が上昇しても、他の因子（例えば *LecM*）が欠如しているため、バイオフィームが成熟しないものと予想された。さらに、EPS I の蛍光染色を DBA-FITC (*Dolichos biflorus* agglutinin,  $\alpha$ -結合型 *N*-アセチルガラクトサミンに特異的なレクチン)（Hendrickson *et al.*, 2019）を用いて実施したところ、OE1-1 および  $\Delta phcB$ -*CxpsR* バイオフィームにおいて FITC 由来の蛍光が観察された（Fig.5F）。これにより、EPS I は *F. oxysporum* 菌糸上の青枯病菌バイオフィームの主要なマトリックス成分であることが示された。すなわち、EPS I の産生は、*F. oxysporum* 菌糸上の青枯病菌細胞のバイオフィーム形成に不可欠であることが明確に示された。

EPS I の質と量は青枯病菌の *F. oxysporum* への寄生に重要である

我々は、青枯病菌細胞の EPS I 依存性バイオフィーム形成が、*F. oxysporum* への寄生に必要である可能性を予想した。これを検証するため、EPS I の生合成に関わる酵素を欠損させた変異株の寄生能を評価した。具体的には、EPS I の部分構造を変化させる変異株を用いた（Fig.6A）。RSp1012 は LpxA 様タンパク質で、EPS I の 2,4-ジアミノ-2,4,6-トリデオキシガラクトース基に 3-ヒドロキシブタン酸を転移する（Raetz *et al.*, 1995）。 $\Delta RSp1012$  は、野生株より流動性の低い EPS I を生成した（Fig.6B）。変異株は *F. oxysporum* の菌糸上で OE1-1 よりも脆いバイオフィームを形成し、その厚さが薄くなった（Fig.6C, 上）。 $\Delta RSp1012$  は野生株とほぼ同じ率で *F. oxysporum* に寄生した（Fig.6D）。*N*-アセチル転移酵素をコードする遺伝子 *RSp1007* の欠失（Fig.6A）（Whitfield *et al.*, 2015）は、EPS の生産量を減少させ、変異株の *F. oxysporum* 厚膜胞子への寄生能を失わせたようであった（Fig.6B および D）。ラルストニンの生産量は  $\Delta RSp1007$  で減少した。これは、 $\Delta epsB$  と  $\Delta lecM$  で観

察された QS 機構へのフィードバック阻害が引き起こした可能性が考えられた（Hayashi *et al.*, 2019a, 2019b）。そこで、 $\Delta RSp1007$  のラルストニン A を用いた侵入試験を実施した。その結果、わずかな寄生率の回復が観察されたが、野生株のレベルには達しなかった（Fig.6E）。ガラスボトムディッシュアッセイでは、 $\Delta RSp1007$  は *F. oxysporum* の菌糸上に剥がれやすいバイオフィームを形成し、その形成頻度はやや減少した（Fig.6C, 下）。プラスチックアッセイプレートを用いたバイオフィーム試験では、両変異株は  $\Delta phcB$  よりもやや多くのバイオフィームを形成したが、OE1-1 と比較して量は大幅に減少した（Fig.6F）。プラスチック上のバイオフィームは、EPS I の質と量により大きく影響を受けた可能性が高かった。総合すると、細胞間接着物質として機能する EPS I は、青枯病菌が *F. oxysporum* に寄生し、適切な QS 活性化を駆動するために不可欠であることが示された。

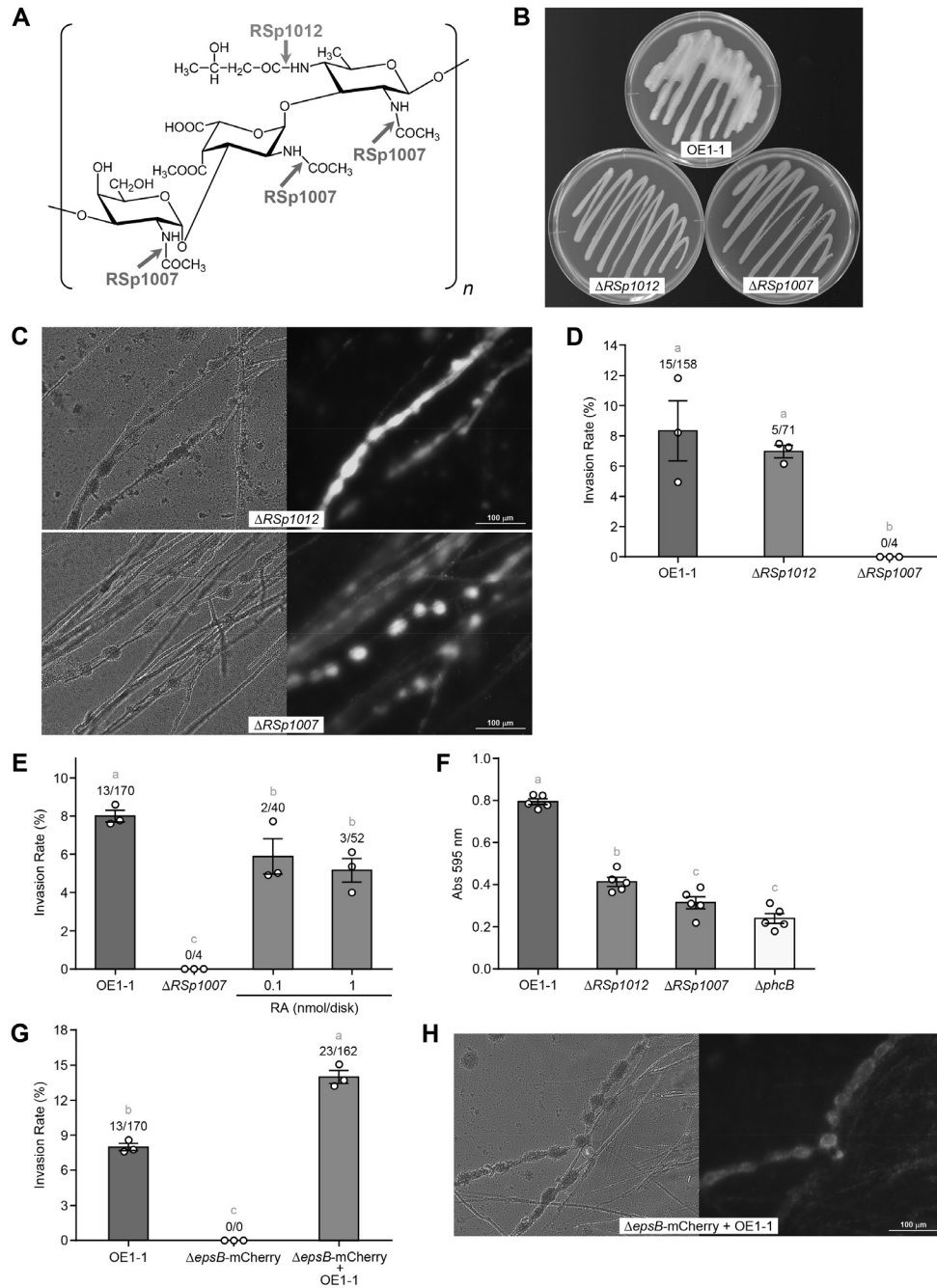
$\Delta epsB$  細胞は野生型青枯病菌細胞が産生する EPS I を利用する

EPS I 欠損細胞が青枯病菌細胞によって産生された EPS I を利用するかを確認するため、 $\Delta epsB$  と OE1-1 を混合し、*F. oxysporum* における  $\Delta epsB$  の寄生性を調べた。 $\Delta epsB$  と野生型細胞を区別するため、 $\Delta epsB$  に mCherry タンパク質を発現させた ( $\Delta epsB$ -mCherry とする)。共培養実験から得られた *F. oxysporum* の厚膜胞子において mCherry 由来の蛍光が観察され、 $\Delta epsB$ -mCherry が厚膜胞子に取り込まれることが確認された（Fig.6G）。さらに、侵入率は野生株よりも高かった。次に、共培養アッセイにおいて、 $\Delta epsB$  が OE1-1 のバイオフィームに取り込まれるかどうかを調べた。 $\Delta epsB$ -mCherry と野生株は、*F. oxysporum* の菌糸上に成熟したバイオフィームを形成したが、変異株の取り込みはバイオフィームごとに異なった（Fig.6H）。*E. coli* DH5 $\alpha$ -mCherry (*E. coli* DH5 $\alpha$  株に mCherry タンパク質を恒常的に発現するようにした株) と OE1-1 の混合物を *F. oxysporum* と共培養した際、*E. coli* 株は青枯病菌バイオフィームや *F. oxysporum* の厚膜胞子に組み込まれなかった（data not shown）。これらの結果は、 $\Delta epsB$  が *F. oxysporum* の厚膜胞子に寄生したことを示唆しており、OE1-1 由来の周囲の EPS I をバイオフィームマトリックスとして利用したと予想した。この特性は他の細菌（例えば *E. coli*）では再現できなかった。

ラルストニンは青枯病菌の *F. oxysporum* 菌糸体上のバイオフィーム形成にも関与する

ラルストニンようなりポペプチドはグラム陰性細菌のバイオフィーム形成にバイオサーファクタントとして関

植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明



**Fig. 6** Role of EPS I structure in endoparasitism of *R. solanacearum* toward *F. oxysporum* and recovery of  $\Delta epsB$  endoparasitism by EPS I from the OE1-1 strain. (A) EPS I structure produced by *R. solanacearum* strains. RSp1012 and RSp1007 are involved in transfer reactions at the positions shown by the arrows. (B) A photo image of *R. solanacearum* OE1-1,  $\Delta RSp1012$ , and  $\Delta RSp1007$  grown on BG agar plates. Colony liquidity derived from EPS I is significantly reduced in  $\Delta RSp1012$  and  $\Delta RSp1007$ . (C) The biofilms of  $\Delta RSp1012$  and  $\Delta RSp1007$  on *F. oxysporum* hyphae. SYTO9 was used to stain bacterial cells. The bright field image is on the left, and the fluorescence image is on the right. (D) Invasion rates of OE1-1,  $\Delta RSp1012$ , and  $\Delta RSp1007$  into *F. oxysporum* chlamydospores. (E) The effect of ralstonin A (RA) on  $\Delta RSp1007$  invasion into *F. oxysporum* chlamydospores. (F) OE1-1,  $\Delta RSp1012$ ,  $\Delta RSp1007$ , and  $\Delta phcB$  biofilms on plastic plates. The vertical axis represents the amount of biofilm as the absorbance of the recovered crystal violet. (G) Invasion rates of OE1-1,  $\Delta epsB$ -mCherry, and  $\Delta epsB$ -mCherry cocultured with OE1-1 into *F. oxysporum* chlamydospores. (H) The biofilm formation by OE1-1 and  $\Delta epsB$ -mCherry on *F. oxysporum* hyphae. The bright field image is on the left, and the fluorescence image is on the right. The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  or  $5$ ). The numbers above the bars show infected spores/total spores. The letters above the bars show significant differences ( $p<0.05$ , Tukey's test).

与している (Raaijmakers *et al.*, 2010; Roongsawang *et al.*, 2011). そこで、ラルストニンが青枯病菌細胞のバイオフィーム形成に関与するかどうかを調査した。Δ*ArmyA* は *F. oxysporum* の菌糸上にバイオフィームを形成せず、ラルストニン A の添加 (0.1 および 1 μM) によりバイオフィーム形成が部分的に回復した (Fig. 7A). しかし、10 μM ではバイオフィームは観察されず、代わりにラルストニン A 濃度の上昇により厚膜胞子の形成が加速した。プラスチックアッセイプレートを用いたバイオフィーム形成アッセイでは、Δ*ArmyA* は野生株よりもバイオフィームが少なく、ラルストニンの添加により Δ*ArmyA* のバイオフィーム形成が回復した (Fig. 7B). プレートアッセイでは、10 μM のラルストニン A はバイオフィーム形成を阻害しなかった。これらの結果は、高濃度のラルストニン A または形成された厚膜胞子が、*F. oxysporum* のバイオフィーム形成に対して阻害作用を有する可能性を示唆した。したがって、ラルストニンは *F. oxysporum* の菌糸体における青枯病菌バイオフィーム形成に重要な役割を果たしている結論付けた。

一部の青枯病菌株は、ラルストニンと異なる構造を有するラルストペプチンまたはラルストアミドを産生する (Komatsu *et al.*, 2020; Matsukawa *et al.*, 2023). ラルストニン以外の青枯病菌リポペプチドは、強い厚膜胞子誘導活性を示さなかった (Matsukawa *et al.*, 2023). これらの化合物が *F. oxysporum* 菌糸体上の青枯病菌バイオフィーム形成に関与しているかどうかを調べるため、ラルストニン、ラルストアミド、またはラルストペプチドを産生する他の青枯病菌株を *F. oxysporum* と共培養した。ラルストニンを産生する MAFF 211471 と GMI1000 は、OE1-1 に近い寄生率を示したが、ラルストアミドを産生する株 (MAFF 211479 と MAFF 211516) およびラルストペプチンを産生する株 (MAFF 211519) は、寄生を確立できなかった (Fig. 7C). これは、MAFF 211479, MAFF 211516 および MAFF 211519 を用いた試験において、厚膜胞子の形成がほとんどまたは全く起こらなかったためと考えられた。これらの MAFF 株は、ガラスボトムティッシュアッセイにおいて菌糸上にバイオフィームを形成したが、その形成量は株によって異なった (Fig. 7D). Δ*ArmyA*<sub>211519</sub> (MAFF 211519 のラルストペプチン欠損変異株) および Δ*rama*<sub>211479</sub> (MAFF 211479 のラルストアミド欠損変異株) は、バイオフィームを形成する能力を失っていることが判明した (Fig. 7E). したがって、ラルストアミドとラルストペプチンもバイオフィーム形成に寄与することが示された。これらの MAFF 株を OE1-1 と共に *F. oxysporum* への寄生試験を行ったところ、MAFF 211516 と MAFF 211519 は OE1-1 株とほぼ同等の寄生率を示した (Fig. 7F). OE1-1 株由

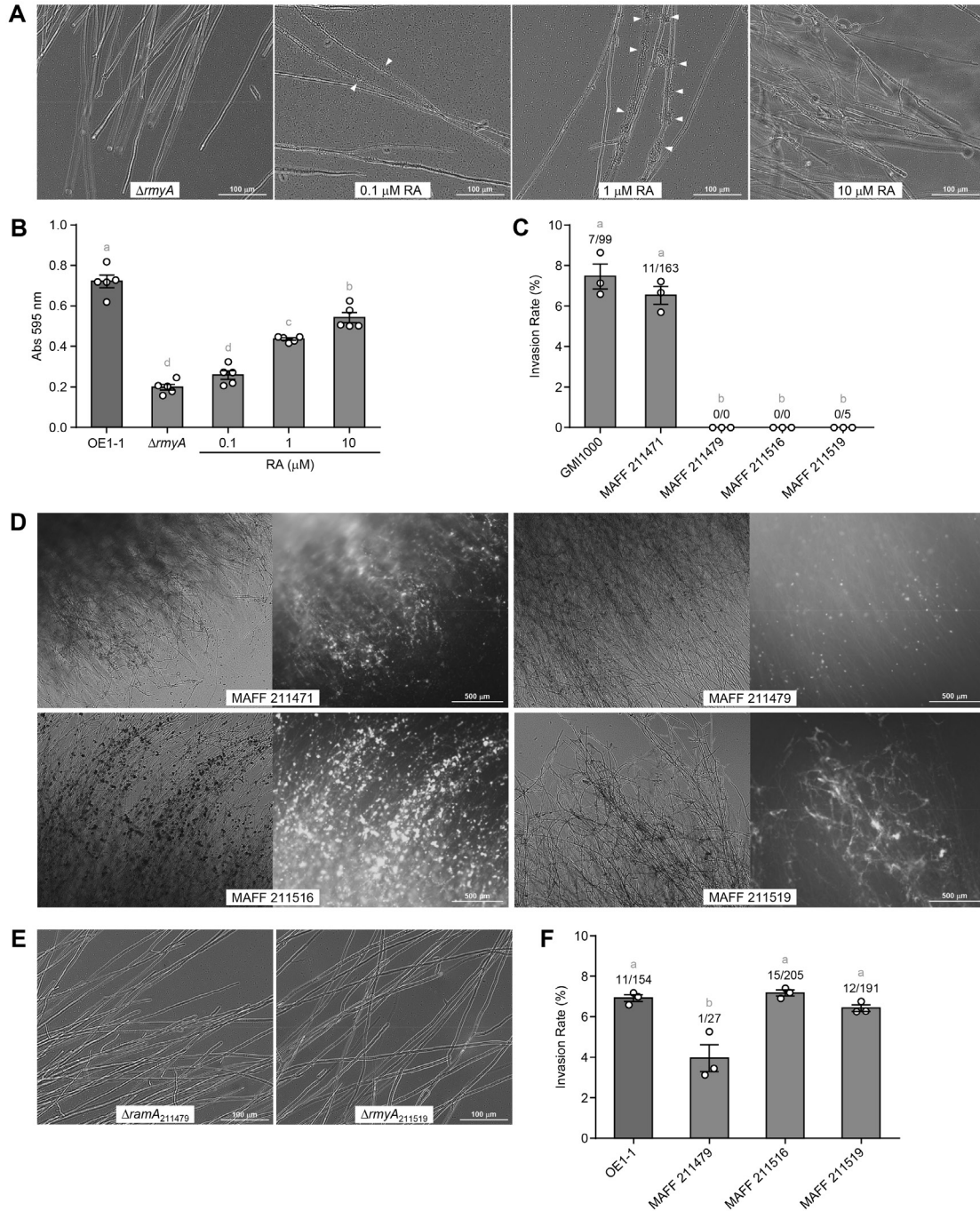
来のラルストニン A が *F. oxysporum* の厚膜胞子を誘導し、最終的に MAFF 株が胞子に侵入するのを可能にしたと考えられた。MAFF 211479 は、OE1-1 が存在しても侵入能が低いように見えた。青枯病菌の植物に対する病原性は株によって異なるように、*F. oxysporum* に寄生する能力も株によって異なる可能性がある。また、MAFF 株の EPS I の質と量は、OE1-1 株と異なる可能性がある。全体として、青枯病菌株が産生するリポペプチドは、*F. oxysporum* の菌糸体上のバイオフィーム形成に重要であることを示唆した。

#### 青枯病菌感染は *F. oxysporum* 厚膜胞子を殺す

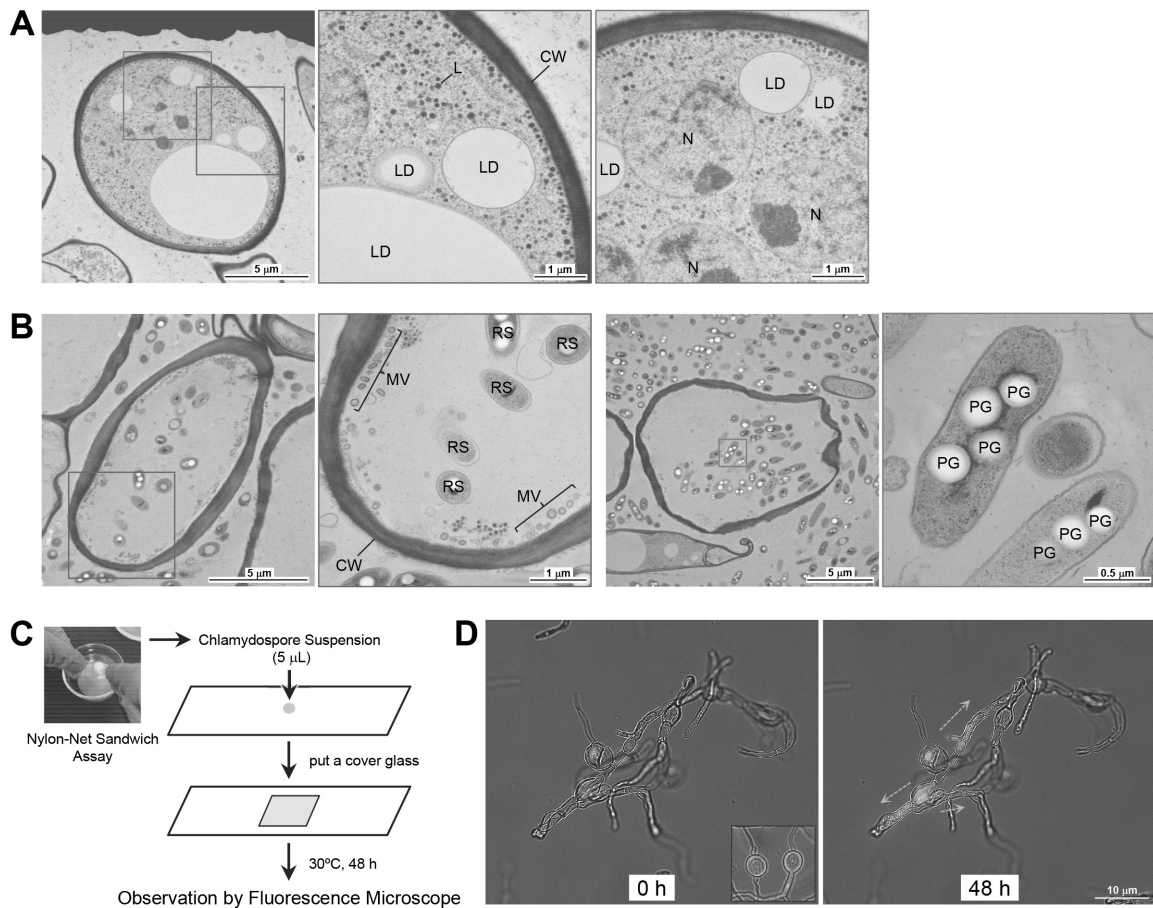
青枯病菌に感染した厚膜胞子の TEM 観察は、青枯病菌の侵入メカニズムおよび侵入後の行動に関する洞察を提供するものと期待された。ラルストニン A によって誘導された厚膜胞子の TEM 観察では、構造が以前に報告されたものとはほぼ同一であることが示された (Fig. 8A) (Li *et al.*, 2012). 特に、細胞壁は厚く、大きな脂質滴、核、リボソームが胞子内に観察された。次に、青枯病菌が感染した *F. oxysporum* の厚膜胞子を TEM で観察した。*F. oxysporum* と OE1-1 株を 3 日間共培養後に形成された厚膜胞子の TEM 観察では、胞子の細胞膜が破壊され、膜小胞に変化したことが確認されました (Fig. 8B). さらに、脂質滴や核などの細胞小器官が消失し、厚膜胞子内に青枯病菌細胞が少数から多数観察された。青枯病菌細胞内には大きなポリヒドロキシアルカン顆粒が観察され、厚膜胞子の内容物が栄養源として利用されている可能性が示唆された。これらの結果から、厚膜胞子は青枯病菌の感染と増殖により死ぬことが示された。

TEM 解析で観察された *F. oxysporum* 厚膜胞子の細胞死が、未固定厚膜胞子でも観察されるかどうかを調べた。蛍光顕微鏡を使って厚膜胞子を観察した (Fig. 8C). OE1-1 株を感染させた *F. oxysporum* の厚膜胞子をガラススライド上で培養し、OE1-1 由来の GFP 蛍光を時間経過とともに観察した。青枯病菌細胞が感染した厚膜胞子内において増殖し、周辺の菌糸へ移動することが確認された (Fig. 8D). 注目すべきは、厚膜胞子内の細胞膜と見られる構造が細胞壁から脱離し、ベシクル状になっていた点である。一方、ラルストニン A によって誘導された厚膜胞子はほぼ球形であり、細胞膜と細胞壁の分離の兆候は認められなかった (Fig. 8D, 挿入図). したがって、青枯病菌細胞によって感染した厚膜胞子は死滅しており、細菌が周囲の菌糸へ移動可能であると考えられた。

植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明



**Fig. 7** The importance of lipopeptides on *R. solanacearum*'s endoparasitism in *F. oxysporum*. (A) Ralstonin-dependent recovery of biofilm formation in  $\Delta rmyA$ . White arrow heads indicate biofilms. Ralstonin A (RA) supplement at  $10\mu\text{M}$  caused the chlamyospore formation of *F. oxysporum*. (B) Biofilm formation of  $\Delta rmyA$  on a plastic plate and its response to ralstonin A. The vertical axis represents the amount of biofilm as the absorbance of the recovered crystal violet. (C) Invasion rates of the wild-type *R. solanacearum* strains into *F. oxysporum* chlamyospores. GMI1000 and MAFF 211471 produce ralstonins, MAFF 211479 and MAFF 211516 produce ralstoamides, and MAFF 211519 produces ralstopeptins. (D) The biofilms of MAFF strains on *F. oxysporum* hyphae. SYTO9 was used to stain the bacterial cells. The bright field image is on the left, and the fluorescent image is on the right. (E) Lack of biofilm formation ability in  $\Delta ramA_{211479}$  and  $\Delta rmyA_{211519}$  on *F. oxysporum* hyphae. (F) Acquisition of endoparasitic ability of MAFF strains by coculturing with OE1-1. Only OE1-1 is a positive control. The error bars show the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). The numbers above the bars show infected spores/total spores. The letters above the bars show significant differences ( $p<0.05$ , Tukey's test).



**Fig. 8** Microscopic observation of intact and infected *F. oxysporum* chlamydospores. (A) TEM images of *F. oxysporum* chlamydospores induced by ralstonin A treatment. N: nuclear, LD: lipid droplet, L: liposome, CW: cell wall. (B) TEM images of *F. oxysporum* chlamydospores infected with OE1-1. RS: RSSC cell, MV: membrane vesicle, PG: polyhydroxyalkanoate granule. (C) Preparation of a sample for the observation of RSSC behavior in *F. oxysporum* chlamydospores. (D) Fluorescence observation of infected chlamydospores immediately after collection and 48h later. Inset shows the chlamydospores induced by ralstonin A.

## 考 察

本研究は、*phc* QS システムが *F. oxysporum* への青枯病菌の寄生に重要であることを示した。Δ*phcB* 株は、ラルストニンの産生能力と *F. oxysporum* の厚膜胞子への寄生能力の両方を失った。これらの欠損は外因性の 3-OH MAME によって回復したが、ラルストニン A では回復しなかった。遺伝子欠失変異株と相補変異株の解析から、ラルストニンに加え、EPS I が重要な寄生因子であることが示された。さらに、EPS I とラルストニンは、*F. oxysporum* の菌糸上での青枯病菌バイオフィーム形成に必要であった。また、バイオフィーム形成も、この寄生に不可欠であることが分かった。

これらの結果に基づき、我々は青枯病菌細胞が誘導した *F. oxysporum* 厚膜胞子に侵入するメカニズムを提案する (Fig.9)。青枯病菌細胞は、*F. oxysporum* の菌糸に対して正の化学走性を見せると予想される。付着後、青枯病菌細胞は *phc* QS システムを活性化し始める。その結果、EPS I、ラルストニンを産生し、同時にバイオフィームを形成する。細菌細胞が増加し QS システムが完全に活性化されると、バイオフィームが成熟し、ラルストニンの産生量が増加する。*F. oxysporum* の厚膜胞子が形成されると、青枯病菌細胞はバイオフィームから分離し、一部の胞子に侵入する。侵入後、青枯病菌細胞は胞子の内容物を栄養源として利用し増殖する。感染により厚膜胞子が死滅し、青枯病菌細胞は周囲の菌糸へ移動を

植物だけでなく真菌にも寄生する青枯病菌の感染戦略の解明

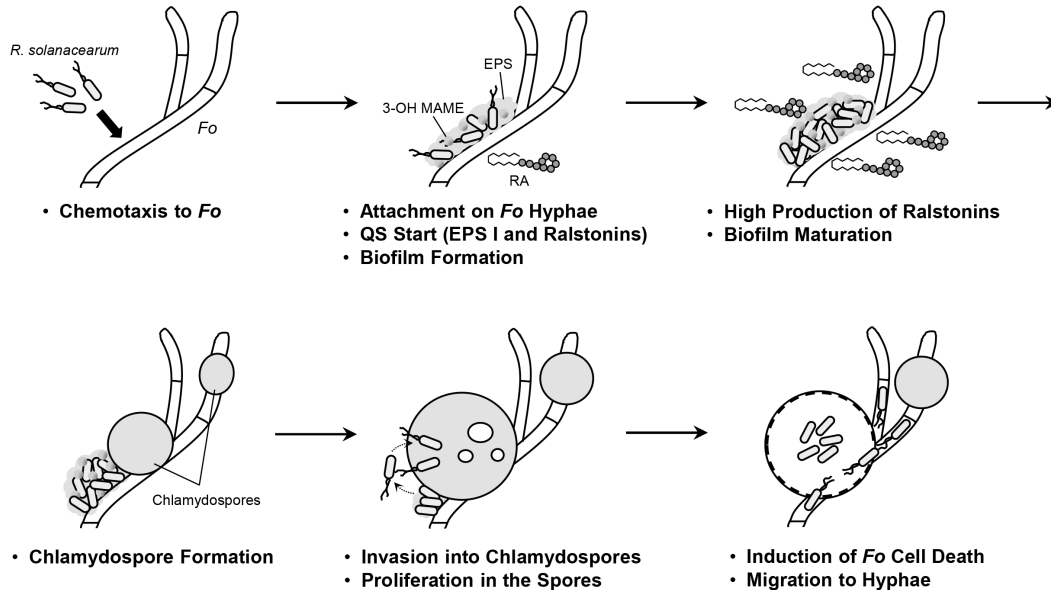


Fig. 9 Proposed mechanism of *R. solanacearum*'s endoparasitism in *F. oxysporum*. Fo: *F. oxysporum*, RA: ralstonin A.

開始する。

青枯病菌株の *phc* QS は、植物への寄生における重要なシステムであり、感染の各段階で適切に活性化され、宿主内への侵入と増殖を可能にする (Schell, 2000; Genin & Denny, 2012)。例えば、*phc* QS システムは、植物感染に必要な病原因子 (EPS I や植物細胞壁分解酵素) の産生を調節するだけでなく、感染段階に適応するための代謝変化を引き起こす (Jacobs *et al.*, 2012; Perrier *et al.*, 2018)。我々は、青枯病菌の *F. oxysporum* に対する内寄生において、*phc* QS システムが菌糸上のバイオフィーム形成を調節し、*F. oxysporum* の厚膜胞子形成を誘導することを発見した。これらのイベントの鍵となるラルストニンと EPS I の生産は、QS 制御下にある。一方、*phc* QS システムによって調節される T2SS と T3SS (Jacobs *et al.*, 2012; Perrier *et al.*, 2018) は、この内寄生において必須ではなかった。これは、*M. rhizoxinica* が *R. microsporus* の菌糸に侵入する戦略とは異なっていた (Lackner *et al.*, 2011)。HrpG は T3SS に関わる因子であるが、QS 依存性因子 (EPS I など) の生成に部分的に関与することも報告されており (Valls *et al.*, 2006)、これは  $\Delta hrpG$  株で観察された厚膜胞子に対する寄生率のわずかな減少を説明できるかもしれない。

これまでにも、細菌が真菌の菌糸上にバイオフィームを形成することは報告されてきた (Hogan & Kolter, 2002; Zhang *et al.*, 2018; Shama *et al.*, 2021)。私たちは今回初めて、バイオフィームが真菌への内寄生で重要であることを見出した。特に、EPS I とラルストニンは、青

枯病菌が *F. oxysporum* の菌糸上にバイオフィームを形成するために必要であった。*xpsR* の過剰発現は EPS I の生産量とバイオフィーム形成頻度を増加させた。これにより、*xpsR* 過剰発現株の厚膜胞子への寄生率が野生株に比べて有意に増加した。細菌細胞周辺の EPS I は、青枯病菌細胞の *F. oxysporum* 菌糸体への親和性を高め、集積した細胞を包み込む役割を果たすと考えられる。EPS I の構造と量は、バイオフィームの形成頻度と成熟度に不可欠であった。ガラクトサミノガラクトンは、*Aspergillus oryzae* の菌糸の自己凝集に寄与することが報告されており (Miyazawa *et al.*, 2019, 2020)。同様のメカニズムが、EPS I の *F. oxysporum* 菌糸への親和性増加に関与している可能性がある。

本研究は、ラルストニンによる厚膜胞子形成が真菌寄生に必須であることを示した。最近、筆者は、青枯病菌株の複数株においてラルストニン生合成に関与する PKS-NRPS 遺伝子の遺伝子長が縮小している可能性を報告した (Matsukawa *et al.*, 2023)。本研究のデータと組み合わせると、青枯病菌株の真菌に対する内寄生は、PKS-NRPS 遺伝子における突然変異により容易に失われる可能性がある。植物における病原性と比較すると、真菌に対する内寄生は青枯病菌株にとって不安定な特性であるのかもしれない。バイオインフォマティクスツールの検索では、*Ralstonia* 属以外の細菌でラルストニンと化学構造が類似したりポペプチドを産生する細菌は見つからなかった。真菌に対して厚膜胞子形成と寄生を誘導するさらなる細菌の発見は、青枯病菌の内寄生



メカニズムがより普遍的であるかどうかを調査する上で有用な知見を与える可能性がある。

青枯病菌と *F. oxysporum* の相互作用に関する知識は深まったものの、本研究では青枯病菌が *F. oxysporum* の厚膜胞子に侵入するメカニズムは完全に解明されていない。本研究の結果、T2SSとT3SSは本内寄生に関与しなかった。これは当初の予想とは異なる結果であった。植物病原菌が生産するリポペプチドは、植物細胞膜に集積して孔を形成し、栄養分の流出を促進したり、細胞内のイオンバランスを乱すことで細胞毒素として作用する (Hutchison & Gross, 1997; Carpaneto *et al.*, 2002; Burch *et al.*, 2014)。しかし、ラルストニンA処理による *F. oxysporum* の厚膜胞子形成において、TEMや顕微鏡解析からこのような膜破壊は観察されなかった。代わりに、多くの菌糸が厚膜胞子に分化し、細胞膜（または細胞壁）が厚くなった。一方、細胞膜が破壊される時期は分からなかった。エンドサイトーシスは、細菌が真菌細胞に取り込まれるメカニズムの例として知られている (Cossart & Sansonetti, 2004)。しかし、TEMで多くの切片を観察したにもかかわらず、エンドサイトーシスの関与を示す画像は得られなかった。青枯病菌の厚膜胞子への侵入メカニズムを解明するためには、より細かい時間間隔での顕微鏡観察と、*F. oxysporum* の青枯病菌の寄生に対する応答を調べることが重要である。

Kellerらの研究グループにより、青枯病菌の真菌寄生に関する新たな論文が報告された (Venkatesh *et al.*, 2022)。彼女らは、本研究とは異なるアプローチを用いて、ラルストニンAによる厚膜胞子誘導の重要性が示された。さらに、いくつかのグラム陰性細菌が青枯病菌細胞の「ヒッチハイカー」として作用し、異なる宿主 *Aspergillus flavus* の厚膜胞子に侵入することを報告した。また、この現象は青枯病菌細胞の存在がなくともラルストニンAを処理するだけで誘発されることを示した。これは、我々の実験結果と矛盾している。本研究では、*E. coli* は野生型青枯病菌細胞との同時接種によっても *F. oxysporum* に感染することができなかった。さらに、QSまたは関連遺伝子が欠損した青枯病菌細胞は、*F. oxysporum* の厚膜胞子に侵入する能力を失っており、ラルストニン単独の添加では回復しなかった。おそらく、宿主の違い (*F. oxysporum* vs. *A. flavus*) が大きな影響を及ぼしていると考えられた。また、*M. rhizoxinica*-*R. microspor* 系で確認されたように、青枯病菌細胞表面成分（例えばLPS）が *F. oxysporum* による認識に関与している可能性もある (Leone *et al.*, 2010)。ただし、このメカニズムは現在不明であり、さらなる研究が必要である。

青枯病菌が菌に寄生することで得られる利点は何だろうか？青枯病菌株は、適切な植物宿主がない状態で

も土壤中で生存し続ける必要がある。トマト畑の土壤に青枯病菌細胞が存在しても、感染可能なトマト植物が近くにない状況が考えられる。真菌はより普遍的に存在するため、真菌への内寄生は青枯病菌株の生存戦略として有効かもしれない。真菌の菌糸を通じて宿主植物に到達できる可能性もある。また、Kellerらの研究グループが報告したように (Venkatesh *et al.*, 2022)、真菌宿主への内寄生は青枯病菌細胞に環境ストレス耐性を付与する可能性がある。当然、ストレス耐性の獲得は、この内寄生の重要な側面であると考えられる。しかし、青枯病菌細胞が *F. oxysporum* 細胞を殺すまで栄養を同化する場合、菌内でのこのような寄生は土壤での生存戦略である可能性がある。この関係は宿主の種類によって異なるのかもしれない。

病害防除の観点からは、青枯病菌細胞の土壤内での行動をさらに理解し、適切な防除方法を提案する必要がある。青枯病菌の寄生と他の生物との共生関係など、未知の相互作用が複数存在し、そのうちの一部は宿主を殺し、一部は宿主を生存させる可能性がある。*phc* QSシステムは青枯病菌の植物病原性および真菌寄生の行動を制御している。したがって、*phc* QSシステムは植物病害防除における魅力的な制御標的となる可能性がある。化学物質や微生物でQSシステムを制御できれば、細菌性萎凋病の発症を予防し、宿主植物の回復も達成できるかもしれない。私たちは、QS阻害剤を既に取得しており (Yoshihara *et al.*, 2020)、今後これらの物質がこの内寄生行動に与える影響を詳細に検討する予定である。

結論として、青枯病菌が *F. oxysporum* にQS依存性で寄生することを確認した。我々は、ラルストニンが *F. oxysporum* の厚膜胞子誘導因子として重要であることを確認しただけでなく、厚膜胞子への侵入過程において *phc* QSシステムがEPS Iの生産とバイオフィーム形成を巧妙に調節していることも確認した。青枯病菌の感染は、*F. oxysporum* の厚膜胞子を殺し栄養を獲得する手段である可能性が高い。その結果として、青枯病菌の *F. oxysporum* 内での自由な移動が可能になると考えられる。青枯病菌は、私たちが想像するよりも巧妙にフィールド条件に適応進化した植物病原細菌である。

## 要 約

青枯病菌は、植物の細菌性萎凋病の病原体として知られているが、多くの真菌種の厚膜胞子を誘導し、その胞子を通じて真菌内部に侵入できる。青枯病菌が産生するリポペプチドであるラルストニンは、この厚膜胞子誘導物質であり、この侵入に不可欠である。本研究では、細菌の細胞間コミュニケーションであるQSが、青枯病菌

が *F. oxysporum* に侵入する際に重要であることを見出した。QS シグナル合成酵素の欠失変異株である  $\Delta phcB$  は、ラルストニン産生と厚膜胞子の形成能力を失った。その結果として、内寄生の能力が失われた。QS シグナルである 3-OH MAME は、これらの障害を回復させた。一方、外因性のラルストニンは *F. oxysporum* の厚膜胞子を誘導したものの、寄生能を回復させなかった。遺伝子欠損と相補実験により、EPS I の産生が、この寄生に不可欠であることが明らかになった。青枯病菌細胞は *F. oxysporum* の菌糸に付着し、厚膜胞子を誘導する前にバイオフィルムを形成した。このバイオフィルム形成は、EPS I 欠損変異株またはラルストニン欠損変異株では観察されなかった。顕微鏡観察により、青枯病菌感染は厚膜胞子の死を引き起こした。すなわち、我々は青枯病菌の QS システムがこの致死的な寄生に重要であることを見出し、QS システムによって調節される要因のうち、ラルストニン、EPS I およびバイオフィルムが重要因子であることを明らかにした。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 甲斐建次. 2025. 細菌と真菌間で繰り広げられる天然物を介した生存競争. 日本化学会第105春季年会・中長期テーマシンポジウム (3月26日, 関西大学)

### 原著論文

- 1) Tsumori, C., Matsuo, S., Murai, Y. & Kai, K. 2023. Quorum sensing-dependent invasion of *Ralstonia solanacearum* into *Fusarium oxysporum* chlamydospores. *Microbiol. Spectr.* **11**: e00036-23.
- 2) Matsukawa, N., Tsumori, C., Ohnishi, K. & Kai, K. 2023. Discovery of cyclic lipopeptides ralstopeptins A and B from *Ralstonia solanacearum* species complex and analysis of biosynthetic gene evolution. *ACS Chem. Biol.* **18**: 572-582.

### その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Kai, K. 2023. The *phc* quorum-sensing system in *Ralstonia solanacearum* species complex. *Ann. Rev. Microbiol.* **77**: 213-231.

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。

## 文 献

Burch, A.Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L. & Lindow, S.E. 2014. The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environ. Microbiol.* **16**: 2086-

2098.  
 Carpaneto, A., Serra, M.D., Menestrina, G., Fogliano, V. & Gambale, F. 2002. The phytotoxic lipopeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. *J. Membr. Biol.* **188**: 237-248.  
 Cossart, P. and Sansonetti, P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.  
 Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., Strynadka, N.C.J. & Finlay, B.B. 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**: 323-337.  
 Garg, R.P., Huang, J., Yindeeoungyeon, W., Denny, T.P. & Schell, M.A. 2000. Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **182**: 6659-6666.  
 Genin, S. & Denny, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 67-89.  
 Hayashi, K., Kai, K., Mori, Y., Ishikawa, S., Ujita, Y., Ohnishi, K., Kiba, A. & Hikichi, Y. 2019a. Contribution of a lectin, LecM, to the quorum sensing signalling pathway of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* **20**: 334-345.  
 Hayashi, K., Senuma, W., Kai, K., Kiba, A., Ohnishi, K. & Hikichi, Y. 2019b. Major exopolysaccharide, EPS I, is associated with the feedback loop in the quorum sensing of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* **20**: 1740-1747.  
 Hendrickson, O.D., Nikitushkin, V.D., Zherdev, A.V., & Dzantiev, B.B. 2019. Lectin-based detection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry. *Arch. Microbiol.* **201**: 313-324.  
 Hogan, D. A. & Kolter, R. 2002. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* **296**: 2229-2232.  
 Huang, J., Yindeeoungyeon, W., Garg, R.P., Denny, T.P. & Schell, M.A. 1998. Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **180**: 2736-2743.  
 Hutchison, M.L. & Gross, D.C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 347-354.  
 Jacobs, J.M., Babujee, L., Meng, F., Milling, A. & Allen, C. 2012. The in planta transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *mBio* **3**: e00114-12.  
 Kai, K., Ohnishi, H., Shimatani, M., Ishikawa, S., Mori, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., Tabuchi, M. & Hikichi, Y. 2015. Methyl 3-hydroxymyristate, a diffusible signal mediating *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. *ChemBioChem* **16**: 2309-2318.  
 Kai, K. 2023. The *phc* quorum-sensing system in *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **77**: 213-31.  
 Komatsu, S., Tsumori, C., Ohnishi, K. & Kai, K. 2020. Genome- and mass spectrometry-guided discovery of ralstoamides A and B from *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* **15**: 2860-2865.

- Lackner, G., Moebius, N. & Hertweck, C. 2011. Endofungal bacterium controls its host by an *hrp* type III secretion system. *ISME J.* **5**: 252-261.
- Leone, M.R., Lackner, G., Silipo, A., Lanzetta, R., Molinaro, A. & Hertweck, C. 2010. An unusual galactofuranose lipopolysaccharide that ensures the intracellular survival of toxin-producing bacteria in their fungal host. *Angew Chem Int Ed* **49**: 7476-7480.
- Li, L., Ma, M.C., Huang, R. *et al.* 2012. Induction of chlamyospore formation in *Fusarium* by cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* C2. *J. Chem. Ecol.* **38**: 966-974.
- Matsukawa, N., Tsumori, C., Ohnishi, K. & Kai, K. 2023. Discovery of cyclic lipopeptides ralstopeptins A and B from *Ralstonia solanacearum* species complex and analysis of biosynthetic gene evolution. *ACS Chem. Biol.* **18**: 572-582.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Sano, A. *et al.* 2019. Both galactosaminogalactan and  $\alpha$ -1, 3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Front. Microbiol.* **10**: 2090.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A. & Abe, K. 2020. The mechanisms of hyphal pellet formation mediated by polysaccharides,  $\alpha$ -1, 3-glucan and galactosaminogalactan, in *Aspergillus* species. *Fungal Biol. Biotechnol.* **7**: 10.
- Mori, Y., Hosoi, Y., Ishikawa, S. *et al.* 2018. Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* **19**: 975-985.
- Murai, Y., Mori, S., Konno, H., Hikichi, Y. & Kai, K. 2017. Ralstonins A and B, lipopeptides with chlamyospore-inducing and phytotoxic activities from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Org. Lett.* **19**: 4175-4178.
- Niehs, S.P., Scherlach, K. & Hertweck, C. 2018. Genomics-driven discovery of a linear lipopeptide promoting host colonization by endofungal bacteria. *Org. Biomol. Chem.* **16**: 8345-8352.
- Perrier, A., Barlet, X., Peyraud, R., Rengel, D., Guidot, A. & Genin, S. 2018. Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb. Pathog.* **116**: 273-278.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O. & Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 1037-1062.
- Raetz, C.R.H. & Roderick, S.L. 1995. A left-handed parallel  $\beta$  helix in the structure of UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase. *Science* **270**: 997-1000.
- Roongsawang, N., Washio, K. & Morikawa, M. 2011. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 141-172.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F. *et al.* 2022. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497-502.
- Schell, M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**: 263-292.
- Senuma, W., Takemura, C., Hayashi, K., Ishikawa, S., Kiba, A., Ohnishi, K., Kai, K. & Hikichi, Y. 2020. The putative sensor histidine kinase PhcK is required for the full expression of *phcA* encoding the global transcriptional regulator to drive the quorum-sensing circuit of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* **21**: 1591-1605.
- Sharma, S., Compant, S., Franken, P., Ruppel, S. & Ballhausen, M.B. 2021. It takes two to tango: A bacterial biofilm provides protection against a fungus-feeding bacterial predator. *Microorganisms* **9**: 1566.
- Spraker, J.E., Sanchez, L.M., Lowe, T.M., Dorrestein, P.C. & Keller, N.P. 2016. *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamyospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues. *ISME J.* **10**: 2317-2330.
- Srinivas, C., Devi, D.N., Murthy, K.N. *et al.* 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: biology to diversity- a review. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**: 1315-1324.
- Takemura, C., Senuma, W., Hayashi, K. *et al.* 2021. PhcQ mainly contributes to the regulation of quorum sensing-dependent genes, in which PhcR is partially involved, in *Ralstonia pseudo-solanacearum* strain OE1-1. *Mol. Plant Pathol.* **22**: 1538-1552.
- Takken, F. & Rep, M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* **11**: 309-314.
- Ujita, Y., Sakata, M., Yoshihara, A., Hikichi, Y. & Kai, K. 2019. Signal production and response specificity in the phc quorum sensing systems of *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* **14**: 2243-2251.
- Valls, M., Genin, S. & Boucher, C. 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2**: e82.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C. & Brito, B. 2000. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 259-267.
- Venkatesh, N., Greco, C., Drott, M.T., Koss, M.J., Ludwikowski, I., Keller, N.M. & Keller, N.P. 2022. Bacterial hitchhikers derive benefits from fungal housing. *Curr. Biol.* **32**: 1523-1533.
- Wagner, S., Grin, I., Malmshaimer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E. & Westerhausen, S. 2018. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**: fny201.
- Whitfield, G.B., Marmont, L.S. & Howell, P. L. 2015. Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Front. Microbiol.* **6**: 471.
- Yoshihara, A., Shimatani, M., Sakata, M., Takemura, C., Senuma, W., Hikichi, Y. & Kai, K. 2020. Quorum sensing inhibition attenuates the virulence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chem. Biol.* **15**: 3050-3059.
- Zhang, Y., Kastman, E.K., Guasto, J.S. & Wolfe, B.E. 2018. Fungal networks shape dynamics of bacterial dispersal and community assembly in cheese rind microbiomes. *Nat. Commun.* **9**: 336.

# 新規嫌気性アンモニア酸化代謝の遺伝・生化学研究

春 田 伸

東京都立大学大学院理学研究科  
〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

## Novel anaerobic ammonium oxidizing metabolisms

Shin Haruta

Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University  
Minami-Osawa 1-1, Hachioji, Tokyo 192-0397

Ammonium is utilized not only as a nitrogen source but also as an energy source for living organisms. Aerobic ammonium-oxidizing microorganisms have been discovered, and their systematic, ecological, and genetic/biochemical studies are progressing. On the other hand, although the existence of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms has long been predicted based on thermodynamic considerations, our knowledge about their diversity remains limited. This study aimed to explore bacteria that grow anaerobically using ammonium as an electron source from terrestrial hot springs and to clarify their genetic and physiological characteristics. Ammonium-dependent anaerobic growth was identified in sulfate-reducing bacteria (*Thermodesulfomicrobium* sp.) and anoxygenic photosynthetic bacteria (*Chloroflexus* sp.). Physiological analyses suggested that ammonium was utilized not only as a nitrogen source but also as an electron source in these isolates; however, the oxidation products of ammonium could not be identified. Genome analysis revealed no known genes related to ammonium oxidation, suggesting the presence of novel enzymes and reactions. Transcriptional analysis of the *Chloroflexus* isolate suggested that previously unidentified oxidoreductases were active under ammonium-dependent growth conditions.

Key words: anaerobic ammonium oxidation, sulfate-reducing bacteria, anoxygenic photosynthetic bacteria

## 緒 言

生態系における窒素循環では、微生物による無機窒素化合物の酸化・還元反応が大きな役割を担っている。その反応は、アンモニアから窒素ガス、硝酸への酸化と、硝酸から窒素ガス、アンモニアへの還元反応で構成される。これまでに、窒素循環反応に関わる微生物が多く見つかかり、その反応を担う酵素や遺伝子が同定されてきた。しかし、嫌気的にアンモニアを酸化する微生物に関する知見は限られている (Oren, 2015)。

1970年代に熱力学的考察からいくつかの嫌気性アンモニア酸化微生物の存在が予測されていた (Broda, 1977; Olson, 1970)。1990年代に亜硝酸を酸化剤とするアナモックス (anaerobic ammonium oxidation) 反応が発見され (Strous *et al.*, 1999)、廃水処理技術に革新をもたらしたが、その微生物は増殖が遅く難培養で未だ純

粋培養されていない。2001年以降、廃水処理槽から硫酸依存的な嫌気性アンモニア除去反応 (sulfamox) が報告されるようになったが (FdZ-Polanco *et al.*, 2001)、未だ、その微生物はもとより反応経路についても全く不明のままである。

本研究では、アンモニア依存的に嫌気的に生育する細菌を探索し、その代謝反応を遺伝学的・生化学的に特徴づけることを目指した。

## 実験方法

### 培地

アンモニア (15mM) を含む以下の無機培地 (ammonium medium) をブチルゴム栓付き試験管に調製し、気相は  $N_2:CO_2=4:1$  もしくは  $H_2:CO_2=4:1$ ,  $Ar:CO_2=4:1$  とした。硝酸培地 (nitrate medium) では  $NH_4Cl$  の代わりに 0.83g  $NaNO_3$  を添加した。光照射培養には、白熱灯および 700nm 以下をカットするロングパスフィル

ターを用いて連続照射した (約  $600\text{J s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).

培地組成 ( $\text{L}^{-1}$ ):  $1\text{g NH}_4\text{Cl}$ ,  $2.12\text{g Na}_2\text{SO}_4$ ,  $0.75\text{g KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.78\text{g K}_2\text{HPO}_4$ ,  $4.2\text{g sodium bicarbonate}$ ,  $5\text{mL basal salt solution}^*$ ,  $1\text{mL vitamin mixture}^{**}$ .

\*basal salt solution ( $\text{L}^{-1}$ ):  $1.1\text{g FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $24.3\text{g MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.111\text{g MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $23.0\text{g NaCl}$ ,  $2.94\text{g CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.029\text{g ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.025\text{g CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.031\text{g H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.024\text{g Na}_2\text{MoO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.029\text{g Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.02\text{g NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $4.53\text{g trisodium EDTA}$ .

\*\* vitamin mixture ( $100\text{mL}^{-1}$ ):  $0.005\text{g biotin}$ ,  $0.05\text{g folic acid}$ ,  $0.05\text{ pyridoxine HCl}$ ,  $0.1\text{g thiamine HCl}$ ,  $0.1\text{g nicotinic acid}$ ,  $0.05\text{ calcium pantothenate}$ ,  $0.001\text{g vitamin B}_{12}$ ,  $0.05\text{g } p\text{-aminobenzoic acid}$ .

生育は OD (660nm) または遠心回収した細胞画分の全タンパク質量で評価した (Kawai *et al.*, 2019).

#### 代謝物の測定

アンモニアは比色定量試薬ラボアッセイアンモニア (Fujifilm Wako) を用いて定量した. 硫化物イオンの定量にはメチレンブルー法を用いた (Cline, 1969). ヒドロキシルアミンは Frear & Burell の比色定量法を用いた (Frear & Burell, 1955). 硝酸イオン, 亜硝酸イオンは陰イオンクロマトグラフィーで定量した (suppressed anion-exchange chromatography system, Shimadzu) (Shimizu *et al.*, 2018). 硫酸イオンは QuantiChrom Sulfate Assay Kit (BioAssays Systems) を用いて比色定量した.  $\text{N}_2\text{O}$  の検出には熱伝導度型検出器付きガスクロマトグラフィーを用いた (Otaki *et al.*, 2012). また培養試験管の気相成分はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて分析した (Isobe *et al.*, 2011).

#### ゲノム解析

分離株の細胞から DNA を抽出・精製し, PacBio Sequel II プラットホームを用いてゲノム配列を解析した. 取得した高品質リードを Flye v2.9 (Kolmogorov *et al.*, 2019) を用いてアセンブルし, 得られたコンティグの完全性やコンタミネーションは CheckM v1.14.5 (Parks *et al.*, 2015) で評価した. 得られたゲノム配列から得られた遺伝子は DFAST を用いてアノテーションした (Tanizawa *et al.*, 2018).

#### RNA-Seq 解析

増殖期の細胞から全 RNA を抽出し, riboPool (siTOOLs) を用いて rRNA 除去した. DNA ライブラリーを作成後, DNB SEQ-G400 を用いて塩基配列を取得した. 得られた高品質リードについて参照ゲノムに対してマッピングした.

## 結 果

### 集積培養系の確立

日本各地の高温土壌および温泉流水中に発達する微生物マットを採取した. アンモニア培地に接種して  $55^\circ\text{C}$  で培養したところ, いくつかの試料で生育が確認できた. 鬼首温泉郷 (宮城源) 由来の試料から 10 回以上の継代培養後も安定に生育する集積培養系が得られた (Fig.1).

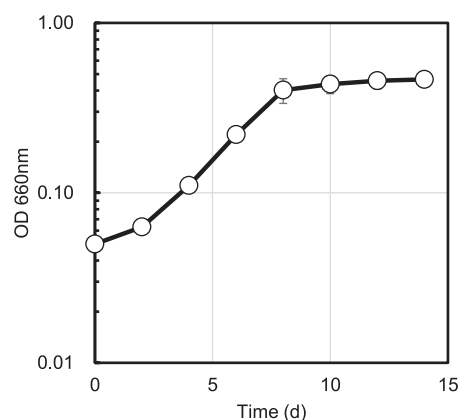


Fig. 1 Growth of an enrichment culture at  $55^\circ\text{C}$  in the ammonium medium under  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  atmosphere in the light. Mean values of the three culture tubes are shown with standard deviations.

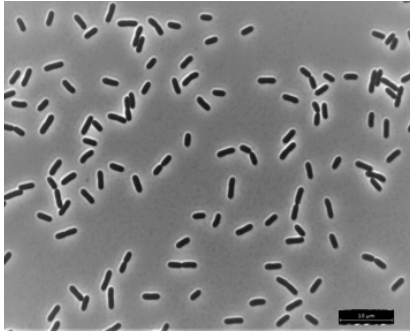
この集積培養系に対して, 硫酸還元細菌の阻害剤として知られるモリブデン酸 ( $20\text{mM Na}_2\text{MoO}_4$ ) を添加して培養したところ, OD の上昇はみられなくなった.

### 硫酸還元菌の分離培養

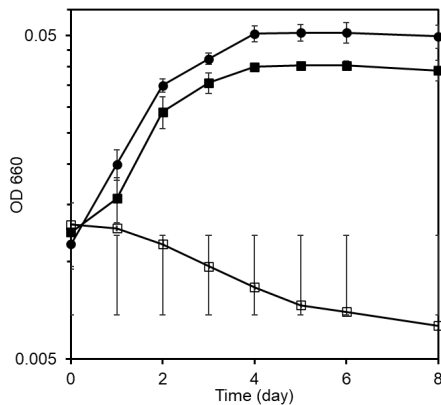
集積培養系において硫酸還元反応が重要な働きを担っていると考え, 硫酸還元菌の分離培養を試みた. 混釈法によるシングルコロニーピックおよび限界希釈法により分離株 WS を得た (Fig.2). 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析から, *Thermodesulfomicrobium* 属と考えられ, 既知分離株 *Thermodesulfomicrobium thermophilum* DSM 16697 と 99.2% の配列相同性を示した.

### 分離した硫酸還元細菌株の生育特性

分離株 *Thermodesulfomicrobium* sp. WS 株のアンモニア培地 (気相  $\text{Ar}:\text{CO}_2=4:1$ ) での生育の様子を Fig.3 に示す. 約一週間の培養で定常期に達した. ただし到達 OD 値は低く, OD=0.04 程度であった. アンモニアの代わりに硝酸を添加した硝酸培地では, 水素気相では生育が確認できるが, アルゴン気相では生育が見られない. 以上の結果



**Fig. 2** Phase-contrast microscopic image of strain WS. The bar represents 10 $\mu$ m.

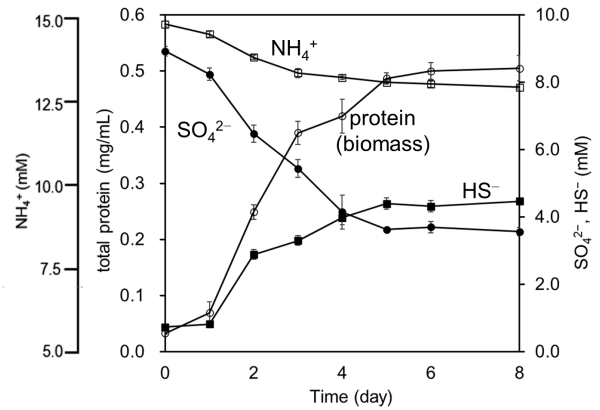


**Fig. 3** Growth curves of strain WS. Closed square, ammonium medium under Ar:CO<sub>2</sub> atmosphere; closed circle, nitrate medium under H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> atmosphere; open square, nitrate medium under Ar:CO<sub>2</sub> atmosphere. Mean values of the three culture tubes are shown with standard deviations.

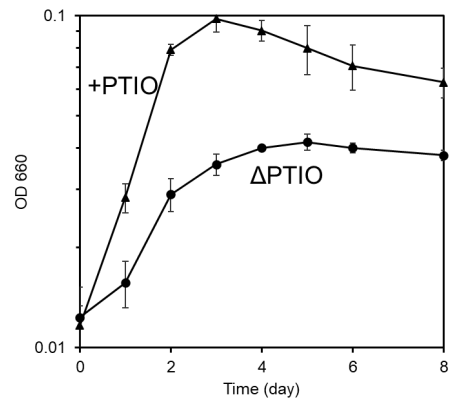
は、アンモニア培地での生育において、アンモニアが窒素源としてだけでなく、電子源として利用されていることを示唆する。菌株保存機関から取り寄せた *T. thermophilum* DSM 16697 では安定な生育は観察されなかった。

次に、生育に伴う代謝物動態を解析した。バイオマスの指標として細胞タンパク質量を測定した。Fig. 4 に示すようにバイオマスの増加に伴いアンモニア濃度が減少した（アンモニア消費量 約 2mM）。また硫酸の消費と硫化水素の生成が確認できた。

培養液および培養試験管の気相からアンモニア酸化物の候補物質として各種無機窒素化合物の検出を試みた。可溶性化合物（NH<sub>2</sub>OH, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>）の生産は見られなかった。また気相成分から N<sub>2</sub>O の検出も無かった。<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl を用いた培地から、GC-MS 分析により、<sup>29</sup>N<sub>2</sub>, <sup>30</sup>N<sub>2</sub> の検



**Fig. 4** Changes in total cellular protein (protein, open circle) and the concentrations of ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, open square) and sulfur compounds (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, closed circle; HS<sup>-</sup>, closed square) in the culture of strain WS grown in the ammonium medium. Mean values of the three culture tubes are shown with standard deviations.



**Fig. 5** Effects of an NO scavenger on the growth of strain WS. Strain WS was cultivated in the ammonium medium under Ar:CO<sub>2</sub> atmosphere in the presence and absence of a NO scavenger, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-1-oxyl (PTIO) (0.1mM). Growth curves in the presence of PTIO are shown by a closed triangle, and curves in the absence of PTIO are shown by a closed circle. Mean values of the triplicate culture are shown with standard deviations.

出を試みたが、これらの生産も確認できなかった。

そこで、一酸化窒素（NO）除去剤として知られる 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO, 0.1mM) を培地に添加した条件で生育を比較した。PTIO 添加条件において、増殖速度、最終到達濁度ともに上昇した (Fig. 5)。

## 分離した硫酸還元細菌株のゲノム特性

WS株のゲノム塩基配列を決定した (accession no. AP027130). 全長2.4Mbpで、2,185のタンパク質コード遺伝子が検出された。無機窒素化合物の酸化や還元に関わることが知られている遺伝子に相同な遺伝子をWS株ゲノムに対してBLAST検索した。結果をTable 1にまとめた。

**Table 1** Exploration of genes related to inorganic nitrogen metabolisms in strain WS.

gene	Amino acid seq. identity	Coverage	Query*
Aerobic ammonium oxidation related			
<i>amo</i>	n.d.		<i>Nitrosomonas</i> sp.
ANAMMOX related			
<i>hao</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
<i>hzs</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
<i>hdh</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
<i>hox</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
Denitrification related			
<i>nirS</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
<i>nirK</i>	n.d.		<i>Ca. Kuenenia</i> sp.
<i>norR</i>	n.d.		<i>Nitrosomonas</i> sp.
Dinitrogen fixation related			
<i>nifH</i>	65.9%	100%	<i>Thermodesulfovibrio</i> sp.
<i>nifD</i>	38.0%	95.8%	<i>Thermodesulfovibrio</i> sp.
<i>nifK</i>	41.0%	89.7%	<i>Thermodesulfovibrio</i> sp.
<i>vnfH</i>	61.8%	92.9%	<i>Rhodospseudomonas</i> sp.
<i>vnfK</i>	n.d.		<i>Azotobacter</i> sp.
<i>vnfG</i>	32.5%	89.2%	<i>Azotobacter</i> sp.
<i>anfH</i>	64.4%	100%	<i>Rhodospseudomonas</i> sp.
<i>anfD</i>	n.d.		<i>Azotobacter</i> sp.
<i>anfK</i>	33.1%	96.5%	<i>Rhodospseudomonas</i> sp.
<i>anfG</i>	n.d.		<i>Azotobacter</i> sp.

n.d., no homologous gene was detected.

\*used as the query for BLAST search.

これまで好気性アンモニア酸化細菌で見つかったアンモニア酸化酵素遺伝子や、アナモックス細菌から見つかった遺伝子に相同な遺伝子は見つからなかった。また一酸化窒素の生成・消費に関わる脱窒関連遺伝子 *nir* や *nor* も検出されなかった。一方、*nifHDK* など窒素固定関連遺伝子が検出され、窒素固定能を有することが示唆された。

## Chloroflexus 属酸素非発生源型光合成細菌の生育評価

Fig.1に示した集積培養系の生育は、暗所で大きく制

限された (data not shown)。培養液の顕微鏡観察から糸状体細胞が多数見られ、また培養液の吸収スペクトルからバクテリオクロフィルに相当する吸収ピークが検出されたことから、好熱性の糸状性酸素非発生源型光合成細菌として広く知られる *Chloroflexus* 属細菌の存在が考えられた。そこで既報に従い (Morohoshi *et al.*, 2015)、集積培養系から嫌気光従属栄養条件で分離培養したところ、*Chloroflexus* 属細菌2株 (strain A, strain B) が得られた。研究室保有の *Chloroflexus* 属分離株7株とともにアンモニア培地での生育を評価した (Fig.6)。株によって生育の違いが見られ、なかでも長野県温泉由来の *Chloroflexus* sp. D株は安定に生育し、他に比べて高い増殖能を示した。

## 酸素非発生源型光合成細菌 D 株の生育特性

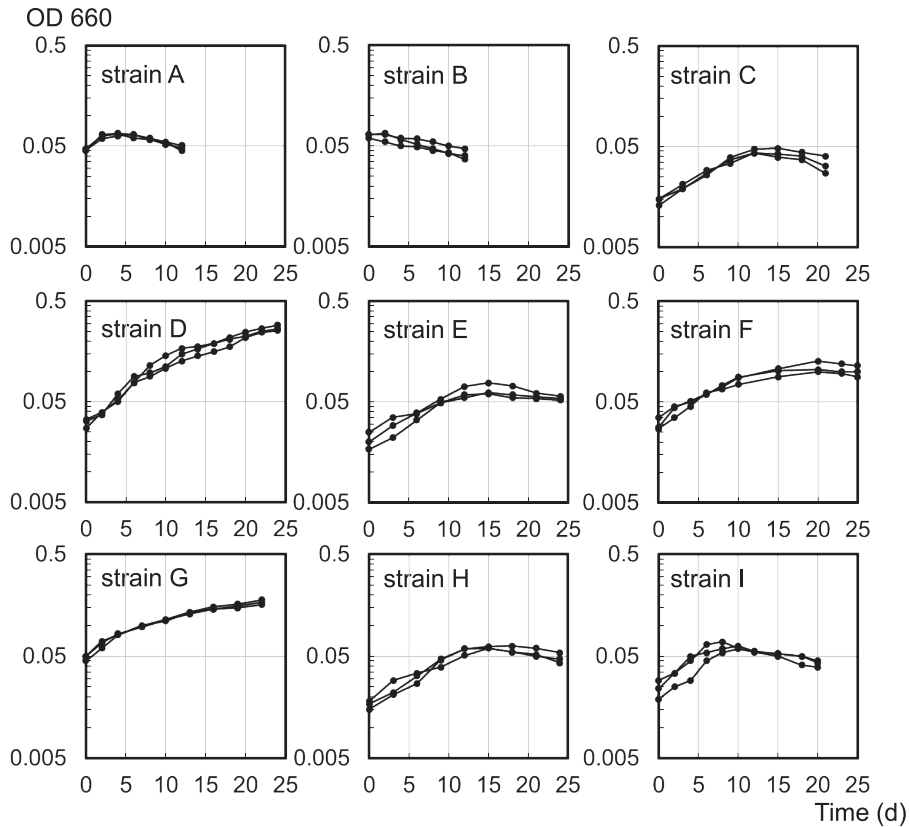
D株をアンモニア培地でさらに馴養し培養した時のODの変化とアンモニア濃度の変化をFig.7に示す (気相  $N_2:CO_2=4:1$ )。3週間以上の時間をかけてゆっくりと生育し、OD値は約0.4に達した。この間、約5mMのアンモニア濃度の減少が見られた。このアンモニア消費量は気相を  $H_2:CO_2=4:1$  にして培養した時に比べ顕著に大きい。

また、D株細胞を集菌しアンモニア培地に懸濁して、培養時と同様の嫌気・光条件 (気相  $N_2$  ガス) のもと、細胞分裂しないと考えられる短時間 (1日) インキュベートして、アンモニア濃度を定量した。NaHCO<sub>3</sub> 非添加条件ではアンモニア減少が検出されないのに対し、NaHCO<sub>3</sub> 添加条件で1mMのアンモニア減少が確認された。このことはアンモニアが炭酸固定のための電子源になっている可能性を支持する。

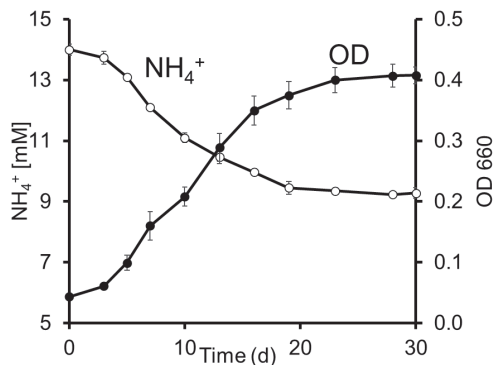
前述したWS株と同様にして、培養液および培養試験管の気相からアンモニア酸化物の候補物質として各種無機窒素化合物の検出を試みたが、NH<sub>2</sub>OH、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、N<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>のいずれも検出できなかった。一酸化窒素 (NO) 除去剤である2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO, 0.1mM) の添加効果を調べたところ、PTIO添加条件において、培養開始から約3週間経ったあたりから、増殖速度の上昇が見られ、最終到達濁度もOD=0.8と高くなった (data not shown)。

## 酸素非発生源型光合成細菌 D 株のゲノム特性

D株のゲノム情報を解析した。総塩基数4.5Mbpで、3,757のタンパク質コード遺伝子が検出された。前述の硫酸還元細菌WS株と同様に、アンモニア酸化や一酸化窒素生成に注目して無機窒素化合物の酸化・還元に関連する遺伝子を検索したが、特徴的な遺伝子は認められなかった。



**Fig. 6** Growth curve of nine isolates (strains A~I) in the genus *Chloroflexus* at 55°C in the ammonium medium under  $N_2:CO_2$  atmosphere in the light. Strains A and B were isolated from the enrichment culture in this study.



**Fig. 7** Changes in OD and the ammonium concentration in the culture of *Chloroflexus* sp. strain D grown at 55°C in the ammonium medium in the light under  $N_2:CO_2$  atmosphere. Mean values of the three culture tubes are shown with standard deviations.

#### 酸素非発生型光合成細菌 D 株の転写プロファイル

*Chloroflexus* 属細菌には、水素および硫化水素を電子源とした光合成独立栄養生育能が知られている (Kawai *et al.*, 2019; Kanno *et al.*, 2019). そこで電子源として水素または硫化水素を添加した条件とアンモニア生育条件における転写プロファイルを比較した. 各条件において増殖期の細胞を回収し, RNA を抽出した. アンモニア生育条件で転写量が多かった遺伝子 (Transcripts per million [TPM] > 1,000) は 201 検出された. そのなかで水素や硫化水素添加条件では TPM 値が 1,000 未満と低く, アンモニア生育条件で特徴的に転写されていると考えられたのは 80 遺伝子あった. アンモニア生育条件での TPM 値が他条件の TPM 値に比べて 10 倍以上高かった遺伝子に注目すると, 水素生育条件に対して 24 遺伝子, 硫化水素生育条件に対しては 27 遺伝子が検出された. これら遺伝子には, リジンの生合成など窒素同化に

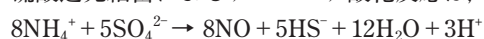


関わるものに加え、鉄-硫黄クラスターを有する機能未同定のタンパク質 (509 aa) をコードしている遺伝子が見られた。その遺伝子の下流に見つかった遺伝子の転写量も高く、機能未知 (hypothetical protein, 272 aa) であるが、ドメイン構造から電子伝達鎖に関連するタンパク質であると推定された。

## 考 察

本研究では、硫酸還元細菌 (*Thermodesulfomicrobium* sp.) および酸素非発生源型光合成細菌 (*Chloroflexus* sp.) にアンモニア依存的な嫌気生育を見出した。ただし、いずれの細菌からもアンモニア酸化物として推定される  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  は検出されず、一方で、一酸化窒素除去剤によって生育促進を受けることが示された。生成する一酸化窒素は反応性が高く、培養液成分または細胞構成成分によって速やかに消失している可能性がある。光合成細菌の場合、一部の一酸化窒素はカロテノイド類の色素によって除去されているのではないだろうか。

硫酸還元細菌によるアンモニア酸化反応は、



と推定される。Fig.4 に示すように硫酸 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) の消費量 (5.4mM) に対して、硫化水素 ( $\text{HS}^-$ ) の生成量は小さく (3.7mM)、硫化水素が生成する一酸化窒素 (NO) と反応していることが考えられる。ただし、アンモニア酸化と硫酸還元酸化還元バランスは完全には説明できず、アンモニア酸化物は一酸化窒素以外にもあると考えられ、さらなる検討が必要である。

アンモニアから一酸化窒素に酸化する経路は知られていないが、*Chloroflexus* sp. D 株から見つかった鉄-硫黄クラスター含有酵素が関与している可能性がある。本酵素遺伝子は、他の *Chloroflexus* 属細菌株からも見つかる。しかし、*Thermodesulfomicrobium* sp. WS 株のゲノムからは相同な遺伝子は見られず、これら二種細菌では酸化酵素や経路が異なるのかも知れない。

これら細菌によるアンモニア依存的生育は、15mM という比較的高濃度のアンモニアを含む培養条件で検出された。未発見のアンモニア酸化酵素のアンモニアに対する基質親和性が低い可能性がある。またこれら細菌が見つかる陸上温泉環境では多種類の窒素固定細菌が検出されており (Nishihara *et al.*, 2019), それらが局所的なアンモニアの供給源になっている可能性が考えられる。

## 要 約

本研究では、陸上温泉から分離した硫酸還元細菌 (*Thermodesulfomicrobium* sp.) および酸素非発生源型光合

成細菌 (*Chloroflexus* sp.) に見出したアンモニア依存的な嫌気生育について、遺伝学的・生理学的に解析した。生理学的解析から、これらの分離株において、アンモニアが窒素源としてだけでなく電子源として利用されていると考えられたが、アンモニアの酸化物を同定するには至らなかった。ゲノム情報の解析からは、アンモニアの酸化反応に関わる既知の遺伝子は見出されず、新規の酵素・反応があると考えられた。*Chloroflexus* 属細菌の転写解析から、これまで未同定であった酸化還元酵素がアンモニア生育条件で働いている可能性が示唆された。

## 本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

該当なし

原著論文

該当なし

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 春田伸 2023. 陸上温泉の微生物資源, 大熊盛也 (監修), 微生物資源の整備と利活用の戦略, p. 429-439, エス・ティー・エス出版, 東京.
- 2) 春田伸 2023. 未発見微生物の探索, 青柳秀紀 (監修), 未培養微生物研究の最新動向, p. 25-36, シーエムシー出版, 東京.

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。本研究の基礎を築き、多方面にわたってご助言をくださった花田智博士に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にご協力いただいた北京大学の磯部一夫博士に感謝の意を表します。

## 文 献

- Broda, E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z Allg Mikrobiol.* **17**: 491-493.
- Cline, J. D. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr.* **14**: 454-458.
- Fdz-Polanco, F., Fdz-Polanco, M., Fernandez, N., Uruña, M. A., Garcia, P. A., & Villaverde, S. 2001. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Res.* **35**: 1111-1114.
- Frear, D.S. & Burrell, R.C. 1955. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal Chem.* **27**: 1664-1665.
- Isobe, K., Koba, K., Ueda, S., Senoo, K., Harayama, S., & Suwa, Y. 2011. A simple and rapid GC/MS method for the simultaneous determination of gaseous metabolites. *J Microbiol Methods.* **84**: 46-51.

- Kanno, N., Haruta, S., & Hanada, S. 2019. Sulfide-dependent photoautotrophy in a filamentous anoxygenic phototrophic bacterium, *Chloroflexus aggregans*. *Microbes Environ.* **34**: 304-309.
- Kawai, S., Nishihara, A., Matsuura, K. and Haruta, S. 2019. Hydrogen-dependent autotrophic growth in phototrophic and chemolithotrophic cultures of thermophilic bacteria, *Chloroflexus aggregans* and *Chloroflexus aurantiacus*, isolated from Nakabusa hot springs. *FEMS Microbiol Lett.* **366**: fnz122.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P.A. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* **37**: 540-546.
- Morohoshi, S., Matsuura, K., & Haruta, S. 2015. Secreted protease mediates interspecies interaction and promotes cell aggregation of the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiol Lett.* **362**: 1-5.
- Nishihara, A., Thiel, V., Matsuura, K., McGlynn, S. & Haruta, S. 2019. Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa Hot Springs. *Microbes Environ.* **33**: 357-365.
- Olson, J.M. 1970. The evolution of photosynthesis. *Science.* **168**: 438-446.
- Oren, A. 2015. Anammox revisited: thermodynamic considerations in early studies of the microbial nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett.* **362**: fnv114.
- Otaki, H., Everroad, C.R., Matsuura, K. & Haruta, S. 2012. Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. *Microbes Environ.* **27**: 293-299.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., & Tyson, G.W. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **25**: 1043-1055.
- Shimizu, T., Horiguchi, K., Hatanaka, Y., Masuda, S., Shimada, K., Matsuura, K. & Haruta, S. 2018. Nitrite-reducing ability is related to growth inhibition by nitrite in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **82**: 148-151.
- Strous, M., Planet, E., Mechanics, T., *et al.* 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* **400**: 446-449.
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., & Nakamura, Y. 2018. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics.* **34**: 1037-1039.

# ゲノム情報とゲノム編集を用いた実用藻類ツノケイソウの 光エネルギー変換効率の最大化

伊 福 健太郎

京都大学大学院農学研究科  
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

## Maximizing photoenergy conversion efficiency in the practical alga *Chaetoceros gracilis* using genomic information and genome editing

Kentaro Ifuku

Graduate School of Agriculture, Kyoto University  
Kitashirakawa oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502

In this study, the function of light-harvesting proteins (LHC/FCP) in the marine diatom *Chaetoceros gracilis* was investigated. Among them, Lhcx1 was found to be essential for non-photochemical quenching (NPQ). The knockout of the *Lhcx1* gene via genome editing almost completely abolished the ability to induce NPQ. The Lhcx1 knockout mutant (*lhcx1*), which lacks NPQ, showed the capacity to acclimate by activating various high-light protection systems inherent to *C. gracilis*, resulting in higher PSII activity compared to the wild type. This increase in PSII activity was enhanced by the addition of carbon dioxide in the *lhcx1* mutant, suggesting that both upstream changes in the light-harvesting system and downstream adaptation of electron sinks in the electron transport chain play crucial roles in high-light acclimation in *C. gracilis*. These findings represent the first demonstration that genetic manipulation of diatom light-harvesting capacity can improve the efficiency of light energy conversion in photosynthesis. As a marine diatom, *C. gracilis* would have evolved multiple photoprotective mechanisms in order to adapt to highly fluctuating oceanic environments. The present study suggests that these defense systems are interconnected and exhibit a high degree of regulatory flexibility in response to environmental changes.

Key words: diatom, genome editing, light-harvesting protein, non-photochemical quenching, photosynthesis

### 緒 言

酸素発生型の光合成生物であるシアノバクテリア、藻類、および陸上植物は、太陽光を利用し、有機物を生産する一次生産を担い、水中や陸上における生命活動を支えている。真核光合成生物である藻類と陸上植物は、細胞内共生により原始的なシアノバクテリアを取り込んで葉緑体を獲得した (Delwiche, 1999)。さらに複数の二次または三次細胞内共生イベントにより、多様な真核藻類が生じた。例えば、紅色進化系統の二次共生藻類は紅藻類に由来する葉緑体を獲得しており、現代の海洋で優占する珪藻類やハプト藻類などの重要な海洋生物群を含む (Croce & van Amerongen, 2020)。これらの藻類は、

一次生産の約半分を占める水圏の光合成を担っている (Field *et al.*, 1998)。

葉緑体のチラコイド膜では、2種類の光化学系 (PS), PSII と PSI がシトクロム (Cytochrome: Cyt)  $b_6f$  を介して直列に連結されて、光合成の光エネルギー変換反応を行う。PSII から Cyt  $b_6f$  にはチラコイド膜内のプラストキノンが電子を受け渡し、Cyt  $b_6f$  から PSI へは陸上植物や緑藻ではプラストシアニンが電子を運ぶ。ただし、紅色進化系統藻類の珪藻では Cyt  $c_6$ 、およびプラストシアニンが Cyt  $b_6f$  から PSI へ電子を受け渡している (Groussman *et al.*, 2015)。PSI から送り出された電子は、フェレドキシンを介して様々な反応に還元力を供給する。その最も代表的なものが一連の炭酸固定反応、すなわちカルビン・ベンソン・バッシュャム (CBB) 回路である。

効率的な光の捕集を可能にするため、光合成生物は

E-mail: ifuku.kentaro.2m@kyoto-u.ac.jp  
共同研究者: 菓子野 康浩 (兵庫県立大学生命理学研究科)

2種類の光化学系の周辺に光捕集アンテナを持っている。真核光合成生物において、これらのアンテナは光捕集色素を保持するタンパク質複合体であり、光エネルギーは励起エネルギー移動を通じて光化学系に伝達される (Croce & van Amerongen, 2020)。紅藻類は、PSIIのストロマ側に表在性の光捕集アンテナ複合体であるフィコビリソームを持ち、PSIの周囲に膜貫通型の光捕集色素タンパク質複合体 (Light-harvesting complex; LHC) を持っている (Marquardt & Rhiel, 1997; Pi *et al.*, 2018; Wolfe *et al.*, 1994; You *et al.*, 2023)。LHCには様々な種類のクロロフィルとカロテノイドが光捕集色素として結合しており、紅藻類と緑藻類、陸上植物、紅色進化系統二次共生藻類、緑色進化系統二次共生藻類、および渦鞭毛藻類において光捕集アンテナとして機能している (Büchel, 2015; Koziol *et al.*, 2007)。

紅藻類のLHCはクロロフィル *a* とカロテノイドとしてゼアキサンチンを含むが、紅色進化系統二次共生藻類のほとんどのLHCはクロロフィル *a* と *c* を含み、カロテノイドは分類群によって異なり、LHCはその結合するカロテノイドにちなんで命名されている (Büchel, 2015)。例えば、珪藻類とハプト藻類は、それらのLHCの主要なカロテノイドとしてフコキサンチンまたは19'-ヘキサノイルオキシフコキサンチンを含むため、それらのLHCはフコキサンチン・クロロフィル *a/c* 結合タンパク質 (FCP) と呼ばれる。紅色進化系統二次共生藻類の中で、珪藻類はPSIとPSIIの両方の周辺アンテナとしてFCPを利用している (Nagao *et al.*, 2019, 2020, 2022; Wang *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020)。

珪藻はLHC (FCP) を光環境に応じて制御することで、効率的な光捕集とともに過剰に吸収した光による励起エネルギーを抑える光防御を行っている。珪藻のLHCファミリーの中でもLhcxサブファミリーは、非光化学的消光 (Non-photochemical quenching: NPQ) によって過剰な励起エネルギーを熱放散することで、光化学系の強光防御に働いていることが、不等毛藻類に属する珪藻や真正眼点藻類で調べられている (Baillieux *et al.*, 2010; Buck *et al.*, 2019; Giovagnetti *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2019)。NPQはメカニズムによって誘導時間と名称が異なる。珪藻のNPQは主にqE (Energy-dependent quenching) と呼ばれるものであり、光化学反応で生成したチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配  $\Delta pH$  に依存したNPQである (Goss & Lepetit, 2015; Lavaud & Kroth, 2006)。Lhcxは、緑藻においてqEに欠かせない働きをするLhcsrファミリーのホモログにあたるが、陸上植物でqEの誘導に必要なPsbSは珪藻には存在しない (Koziol *et al.*, 2007)。LhcxとLhcsrの類似性はよく知られているが、遺伝子発現調節機構の違いも報告され

ている (Allorent, *et al.*, 2016; Im, *et al.*, 2024; Petroustos, *et al.*, 2016; Tokutsu, *et al.*, 2019a, 2019b; H. Zhang, *et al.*, 2024)。Lhcx/Lhcsrの進化的な起源については、LHCサブファミリーの網羅的な分子系統解析が不十分であったため、これまでほとんど議論されてこなかった。また、モデル珪藻では、複数のLhcx遺伝子が冗長的に働く。そのため、ほぼ完全なLhcx欠損株は作成されておらず (Buck *et al.*, 2019; Giovagnetti *et al.*, 2022)、NPQを大きく欠損した状態での生理的応答や励起エネルギー伝達の変化は調べられてこなかった。

本研究では、我々がゲノム情報を明らかにし、PSII-FCPII (Nagao *et al.*, 2019, 2022; Wang *et al.*, 2019)、およびPSI-FCPI (Nagao, *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020) の立体構造の解明にも貢献したツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* を利用して、ゲノム編集を利用したLHC/FCPの機能解析により、珪藻の光エネルギー変換効率の向上が可能であるかを検討した。ツノケイソウ *C. gracilis* は、二枚貝の養殖の餌料として利用されるなど、漁業資源として広く利用されている実用微細藻類であり、油脂などの生産能も高いことから有用物質生産のプラットフォームとしても期待されている微細藻類である (Tokushima *et al.*, 2016)。本稿では、ツノケイソウの最も主要なLhcx分子種であるCgLhcx1の機能欠損変異体をCRISPR/Cas9のゲノム編集により作成し、その励起エネルギー移動や強光防御メカニズムを明らかにして、光エネルギー変換効率の向上につなげた事例を紹介する。

## 実験方法

様々な光合成真核生物の系統におけるLHCの系統解析

LHCの配列は、Kumazawa & Ifuku, 2024に従い、PhycocosmとEukProtデータベースに含まれるゲノムおよびトランスクリプトームから収集した。LHCタンパク質配列は、CD-HIT (Fu *et al.*, 2012) により冗長な配列を除去し、mafft-einsi v7.525でアラインメントを行い、手動でキュレーションを行った (Katoh & Standley, 2013)。得られたデータセットは再度アラインメントを行い、アラインメントされていないサイトを除去するためにClipKit v2.3.0のsmart-gapモードでトリミングを行った (Steenwyk *et al.*, 2020)。分子系統樹は、ModelFinderにより選択されたQ.pfam+I+R7モデルを用いてIQ-TREE v2.3.6で推定し (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017; Minh *et al.*, 2020, 2021)、iTOL v6で可視化した (Letunic & Bork, 2024)。超高速ブートストラップ近似 (UFBoot) とSH-aLRTサポート (%) テストをそれぞれ1000回反復で実施した (Guindon *et al.*, 2010; Hoang *et al.*, 2018)。aBayesサポートテストも実施した (Anisimova *et al.*,

2011). 系統樹における LHC サブファミリーのアノテーションは、我々の以前の研究 (Kumazawa *et al.*, 2022; Kumazawa & Ifuku, 2024) に基づき、InkScape ソフトウェアを用いて系統樹として描画した。

#### 珪藻の培養

海洋性中心目珪藻 *Chaetoceros gracilis* (strain UTEX LB 2658) をすべての分析に使用した。前培養は、ダイゴ人工海水 (塩谷 MS) に 1×ダイゴ IMK 培地 (塩谷 MS) と 0.2mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> を添加した IMK 培地 20mL を 100mL エーレンマイヤーフラスコに入れ、植藻後は、20℃、約 30μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> の蛍光灯を用いた連続光下、100rpm で回転振とうしながら行った。7 日間または 3 日間の培養は、藻類培養装置 (MC-1000, Photon System Instruments) を用いて、70mL の IMK 培地中、25℃、30μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (弱光) または 300μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (強光) の温白色 LED を用いた連続光下で、大気または 3% (v/v) 二酸化炭素を含む空気を連続通気しながら行った。

#### ゲノム編集ベクターの構築

Cas9ヌクレアーゼ (hCas9) の配列は、hCas9ベクター (Addgene, #41815) から PCR で増幅した。PCR 産物には BamHI と PstI 認識配列を付加し、当該制限酵素の処理で直鎖化した pCgNRp ベクターにクローニングした。得られたベクター pCgNRpCas9 をツノケイソウ野生株の形質転換に用いた。

ガイド RNA (gRNA) の発現ベクター pCgNRp<sup>ble</sup>-Lhcx1-RGR の構築は、以下の通りに行った。まず、PAM 配列 (NGG) を含む 20mer の *Lhcx1* 遺伝子標的配列 GTTGC TATGCTTGCCGTTATTGG (太字は PAM 配列を示す) を選定した。この配列の前後に自己プロセシング型リボザイムを連結させ、II 型の RNA ポリメラーゼで転写されるプロモーターを介して成熟 gRNA を発現させた (Gao & Zhao, 2014; Zhang *et al.*, 2017)。gRNA とリボザイムを含む DNA 断片の PCR 増幅には、以下の 3 つのプライマーを用いた: Lhcx1-RGR-F1: GACGAAACGAG TAAGCTCGTCTGTTGCTATGCTTGCCGTTATGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAG (太字は PAM 配列を除く gRNA ターゲット認識用の 20mer 配列を示す)、Lhcx1-RGR-F2: GTCAGGATCCAGCAACCTGATGAGTCCGT GAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC (下線は BamHI 制限酵素サイトを示す)、および PstI-RGR-Rv: ATAT CTGCAGGTCCCATTCCGATGCCAAGC (下線は PstI 制限酵素サイトを示す)。最初の断片 (199bp) を、Lhcx1-RGR-F1 と PstI-RGR-Rv プライマーを用いて pRS316-RGR-GFP (Addgene, #51056) を鋳型として

PCR で増幅した。次に 2 番目の断片 (231bp) を、最初の精製 PCR 産物から Lhcx1-RGR-F2 と PstI-RGR-Rv プライマーを用いて PCR で増幅した。精製した 2 番目の産物を BamHI と PstI で制限酵素処理し、同じ制限酵素で処理した pCgNRp<sup>ble</sup> ベクターにクローニングした。得られたプラスミドを pCgNRp<sup>ble</sup>-Lhcx1-RGR と名付け、hCas9 を発現するホスト株 (hC9\_5 株) の形質転換に用いた。

#### 珪藻の形質転換

我々が開発した、Super electroporator NEPA21 Type-II (ネッパジーン) を用いた多重パルス電圧ポレーション法による形質転換法を用いた (Ifuku *et al.*, 2015; Ifuku & Yan, 2020; Miyahara *et al.*, 2013)。C. *gracilis* への hCas9 遺伝子の形質転換は、DraIII と SapI で直鎖化した pCgNRpCas9 ベクターを用いた。目的遺伝子が導入されたコロニーを抗生物質ノルセオスリシン 400μg mL<sup>-1</sup> (clonNAT; Hans Knoell Institute) を含む IMK プレート上で選抜した。導入した hCas9 遺伝子の有無をコロニー PCR により確認した。最終的にゲノム編集に用いる hCas9 株 (hC9\_5 株) は、抗 Cas9 抗体 (Clontech) を用いたイムノプロットティングによって選抜した。

次に *Lhcx1* 遺伝子への変異導入のため、直鎖化した pCgNRp<sup>ble</sup>-Lhcx1-RGR を、電圧ポレーションによって hC9\_5 株に導入した。事前に上記ベクターを HindIII で直鎖化し、エタノール沈殿により 850–1000 ng μL<sup>-1</sup> に濃縮した。直鎖化ベクターの量は 1 回の電圧ポレーションあたり 5μg とした。目的遺伝子が導入されたコロニーを抗生物質ゼオシン 100μg mL<sup>-1</sup> (InvivoGen) を含む IMK プレート上で選抜した。変異導入は、Lhcx1\_seq\_FW プライマー: AGAGACTGTAAGGATTCGGA と Lhcx1\_seq\_RV: プライマー GAAGGAAGATCCCTCTACCT を用いた PCR で増幅した産物を、サンガーシーケンスすることにより確認した。

#### イムノプロットティング

珪藻細胞を回収し、62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)、2.5% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、10% (w/v) グリセロール、2.5% (v/v) 2-メルカプトエタノールおよび微量のプロモフェノールブルー (BPB) を含むサンプルバッファーで可溶化した。可溶化は 98℃ で 6 分間、続いて室温で 30 分間インキュベートし、その後遠心分離を行った。タンパク質濃度を 30μg/20μL に調整し、30μg のタンパク質を SDS-PAGE (分離ゲル 8%、濃縮ゲル 3%) で分離した。タンパク質を Immobilon-P PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、2000 倍希釈の抗 Cas9 ポリクローナル抗体 (Clontech) でインキュベートした。Lhcx1 を検出する際には、2μg のタンパ

ク質を SDS-PAGE (分離ゲル 15%, 濃縮ゲル 4.5%) で分離した. 抗 Lhcx1 ペプチド抗体はスカシガイヘモシアニンをキャリアタンパク質として合成ペプチド “KEEYAPGDLRFDPFGLMP” で免疫したウサギ血清である. 電気泳動後のゲルは転写緩衝液 (25mM Tris, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol, 0.05% SDS) で脱塩, 平衡化した. その後, ゲルからタンパク質を Immobilon-P PVDF メンブレン (Millipore) に転写し, 5000 倍希釈の抗 Lhcx1 抗体でインキュベートした. 目的タンパク質は, HRP を結合した 2 次抗体と Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) を用いて ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) により検出した.

#### PAM 蛍光測定

クロロフィル蛍光分析は, AquaPen AP-100 または AP-110 (Photon System Instruments) を用いて, 300 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の 450 または 455nm (青色) の作用光を用い, NPQ2 プロトコル (200 秒の明期と 390 秒の暗回復, 明期最初の飽和パルス光は照射開始 10 秒後) により行った. 測定パルス光の強度を 10% に, 飽和パルス光の強度を 30% (900 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  に相当) に設定した. 使用した珪藻細胞は測定前に 10 分間, 暗順応させた.

#### HPLC 色素分析

設定した条件で 3 日間培養した藻体を 1,500 $\times g$  で 5 分間遠心分離して回収し, 上清を除去した. 藻体を直ちに液体窒素で凍結し, 抽出まで -80 $^{\circ}C$  で保存した. 凍結藻体を 100% アセトン (Wako) を用い, 氷水中で 6 分間の超音波処理 (Bransonic, 出力 110W) により抽出した. その後, サンプルを 4 $^{\circ}C$  で 10,000 $\times g$  で 5 分間遠心分離した. 得られた上清を 0.45nm の親水性 PTFE フィルター (Hawach Scientific) でろ過し, HPLC 分析に供した. HPLC 分析は Zapata *et al.* (2000) と Nagao *et al.* (2020) に基づいて行った. 色素組の分離には, Inertsil C8 逆相カラム (250 $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m particle size, GL Sciences) を装着した HPLC システムを用い, フォトダイオードアレイ検出器により分離した色素を検出した. カラムオープンの温度は 40 $^{\circ}C$ , サンプル注入量は各分析で 20 $\mu$ L とした. 溶媒 A (メタノール:アセトニトリル:0.25M ピリジン=50:25:25 (v:v:v)) を初期溶媒とし, 溶媒 B (メタノール:アセトニトリル:アセトン=20:60:20 (v:v:v)) を以下の線形グラジエント法により段階的に加え, 色素をカラムから溶出した: 0-30 分:溶媒 B 0-40%; 30-32 分:溶媒 B 40-95%; 32-38 分:溶媒 B 95%; 38-40 分:溶媒 B 95-100%;

40-60 分:溶媒 B 100%. 流速は 0.9mL  $min^{-1}$  に設定した. 溶液 A に含まれる 0.25mol  $L^{-1}$  のピリジンは, 酢酸を用いて pH 5.0 に調製した. クロロフィル *a*, フコキサンチン, ジアジノキサンチン, ジアトキサンチンの標準色素は DHI 社 (Denmark) から購入し, 検量線を作成した.

#### 77K 定常状態蛍光スペクトル

測定用の細胞を 25 $^{\circ}C$  で 300 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の強光下で 3 日間培養した. サンプルを IMK 培地で希釈し, 10 $\mu$ g Chl *a+c*/150 $\mu$ L に調整した. Chl 濃度は 90% アセトンで抽出して測定した (Jeffrey & Humphrey, 1975). 希釈したサンプルを暗所または 300 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の強光で 30 分間処理し, 直ちに液体窒素で凍結した. 全細胞の低温定常蛍光放射スペクトルを, PMU-130 液体窒素冷却ユニットを備えた JASCO FP-8500 を用いて, 459nm 励起により 77K で測定した. スペクトルは 5 回の連続測定を 2.5nm のサンプリングピッチで統合した. スペクトルは PSII の CP47 ピーク (693-695nm) で規格化した (Andrizhiyevskaya *et al.*, 2005; Nagao *et al.*, 2010).

#### PSII アンテナサイズの測定

25 $^{\circ}C$  で 300 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の強光下で 3 日間培養した野生型 (WT) および 3 つの *lhcx1* 変異体 (*lhcx1-7*, *lhcx1-15*, *lhcx1-234*) のクロロフィル蛍光の誘導曲線を, 10 分の暗順応の後, 40 $\mu$ M DCMU 存在下で Fluorometer FL 3500 (Photon System Instruments) を利用して測定した (Nedbal *et al.*, 1999). 培養は 2 つの独立したバッチで培養した. 測定において, Flash intensity は 50% に, Flash duration は 100 $\mu$ s に設定した. 相対的アンテナサイズは, 最大蛍光強度に対する最初の 1 $\mu$ s 間の蛍光立ち上がりの初期傾きを測定することで決定した. 各株について 4 回の反復測定を行った. データ解析には R 統計ソフトウェア (R version 4.4.0) を使用し, tidyverse, readr, lme4, emmeans, ggplot2 パッケージを利用した. バッチ特有の変動を考慮するため, アンテナサイズの値は各バッチ内の WT 平均値で正規化した. 正規化されたデータに対して, 線形混合モデル (LMM) を適用した. 推定周辺平均を計算し, Tukey 法による多重比較を実施した. 統計的有意性の閾値は adjusted  $p < 0.05$  とした.

#### ツノケイソウのチラコイド膜調製

25 $^{\circ}C$ , 300 $\mu$ mol photons  $m^{-2}s^{-1}$  の強光で培養した野生株を 1,200 $\times g$ , 20 $^{\circ}C$  で 5 分間遠心し, 細胞を回収したのち, 人工海水に再懸濁し, 洗浄し, 再度遠心した. 上清を除去し, 1mL の人工海水に再懸濁し, 1.5mL マイクロチューブに移したのち, 21,500 $\times g$ , 4 $^{\circ}C$  で 5 分間遠心し, 沈澱を

得た。1mL細胞破碎バッファー（20mM tricine-KOH (pH 7.6), 0.4M sorbitol, 10% (w/v) polyethylene glycol 6000, 10mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA))に再懸濁し、0.5gの0.1mm径ガラスビーズと攪拌し、10秒間ビーズビーター（Mini Bead-Beater, BioSpec）で処理した。その後水中でよく冷やし、合計で3回破碎を繰り返した。上清を21,500×g, 4℃で5分間遠心し、沈澱を得た。その沈澱を1mL洗浄バッファー（20mM tricine-KOH (pH 7.6), 0.4M sorbitol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM EDTA）で再懸濁し、50×g, 4℃で5分間遠心した。上部と下部の夾雑物を取らないようにチラコイド膜を含む部分を取り、21,500×g, 4℃で5分間遠心し、チラコイド膜の沈澱を得た。沈澱を可溶性バッファー（50mM imidazole-HCl (pH 7.0 at 4℃), 20% (v/v) glycerol）に再懸濁し、一部を取り、クロロフィル*a*及び*c*の濃度を測定した（Jeffrey & Humphrey, 1975）。チラコイド膜は可溶性バッファーで、Chl *a+c*を1μg μL<sup>-1</sup>に調製した。

## 2D-CN/SDS-PAGE

Clear native (CN)-PAGEに用いた4-13%グラジエントゲルは既存の手法に従って作成した（Järvi *et al.*, 2011; Kameo *et al.*, 2021）。ただし、3×ゲルバッファーに75mM imidazole-HCl (pH 7.0 at 4℃), アクリルアミドは40% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (37.5:1) (ナカライテスク) を利用した。Anodeバッファーに25mM imidazole-HCl (pH 7.0 at 4℃), Cathode バッファーに50mM tricine, 7.5mM imidazoleを利用した。チラコイド膜は可溶性バッファーで、Chl *a+c*及びChl *a+b*を1μg μL<sup>-1</sup>に調製し、再懸濁した。等量の2% (w/v) dodecyl- $\alpha$ -D-maltoside ( $\alpha$ -DM, Anatrace) を加え、可溶性化し、2分氷上に置いたのち、21,500×g, 2分遠心し、未可溶性残渣を除いた。上清を半量の2% (w/v) amphipol A8-35 (Anatrace) と混合し、Chl 5μg/15μLずつウェルにアプライした。myPowerII 300 (アトー) を利用して40Vまたは1mAのいずれかを上限とする設定で、ミニゲル2枚を同時に660分間、4℃で泳動した。CN-PAGEゲルは50% (v/v) グリセロールに氷上で浸し、ゲルストリップに切断し、50% (v/v) グリセロール中で-80℃で用事まで保存した。

常温でゲルストラップを変性バッファー（1% SDS, 50mM dithiothreitol）30分間浸し可溶性化し、濃縮ゲル（pH 6.8, 分離ゲル（14%アクリルアミド（37.5:1）, 6M Urea, pH 8.6）のゲルにアプライし、電気泳動緩衝液（192mM Tris, 25mM glycine, 0.1% SDS）を用いて電気泳動した。250Vまたは100mAのいずれかを上限値とした設定で泳動を開始し、色素がマーカーウェルの底まで到達したところで一旦止め、Precision Dual Color

Standards (BioRad) をマーカーウェルにアプライした。その後、250V, または50mAのいずれかを上限値とした設定で泳動を再開し、色素がゲルの下端に達するまで70-90分間電気泳動した。泳動後に、Immunoblottingに利用しないゲルは、Oriole fluorescent gel stain (BioRad) で100分間蛍光染色し、蒸留水で洗浄したのちChemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad) により蛍光シグナルを検出した。

## 結 果

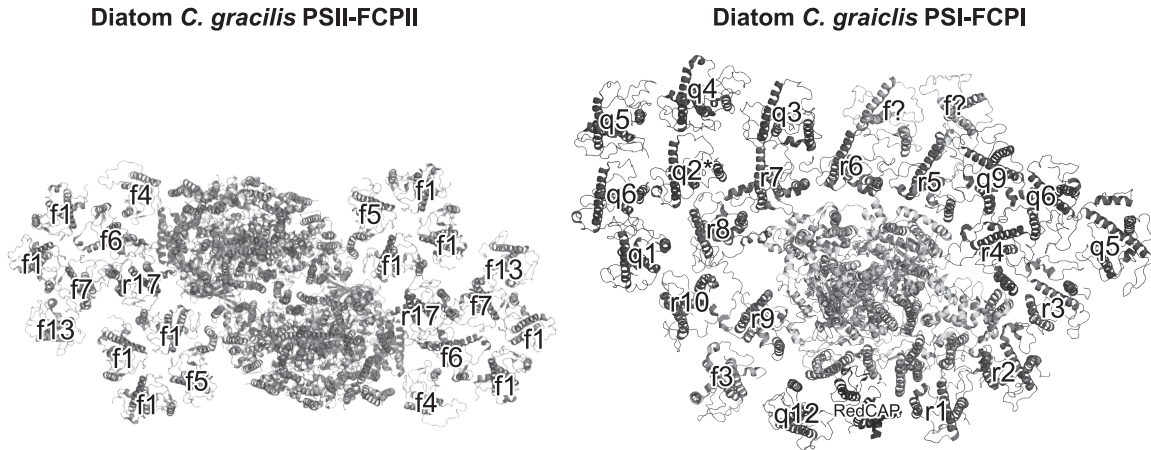
### ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* のゲノム情報と遺伝子発現解析

珪藻は全般的に弱光適応生物であり、光化学系の周囲に多数のLHCタンパク質からなる集光装置を有する。大きな集光装置は海洋での生育光環境に適応した結果だと考えられるが、人工的な培養系では光エネルギーの変換効率を下げる要因となる。また、珪藻は過剰な光に対する保護機構である非光化学的消光（Non-photochemical quenching: NPQ）を強く誘導するが、強すぎるNPQも光エネルギーの損失の要因となる。本研究では、ゲノム編集により、環境応答能と高い増殖性を維持したまま、適切に光合成の集光装置(LHC)の量(数)を縮小する、あるいは、NPQ抑制することを目指した。

ゲノム解析の結果、ツノケイソウにはLHCが46分子種あり、Lhcr, Lhcz, Lhcq, Lhcf, Lhcx, CgLhcf9の6つのサブファミリーに分類できた（Kumazawa *et al.*, 2022）。そのうち、19個のLHC分子種はPSIの周囲に（Nagao *et al.*, 2019, 2022; Wang *et al.*, 2019）、7個はPSIIの周囲に結合していた（Fig.1）。残った20個のLHC分子種については、チラコイド膜中で遊離した形で存在するか、特定の環境でのみ発現する分子種であると考えられる。本研究では、それらの機能解析を、様々な環境条件下における網羅的な遺伝子発現解析によって標的を絞り込んで進めた。本項ではそれらの成果の中から、NPQを行うLHCサブファミリーであるLhcxに属するLhcx1に着目した結果を報告する。

### Lhcx/Lhcsr サブファミリーに関する分子系統解析

非光化学的消光（Non-photochemical quenching: NPQ）を行うLHCサブファミリーである珪藻Lhcx, および、緑藻Lhcsrサブファミリーの起源を明らかにするために、紅藻及び緑藻、クリプト藻、珪藻のLHCの網羅的な分子系統解析を行った。LhcxとLhcsrは単系統のクレードを形成し、ブートストラップ値（100%）を示した。ツノケイソウ *Chaetoceros gracilis* Lhcx1-3はいずれも典型的なLhcxのクレードに位置した。また、



**Fig. 1 Cryo-EM structures of PSII-FCPII and PSI-FCPI supercomplexes in the diatom *Chaetoceros gracilis*.** The models of the complexes (PDB ID: 7VD5 and 6LY5) were visualized using Open-Source PyMOL v2.5.0 (<https://www.pymol.org/>).

Lhcx と Lhcsr のクレードは珪藻の Lhcq, CgLhcr9 homolog, Lhcf サブファミリーと共に単系統を示し、その単系統性は高いブートストラップ値 (100%) で支持された。そのクレード中で最も基部には Lhcq が存在しており、Lhcx/Lhcsr のクレードは内部に位置していた。一方で、Lhcx/Lhcsr クレードは Lhca/Lhcb クレードとは単系統を示さなかった。また、一次共生色素体を有する紅藻と緑藻で光捕集を担う LHC である紅藻の Lhcr と Lhca 及び Lhcb サブファミリーは単系統を示さず、両者の間にはクリプト藻 Lhcr 及び珪藻 Lhcr, クリプト藻及び珪藻 Lhcq の他、紅色進化系統の他のサブファミリーが存在した。以上の結果は、Lhcx/Lhcsr が紅色進化系統藻類に起源を持つことを強く示唆した (論文投稿中)。

#### *lhcx1* 欠損ゲノム編集株の作製

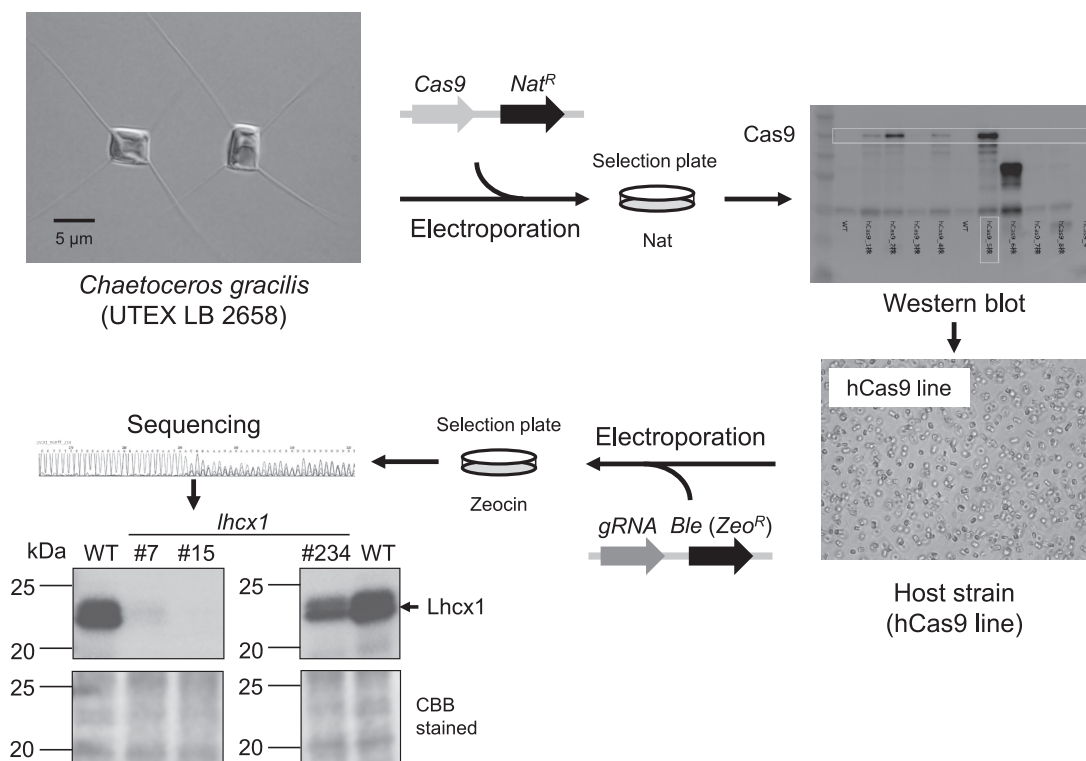
ツノケイソウの有する典型的な 3 遺伝子の *CgLhcx1-3* のうち、ChaetoBase (<https://chaetoceros.nibb.ac.jp/>) によると *CgLhcx1* の転写レベルの発現量が最も高かった (Kumazawa *et al.*, 2022)。そこで、ツノケイソウの *Lhcx1* 欠損変異体を CRISPR/Cas9 システムを利用して作製した。CRISPR/Cas9 システムでゲノム編集を行うには、Cas9 タンパク質とガイド RNA (gRNA) を細胞内で発現させる必要がある。gRNA を発現させるために、多くの場合、目的生物の内在性の U6 プロモーターが利用されるが、我々は mRNA の発現に利用される Pol II プロモーター下で誘導的に成熟した gRNA を細胞内に発現させることを考え、リボザイム (Ribozyme) を利用する手法を用いた (Gao & Zhao, 2014; T. Zhang *et al.*, 2017)。すなわち、gRNA の 5' 末端と 3' 末端のそれぞれに、3' 末端に自己切断活性を持つハンマーヘッドリボザイムと、

5' 末端に自己切断活性を有する HDV リボザイムを結合させた Ribozyme-gRNA-Ribozyme (RGR) コンストラクトを利用した。

まず、安定した Cas9 タンパク質を発現する宿主株の作成のために、ノルセオスリシン耐性遺伝子 (*nat*) を有するベクターの硝酸還元酵素プロモーター下に *hCas9* 遺伝子を導入し、エレクトロポレーションを利用した形質転換を行った (Fig.2, 上段)。抗生物質耐性選抜で得られたコロニーについて、完全な Cas9 タンパク質の発現とその蓄積量をイムノブロットで確認した。そのうち最も Cas9 タンパク質蓄積量が多かった *hC9\_5* 株について、野生株と同様の細胞形態と増殖特性を有することを確認し、これをゲノム編集宿主株とした。

次に、*Lhcx1* を標的とした gRNA 配列 20mer を有する形質転換ベクターとして、pCgNRp<sup>ble</sup>-*Lhcx1*-RGR を作成した。このコンストラクトでは RGR-gRNA カセットは硝酸還元酵素プロモーター支配下にあり、硝酸誘導的に高発現する。EcoRI と HindIII で二重制限酵素処理した pCgNRpLhcx1\_RGR を 5µg 使用して、*hCas9\_5* 株にエレクトロポレーションで形質転換した (Fig.2, 下段)。その結果、252 コロニーを獲得し、その内 23 コロニーの標的部位を PCR で増幅し、配列を確認すると 13 コロニーで配列の変異が確認された。標的配列の編集が確認された株のうち、*lhcx1-7*, 15, 234 株を以降の解析で利用した。サンガーシークエンスで *Lhcx1* 領域の塩基配列を確認すると、*lhcx1-7*, 15, 234 株において複数の異なる変異型が同一株に混在していた。そのため、抗 *Lhcx1* 抗体を利用したイムノブロットにより、これらの株の *Lhcx1* タンパク質蓄積量を調べた。*lhcx1-7* 及び *lhcx1-15* 株はほとんど *Lhcx1* タンパク質の蓄積が認められなかつ





**Fig. 2 Experimental flow of creating Lhcx1-deficient mutants by genome editing.**

The *lhc* knockout mutants were created through genome editing using our CRISPR-Cas9 system. To systematically generate the *lhc* mutant, we developed a host strain that expresses Cas9 nuclease under the control of an inducible nitrate reductase (NR) promoter and also introduced gRNA to target the mutation. With this two-step process, mutants can be produced efficiently. Immunoblotting with anti-Lhcx1 antibody shows that several knockout and knockdown *lhcx1* mutant lines were successfully created.

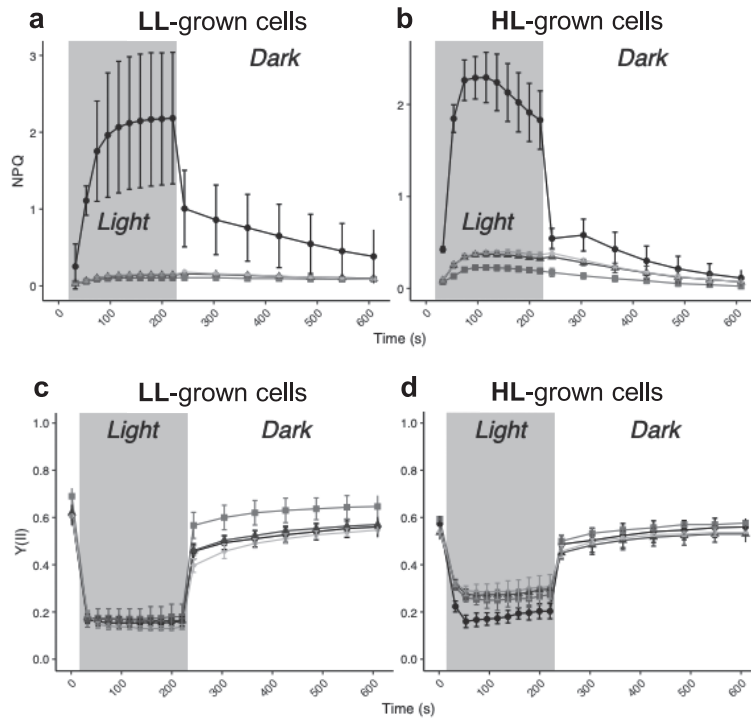
た。一方で、*lhcx1-234* は野生株と比較して Lhcx1 の蓄積量を減少させていたものの完全な欠損ではなかった。

#### *lhcx1* 変異株の光合成特性

野生株と *lhcx1-7*, *15*, *234* 株を弱光 (LL)  $30\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  及び強光 (HL)  $300\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  で7日間の通気培養を行った。増殖は野生株とゲノム編集株で大きな差異は見られなかった。野生株と *lhcx1* の光合成特性を調べるために、弱光及び強光培養した細胞を用いてクロロフィル蛍光測定を行った。その結果、*lhcx1-7*, *15*, *234* は光化学系 II の過剰な励起エネルギーの熱放散指標である NPQ を弱光と強光のいずれの条件でもほとんど誘導できなかった (Fig.3a, b)。興味深いことに、光化学系 II の実効量子収率である Y (II) (または Qy) は、強光で7日間培養した細胞において、*lhcx1* のいずれの株でも野生株に対して高い値を示した (Fig.3d, 論文投稿中, 特許出願済)。このことは *lhcx1* 変異株において、NPQ で散逸されなかった光エネルギーの一部が、PSII の光化学反応に使われたことを示唆していた。

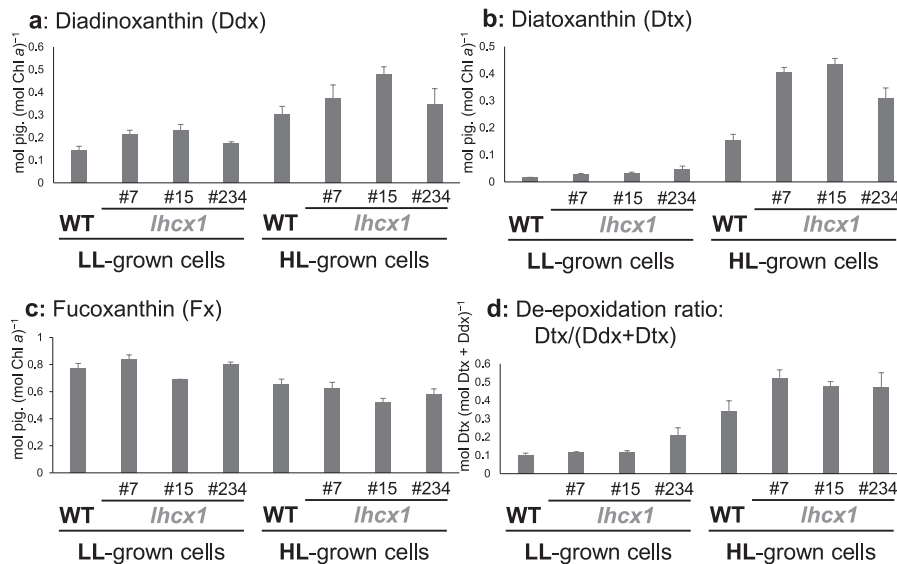
#### 細胞の全吸収スペクトルと色素組成の変化

細胞の全吸収スペクトルを測定すると、弱光で培養した細胞で野生株と *lhcx1* 変異体で顕著な差異は見られなかった一方で、強光で培養した細胞では *lhcx1* 変異体が野生株と比較して、400–500nm の領域で大きな吸収を示した (論文投稿中, data not shown)。この領域はカロテノイドの吸収領域であるため、カロテノイド含量を調べるために HPLC を利用した色素定量を行った。カロテノイド量は全吸収スペクトルがクロロフィル *a* のピークで正規化していたため、クロロフィル *a* 量あたりで定量した。珪藻のキサントフィルサイクルの主要な色素である Diadinoxanthin (Ddx) と Diatoxanthin (Dtx) ではいずれも弱光条件では野生株と *lhcx1* 変異体で有意な蓄積量の差は見られなかった (Fig.4a, b)。一方、強光条件において野生株は弱光条件下より多くの Dtx の蓄積した。さらに変異株では、同条件の野生株に対して有意に多くの Dtx を蓄積していた。Ddx に関しては、野生株と変異体のいずれもが強光条件で弱光条件より多くの蓄積を示したが、変異体の野生株に対する有意な蓄積量



**Fig. 3** Chlorophyll fluorescence analysis of *C. gracilis* wild-type and *lhcx1* mutant strains cultured with air bubbling under low light (LL) and high light (HL).

(a, b) Non-photochemical quenching (NPQ) of LL and HL grown cultures. (c, d) Quantum yield of photosystem II, Y(II), of LL and HL grown cultures. The values indicated by black circles connected with black lines represent those of the wild-type strain. The values indicated by gray triangles, squares, and diamonds with gray lines represent those of the *lhcx1* mutant strains (No. 7, 15, and 234, respectively).



**Fig. 4** Pigment analysis of low light (LL) and high light (HL) grown diatom cultures.

(a) Diadinoxanthin (Ddx) content. (b) Diatoxanthin (Dtx) content. (c) Fucoxanthin (Fx) content. (d) De-epoxidation state (DEPS =  $[Dtx]/([Dtx]+[Ddx])$ ). Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ).

の増加は、No. 15株を除いて見られなかった。ツノケイソウのFCPで主要なカロテノイドであるフコキサンチンは各光条件下で、強光条件のNo. 15株を除き、野生株と変異体で有意な差は見られなかった (Fig.4c)。強光条件のNo. 15株は、同条件の野生株に対して僅かに少ないフコキサンチン量を示した。DtxとDdxの蓄積量からキサントフィルサイクルの指標である脱エポキシ化率 (de-epoxidation state: DEPS =  $[Dtx] / ([Dtx] + [Ddx])$ ) を計算した (Fig.4d)。弱光では野生株と変異体で有意な差はなかった。強光では野生株は弱光条件と比較して高いDEPS (0.34) を示した。変異体は同条件の野生株より有意に高いDEPS (0.47-0.52) を示した。以上の結果は、*lhcx1* 変異体ではNPQを誘導できない一方で、カロテノイド合成などの別の強光順化機構が活性化していることを示唆していた。

#### 定常低温蛍光スペクトルとクロロフィル蛍光誘導による集光能力の評価

強光で培養した野生株と *lhcx1* を暗所処理及び強光処理をそれぞれ30分行ったのち、速やかに液体窒素で凍結させ、低温蛍光スペクトルを測定した (Kumazawa *et al.* 2025, data not shown)。低温定常蛍光スペクトルは、光化学系と集光性色素タンパク質の励起エネルギー分配を表す。励起光の波長は459nmとし、これは珪藻の周辺アンテナFCPに結合しているクロロフィルcやフコキサンチンを効率的に励起する波長である。ツノケイソウの低温定常蛍光スペクトルは、光化学系IIのCP43とCP47に由来する二つのピークを持つことが特徴である。これらのピークはそれぞれ686nmと694nm付近に見られる。強光で培養した細胞のいずれも、CP47のピークで正規化したスペクトルで、野生株と比較して変異体はより高いCP43のピークを示した。また、遊離のFCPの蛍光であるとされる680nm付近の蛍光強度は弱光の *lhcx1* 変異体で野生株と比較して大きかった。これらは、周辺アンテナFCPからCP43を介したエネルギー移動が暗所において増加していることを示していた。すなわち、暗所においては野生株と *lhcx1* でPSIIの有効アンテナサイズが異なると考えられた。クロロフィル蛍光の誘導曲線の測定により、強光で培養した細胞の暗順応後のアンテナサイズを評価したところ、*lhcx1* はいずれの株でも野生株と比較して有意に小さなPSIIの有効アンテナサイズを有することが認められた。これらの結果から、NPQが欠損した状態では集光装置が縮小し、強光下での光エネルギーの利用効率が向上していると考えられた。

#### チラコイド膜中におけるLhcx1の相互作用

Lhcxのチラコイド膜における局在を明らかにするため

に、Native-PAGEとそれに続く二次元SDS-PAGE、そして抗Lhcx1抗体を用いたイムノプロット解析を行った (論文投稿中, data not shown)。従来のClear Native (CN)-PAGEではC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (Core<sub>2</sub>-S-tetramer<sub>2</sub>-M-tetramer<sub>2</sub>) 型のPSII-LHCIIを分離することが困難であったため (Nagao *et al.*, 2012)、可溶化したタンパク質の安定性を向上させるAmphipol A8-35 (Anatrace, USA) を負電荷を与える界面活性剤として利用した改良型CN-PAGEを採用した (Kameo *et al.*, 2021)。その結果、高分子側のバンドと、低分子型のややブロードな褐色のバンドが認められた。このCN-PAGEゲルストリップを用いて二次元目のSDS-PAGEをし、複合体に含まれるサブユニットを分離した結果、バンドパターンから高分子側のバンドにはC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>型のPSII-LHCII複合体が含まれ、低分子側のバンドには遊離したLHCが含まれると考えられた。Lhcx1の位置を同定するために、特異的抗体を用いたイムノプロット解析を行った。その結果、Lhcx1のシグナルは、チラコイド膜中でPSII複合体から遊離したLHCであるL-dimer (FCP-B/C) と共移動することが示唆された。

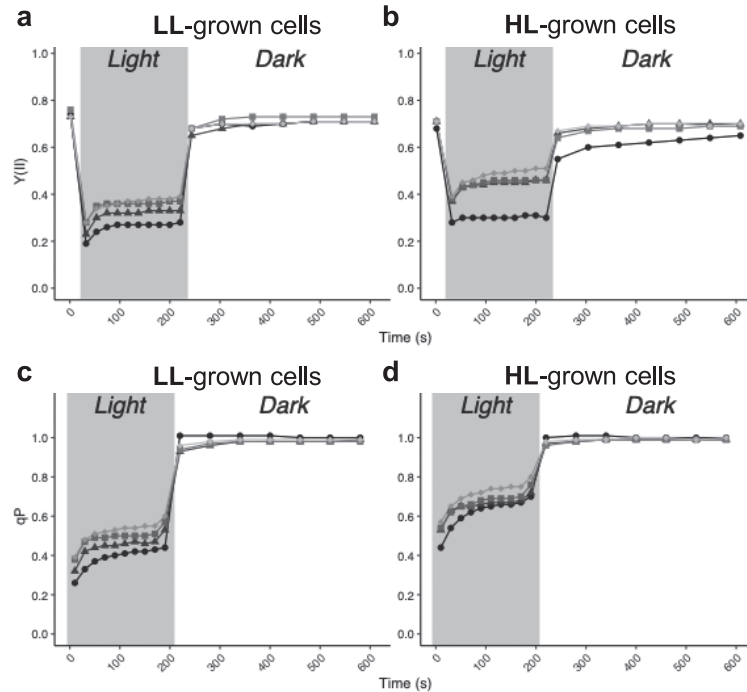
#### 高CO<sub>2</sub>環境で *lhcx1* 変異体は高い光合成活性を示す

通常の大気通気条件で強光に順化することでより高いPSIIの実効量子収率を示した *lhcx1* 変異体は、光合成電子伝達鎖の下流の電子シンク能を3%の二酸化炭素添加によって向上させることで、さらにPSII実効量子収率が向上するか調べた。まず、二酸化炭素通気で培養しても、*lhcx1* は光強度を問わず、NPQをほとんど示さなかった。PSII実効量子収率Y(II) (Q<sub>y</sub>) は、大気通気で差が見られなかった弱光においても二酸化炭素通気で培養することで、*lhcx1* で上昇した (Fig.5a)。照射下のY(II)は、照射開始初期においては時間経過とともに上昇し、2分程度で一定の値となっており、炭酸同化経路の活性化によるものだと考えられる。さらに強光においても、明確なY(II)の上昇が見られた (Fig.5b)。プラスチックの酸化還元状態を示す光化学的消光qPは、特に強光においては、*lhcx1* のqPが野生株と同等か、より高い値を示した (Fig.5c, d)。高いY(II)に伴って電子伝達の下流が活性化されて電子シンクとして機能することで、プラスチックプールが酸化的に保たれていると考えられる。

## 考 察

#### Lhcx/Lhcsr サブファミリーの起源

珪藻をはじめとした、不等毛藻やハプト藻などの紅色進化系統二次共生藻類で非光化学的消光NPQを担うLhcxサブファミリーと、緑藻、ストレプト藻類及び蘚



**Fig. 5 Chlorophyll fluorescence analysis of *C. gracilis* wild-type and *lhcx1* mutant strains cultured with 3% CO<sub>2</sub> bubbling under low light (LL) and high light (HL).**

(a, b) Quantum yield of photosystem II, Y(II), of LL and HL grown cultures. (c, d) The coefficient of photochemical quenching (qP) of LL and HL grown cultures. The values indicated by black circles connected with black lines represent those of the wild-type strain. The values indicated by gray triangles, squares, and diamonds with gray lines represent those of the *lhcx1* mutant strains (No. 7, 15, and 234, respectively).

類でNPQを担うLhcsrサブファミリーは、単系統を形成することから、共通の祖先遺伝子を有するとされてきた (Koziol *et al.*, 2007). Lhcx/Lhcsrサブファミリーは、紅色進化系統由来であると示唆されているものの、他のサブファミリーとの詳細な分子系統関係は、おそらく配列情報の不足のために詳細に調べられてこなかった (Dittami *et al.*, 2010). 解析の結果、Lhcx/Lhcsrのクレードは、珪藻Lhcq, CgLhcr9 homolog, Lhcfサブファミリーと強い支持で共に単系統を示し、緑藻Lhca/Lhcbサブファミリーとは異なるクレードにあったことから、明確に紅色進化系統藻類由来であると示された。中でもLhcx/Lhcsrのクレードは、CgLhcr9 homolog, Lhcfサブファミリーと単系統を示したことから、LhcxサブファミリーはLhcq, CgLhcr9 homolog, Lhcfサブファミリーなどと共に不等毛藻で生じたと考えられる。また、Lhcsrはコア緑藻とストレプト藻類の両方で保存されていることから、現生緑色植物の最終共通祖先以前に、不等毛藻もしくはハプト藻と推測される紅色進化系統藻類からLhcx/Lhcsrサブファミリーを水平伝播によって獲得したという可能性を支持した。

#### NPQを欠損する変異体における強光順化

ゲノム編集を利用して、ツノケイソウで最も高発現しているLhcx1を欠損した*lhcx1*株は、NPQをほとんど誘導せず、強光順化させることで野生株より高いPSII実効量子収率を示した。一般的に陸上植物のNPQの変異体では強光順化でPSIIの電子伝達活性は低下、すなわちPSIIの実効量子収率は低下するため、本研究のNPQの変異体である*lhcx1*がより高いPSII実効量子収率を示すのは特異であり、新規な発見である。*lhcx1*は強光順化で暗順化させてもアンテナサイズが小さくなっていることから、PSIIコアあたりの励起エネルギーの獲得が減少することが、より高いPSII実効量子収率に寄与していると考えられる。また、二酸化炭素の付加によって、弱光条件によってもPSII実効量子収率は上昇したことから、電子伝達鎖下流の炭素固定能の上昇もPSII実効量子収率の向上に寄与したと言える。この下流の電子シンクの拡大は強光条件でもより強く起こっていたと考えられ、陸上植物とは異なる珪藻特有の強光順化機構の存在が示唆される。

*lhcx1*では野生株と比較して色素組成においても強光

順化が見られた。細胞数あたりのクロロフィル量は *lhcx1* で減少し、クロロフィルあたりの Fx 量は変化しなかった一方で、Dtx や Ddx のキサントフィル量は増加していた。Dtx と Ddx から計算される脱エポキシ化率 (DEPS) も強光の *lhcx1* で上昇していたことから、色素組成の観点からも強光での順化応答は促進されている。一般に野生株の珪藻では Dtx の量は NPQ の強度と非常に良い相関を持つ (Lavaud & Lepetit, 2013)。しかし、*lhcx1* 株は、Dtx 量は増加しているものの NPQ の誘導はほとんど見られないことから、Dtx の量は NPQ の相関には Lhcx の存在が前提であると言える。ただし、増加したキサントフィルが FCP にアセンブルされているのかは本研究では明らかにできておらず、今後、生化学的に FCP を分離し色素分析することや、FCP を含む超複合体の高解像度の構造解析を行う必要がある。

#### 珪藻の NPQ 生成の分子機構について

珪藻 Lhcx のチラコイド膜における局在と相互作用は長年議論されてきた。これまで Lhcx は *Phaeodactylum tricornutum* の Lhcx1/Lhcx2 が PSI に結合しているという報告 (Grouneva *et al.*, 2011) がある以外は、遊離の FCP やバルクの FCP 中に検出されてきた (Grouneva *et al.*, 2011; Lepetit *et al.*, 2010)。また、CN-PAGE に続いた SDS-PAGE でも *Thalassiosira pseudonana* の Lhcx1 は遊離の単量体として検出されていた (Zhou *et al.*, 2024)。本研究では、より膜タンパク質の安定性を高める界面活性剤である Amphipol A8-35 を利用することで、これまでの CN-PAGE では困難であった珪藻 C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub> PSII-FCPII を保った分離が可能となった。この条件下では、CgLhcf12/CgLhcf2 (FCP-B/C) からなる二量体

(L-dimer) はブロードなバンドを形成し、このバンドは CgLhcx1 と共移動していた。これらから、CgLhcx1 は FCP L-dimer と相互作用することが示唆された。この結果は、Lhcx1 を介した光エネルギーの散逸が周辺アンテナで起こること示唆する我々の時間分解蛍光解析の結果とも一致する (論文投稿中)。海洋の紅色進化系統藻類における光合成最適化機構の一端が解明できたと考えている。

#### 要 約

本研究では、海洋性珪藻であるツノケイソウ *C. gracilis* の集光タンパク質 LHC/FCP の機能解明を進めた。その中で Lhcx1 は、ゲノム編集で欠損させるとツノケイソウの非光化学的消光 NPQ の誘導能がほぼ完全に消失した。NPQ の欠損した *lhcx1* 株はツノケイソウの有する各種の強光防御システムを誘導することで順化し、野生株と比べて高い PSII 活性を示した。PSII 活性の上昇は二酸化炭素の付加によっても *lhcx1* で誘導されることから、上流の光捕集系の変化とともに電子伝達鎖の下流の電子シンクの順化もツノケイソウの強光順化において重要な役割を果たしていることが明らかになった (Fig.6)。この結果は、珪藻の光捕集能力をゲノム編集で人為的に操作することで光合成の光エネルギー変換効率の向上が可能であることを初めて明らかにした例である。海洋性珪藻類であるツノケイソウは、変動の激しい海洋環境に適応するため、複数の光防御メカニズムを進化させてきたと考えられる。本研究では、これらの防御システムが相互に関連し、環境変化に応じて柔軟に制御されている可能性を示唆した。

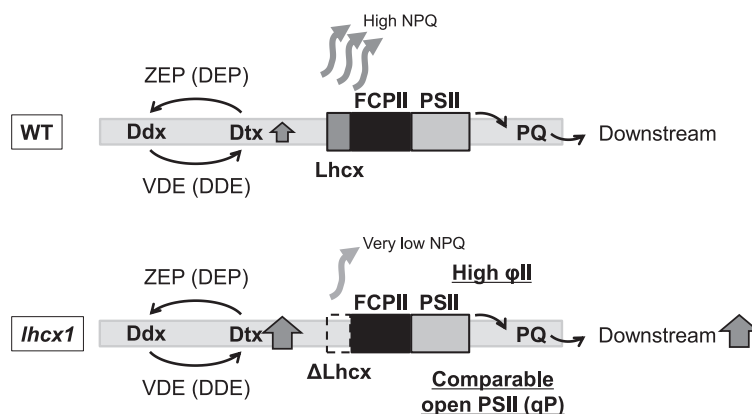


Fig. 6 Schematic diagram of strong light stress response in wild-type and *lhcx1* mutant strains. See text for details.

## 本助成で得られた研究成果の報告

## 口頭発表

- 1) Ifuku, K., Molecular and structural basis of the light-harvesting and photoprotection in the diatom *Chaetoceros gracilis*, Arizona, US-Japan Binational Photosynthesis Workshop (2024年11月6-8日, テンペ, アリゾナ), 招待講演
- 2) Xing, J., Kumazawa, M., Akimoto, S., Tsuji, S., Ishikawa, N., Ifuku, K., Excitation energy re-distribution between PSII and PSI in Marine Diatom *Chaetoceros gracilis* with a truncated PSI-FCPI supercomplex, 第65回 日本植物生理学会年会 (2024年3月17-19日, 仙台)
- 3) 熊沢 穰, 長尾 遼, 高林 厚史, 伊福 健太郎, 紅藻と紅色系統二次共生藻における LHCI の多様化過程, 第65回 日本植物生理学会年会 (2024年3月17-19日, 仙台)
- 4) 伊福 健太郎, 紅色進化系統藻類における集光性色素タンパク質の多様化と機能, 日本植物学会シンポジウム (2024年9月14-16日, 宇都宮), 招待講演
- 5) Kumazawa, M., Ifuku, K., Novel Insights into Red-Lineage LHCI Evolution from Protein Complex Structures and Molecular Phylogeny, 2nd Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (2024年9月18-21日, 神戸)
- 6) Ifuku, K., Molecular function of the PsbP protein in the water oxidizing reaction of photosystem II, International Conference on Developments in Plant Biology and Biotechnology (ICDPBB 2025) (2025年1月29-31日, ハイデラバード, インド), 招待講演
- 7) 熊沢 穰, 秋本 誠志, 高林 厚史, 辻 祥子, 長谷川 葉月, 櫻井 敦, 今村 壮輔, 石川 規子, 井上(菓子野)名津子, 菓子野 康浩, 伊福 健太郎, ツノケイソウにおける Lhcx タンパク質を介した光防御と強光順化の統合, 第66回 日本植物生理学会年会 (2025年3月14-16日, 金沢)
- 8) 中村 翠, 熊沢 穰, 長尾 遼, 辻 祥子, 鈴木 健裕, 石川 規子, 堂前 直, 秋本 誠志, 伊福 健太郎, 海洋珪藻 *Chaetoceros gracilis* の光と CO<sub>2</sub> に応答した集光性色素タンパク質のリモデリング, 第66回 日本植物生理学会年会, (2025年3月14-16日, 金沢)

## 原著論文

- 1) Kumazawa, M. & Ifuku, K. 2024. Unraveling the evolutionary trajectory of LHCI in red-lineage algae: Conservation, diversification, and neolocalization, *iScience* **27**: 110897-110897.

## その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Kumazawa, M., Ishikawa, N., Tsuji, S., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y. & Ifuku, K. Photosynthetic properties of the lhcx1 knock-out mutant of the centric diatom *Chaetoceros gracilis* lacking energy-dependent NPQ, *The Molecular Life of Diatoms* **7** (2023年6月16-20日, サンディエゴ, カルフォルニア) 優秀ポスター発表賞
- 2) 中村 翠, 熊沢 穰, 長尾 遼, 石川 規子, 伊福 健太郎, ツノケイソウの赤色光培養で蓄積する集光性色素タンパク質を介した光環境適応機構の解明, ユーグレナ研究会 第38回研究集会 (2023年11月11日, 神奈川), 優秀ポスター発表賞
- 3) Nakamura, M., Kumazawa, M., Nagao, R., Tsuji, S., Suzuki, T., Ishikawa, N., Dohmae, N., Akimoto, S. & Ifuku, K. A Light-harvesting protein for adaptation in specific light and

CO<sub>2</sub> conditions in the marine diatom *Chaetoceros gracilis*, 12th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (2024年10月13-19日, イスタンブール, トルコ), 優秀ポスター発表賞  
4) 特願225-034656, 改変藻類, 飼育または養殖水産動物の餌の製造方法, および飼育または養殖水産動物の餌, 出願日: 2025年3月5日, 出願者: 京都大学, 日本電信電話株式会社

## 謝 辞

本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また, 本研究の遂行にご協力いただいた神戸大学大学院理学研究科 秋本 誠志 先生, および京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻植物栄養学分野の熊沢 穰 博士 (現 北海道大学低温科学研究センター), 石川 規子 研究員 (現 奈良先端科学技術大学院大学), 辻 祥子 研究員 (現 京都大学大学院農学研究科森林科学専攻), ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。

## 文 献

- Allorent, G., Lefebvre-Legendre, L., Chappuis, R., Kuntz, M., Truong, T. B., Niyogi, K. K., Ulm, R. & Goldschmidt-Clermont, M. 2016. UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: 14864-14869.
- Andrizhiyevskaya, E.G., Chojnicka, A., Bautista, J. A., Diner, B. A., Van Grondelle, R. & Dekker, J. P. 2005. Origin of the F685 and F695 fluorescence in Photosystem II. *Photosynth. Res.* **84**: 173-180.
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J. F., Dessimoz, C. & Gascuel, O. 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *System. Biol.* **60**: 685-699.
- Bailleul, B., Rogato, A., De Martino, A., Coesel, S., Cardol, P., Bowler, C., Falciatore, A. & Finazzi, G. 2010. An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 18214-18219.
- Büchel, C. 2015. Evolution and function of light harvesting proteins. *J. Plant Physiol.* **172**: 62-75.
- Buck, J. M., Kroth, P. G. & Lepetit, B. 2021. Identification of sequence motifs in Lhcx proteins that confer qE-based photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant J.* **108**: 1721-1734.
- Buck, J. M., Sherman, J., Bártulos, C. R., *et al.* 2019. Lhcx proteins provide photoprotection via thermal dissipation of absorbed light in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nature Commun.* **10**: 4167.
- Croce, R. & van Amerongen, H. 2020. Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy. *Science*, **369**: eaay2058.
- Delwiche, C.F. 1999. Tracing the Thread of Plastid Diversity

- through the Tapestry of Life. *Am. Nat.* **154**: S164-S177.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237-240.
- Dittami, S.M., Michel, G., Collén, J., Boyen, C. & Tonon, T. 2010. Chlorophyll-binding proteins revisited - a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 365.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. 2012. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**: 3150-3152.
- Gao, Y. & Zhao, Y. 2014. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integ. Plant Biol.* **56**: 343-349.
- Giovagnetti, V., Jaubert, M., Shukla, M.K., Ungerer, P., Bouly, J.P., Falcatore, A. & Ruban, A.V. 2022. Biochemical and molecular properties of LHCX1, the essential regulator of dynamic photo-protection in diatoms. *Plant Physiol.* **188**: 509-525.
- Goss, R. & Lepetit, B. 2015. Biodiversity of NPQ. In *Journal of Plant Physiology*, Vol. 172, pp. 13-32. Urban und Fischer Verlag GmbH und Co. KG.
- Grouneva, I., Rokka, A. & Aro, E.M. 2011. The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J. Prot. Res.* **10**: 5338-5353.
- Groussman, R.D., Parker, M.S. & Armburst, E.V. 2015. Diversity and evolutionary history of iron metabolism genes in diatoms. *PLoS ONE* **10**: e0129081.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *System. Biol.* **59**: 307-321.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q. & Vinh, L.S. 2018. UFBot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 518-522.
- Ifuku, K. & Yan, D. 2020. Efficient transformation of the diatoms *Phaeodactylum tricornerutum* by multipulse electroporation. *Methods in Mol. Biol.* **2050**: 169-174.
- Ifuku, K., Yan, D., Miyahara, M., Inoue-Kashino, N., Yamamoto, Y. Y., & Kashino, Y. 2015. A stable and efficient nuclear transformation system for the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth. Res.* **123**: 203-211.
- Im, S.H., Lepetit, B., Mosesso, N., *et al.* 2024. Identification of promoter targets by Aureochrome 1a in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *J. Exp. Bot.* **75**: 1834-1851.
- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkari, V. & Aro, E.M. 2011. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: Novel super- and mega-complexes. *Biochem. J.* **439**: 207-214.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **167**: 191-194.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A. & Jermiin, L.S. 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* **14**: 587-589.
- Kameo, S., Aso, M., Furukawa, R., Matsumae, R., Yokono, M., Fujita, T., Tanaka, A., Tanaka, R. & Takabayashi, A. 2021. Substitution of deoxycholate with the amphiphilic polymer amphipol A8-35 improves the stability of large protein complexes during native electrophoresis. *Plant Cell Physiol.* **62**: 348-355.
- Katoh, K. & Standley, D.M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 772-780.
- Kozioł, A.G., Borza, T., Ishida, K.I., Keeling, P., Lee, R. W. & Durnford, D.G. 2007. Tracing the evolution of the light-harvesting antennae in chlorophyll *a/b*-containing organisms. *Plant Physiol.* **143**: 1802-1816.
- Kumazawa, M. & Ifuku, K. 2024. Unraveling the evolutionary trajectory of LHCI in red-lineage algae: Conservation, diversification, and neolocalization. *iScience* **27**: 110897.
- Kumazawa, M., Nishide, H., Nagao, R., Inoue - Kashino, N., Shen, J., Nakano, T., Uchiyama, I., Kashino, Y. & Ifuku, K. 2022. Molecular phylogeny of fucoxanthin - chlorophyll *a / c* proteins from *Chaetoceros gracilis* and Lhcq/Lhcf diversity. *Physiol. Plant.* **174**: e13598.
- Lavaud, J. & Kroth, P. G. 2006. In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1010-1016.
- Lavaud, J. & Lepetit, B. 2013. An explanation for the inter-species variability of the photoprotective non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1827**: 294-302.
- Lepetit, B., Volke, D., Gilbert, M., Wilhelm, C. & Goss, R. 2010. Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiol.* **154**: 1905-1920.
- Letunic, I. & Bork, P. 2024. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucl. Acids Res.* **52**: W78-W82.
- Marquardt, J., & Rhiel, E. 1997. The membrane-intrinsic light-harvesting complex of the red alga *Galdieria sulphuraria* (formerly *Cyanidium caldarium*): biochemical and immunohistochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1320**: 153-164.
- Minh, B.Q., Dang, C.C., Vinh, L.S., & Lanfear, R. 2021. QMaker: Fast and accurate method to estimate empirical models of protein evolution. *System. Biol.* **70**: 1046-1060.
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A. & Lanfear, R. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* **37**: 1530-1534.
- Miyahara, M., Aoi, M., Inoue-Kashino, N., Kashino, Y. & Ifuku, K. 2013. Highly efficient transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* by multi-pulse electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **77**: 874-876.
- Nagao, R., Kato, K., Ifuku, K., *et al.* 2020. Structural basis for assembly and function of a diatom photosystem I-light-harvesting supercomplex. *Nature Commun.* **11**: 2481.
- Nagao, R., Kato, K., Kumazawa, M., *et al.* 2022. Structural basis for different types of hetero-tetrameric light-harvesting complexes in a diatom PSII-FCPII supercomplex. *Nature Commun.* **13**: 1764.
- Nagao, R., Kato, K., Suzuki, T., *et al.* 2019. Structural basis for

- energy harvesting and dissipation in a diatom PSII-FCPII supercomplex. *Nature Plants* **5**: 890–901.
- Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, E., *et al.* 2010. Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1797**: 160–166.
- Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, E., Suzuki, T., Okumura, A., Narikawa, R., Enami, I. & Ikeuchi, M. 2012. Proteases are associated with a minor fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein from the diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1817**: 2110–2117.
- Nagao, R., Ueno, Y., Akimoto, S. & Shen, J.R. 2020. Effects of CO<sub>2</sub> and temperature on photosynthetic performance in the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth. Res.* **146**: 189–195.
- Nedbal, L., Trtfllek, M. & Kaftan, D. 1999. Flash fluorescence induction: a novel method to study regulation of Photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48**: 154–157.
- Park, S., Steen, C. J., Lyska, D., Fischer, A. L., Endelman, B., Iwai, M., Niyogi, K.K. & Fleming, G.R. 2019. Chlorophyll-carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **116**: 3385–3390.
- Petroutsos, D., Tokutsu, R., Maruyama, S., Flori, S., Greiner, A., Magneschi, L., Cusant, L., Kottke, T., Mittag, M., Hegemann, P., Finazzi, G. & Minagawa, J. 2016. A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis. *Nature* **537**: 563–566.
- Pi, X., Tian, L., Dai, H.-E., Qin, X., Cheng, L., Kuang, T., Sui, S.-F. & Shen, J.-R. 2018. Unique organization of photosystem I-light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **115**: 4423–4428.
- Steenwyk, J.L., Buida, T.J., Li, Y., Shen, X.-X. & Rokas, A. 2020. ClipKIT: A multiple sequence alignment trimming software for accurate phylogenomic inference. *PLOS Biol.* **18**: e3001007.
- Tokushima, H., Inoue-Kashino, N., Nakazato, Y., Masuda, A., Ifuku, K. & Kashino, Y. 2016. Advantageous characteristics of the diatom *Chaetoceros gracilis* as a sustainable biofuel producer. *Biotechnol. Biofuels* **9**: 235.
- Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Matsuo, T., Yamasaki, T. & Minagawa, J. 2019a. The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature Commun.* **10**: 4099.
- Tokutsu, R., Fujimura-Kamada, K., Yamasaki, T., Matsuo, T. & Minagawa, J. 2019b. Isolation of photoprotective signal transduction mutants by systematic bioluminescence screening in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* **9**: 2820.
- You, X., Zhang, X., Cheng, J., Xiao, Y., Ma, J., Sun, S., Zhang, X., Wang, H.-W. & Sui, S.-F. 2023. *In situ* structure of the red algal phycobilisome-PSII-PSI-LHC megacomplex. *Nature* **616**: 199–206.
- Wang, W., Yu, L.-J., Xu, C., *et al.* 2019. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science* **363**: eaav0365.
- Wolfe, G. R., Cunningham, F. X., Grabowski, B. & Gantt, E. 1994. Isolation and characterization of Photosystems I and II from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1188**: 357–366.
- Xu, C., Pi, X., Huang, Y., *et al.* 2020. Structural basis for energy transfer in a huge diatom PSI-FCPI supercomplex. *Nature Commun.* **11**: 5081.
- Zapata, M. Rodríguez, F. & Garrido, J.L. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C<sub>8</sub> column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecol. Prog. Series*, **195**: 29–45.
- Zhang, S., Si, L., Su, X., Zhao, X., An, X., & Li, M. 2024. Growth phase-dependent reorganization of cryptophyte photosystem I antennae. *Commun. Biol.* **7**: 560.
- Zhang, T., Gao, Y., Wang, R., & Zhao, Y. 2017. Production of guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR using ribozymes and RNA polymerase II promoters. *Bio Protoc.* **7**: e2148.
- Zhou, C., Feng, Y., Li, Z., Shen, L., Li, X., Wang, Y., Han, G., Kuang, T., Liu, C., Shen, J.-R., & Wang, W. 2024. Structural and spectroscopic insights into fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding proteins of diatoms in diverse oligomeric states. *Plant Commun.* **5**: 101041.



# 脱窒細菌の Bet-Hedging 戦略は N<sub>2</sub>O 排出削減に寄与するか？： 進化生物学と環境工学の融合

寺田 昭彦

東京農工大学大学院工学研究院  
〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

## Does the bet-hedging strategy of denitrifying bacteria help mitigate N<sub>2</sub>O emissions? A crossroads of evolutionary biology and environmental engineering

Akihiko Terada

Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture & Technology  
2-24-16 Naka, Koganei, Tokyo 184-8588

Bet-hedging in denitrification is a survival strategy that allows denitrifying bacteria to rapidly switch electron acceptors during transient anoxia. This study investigated whether the bet-hedging strategy contributes to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) consumption in *Azospira* sp. strain I13, a model denitrifying bacterium with strong N<sub>2</sub>O-reducing capacity. To evaluate this under stable conditions, this study developed a chemostat cultivating system and determined the strain's growth parameters, including the maximum specific growth rate and half-saturation constant for organic carbon. Under optimized chemostat operation, the strain exhibited transcription of the N<sub>2</sub>O reductase gene (*nosZ*) even when oxygen was the sole electron acceptor, whereas transcription of the nitrite reductase gene (*nirS*) remained low. This indicates that the strain maintains *nosZ* expression as a preparatory mechanism for a rapid switch to anoxic respiration. Furthermore, the microrespirometric assay showed that N<sub>2</sub>O consumption activity quickly recovered after oxygen exposure. Collectively, these results demonstrate that *Azospira* sp. strain I13 employs a bet-hedging strategy that facilitates rapid adaptation from aerobic to anaerobic conditions, with potential implications for mitigating N<sub>2</sub>O emissions. Future work should clarify the mechanistic link between N<sub>2</sub>O consumption recovery and bet-hedging.

Key words: *Azospira* sp., bet-hedging, denitrification, nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), *nosZ*

### 緒 言

脱窒細菌は、自然界や排水処理施設などの工学システムにおいて、無酸素条件下で窒素酸化物を不活性な窒素ガスに変換する脱窒反応を担う。脱窒は、酸化数 +5 の硝酸イオンから、亜硝酸イオン、一酸化窒素、亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) を経て窒素ガスに至る段階的な還元反応として進行し、それぞれの反応は異なる酵素によって触媒される。この一連の反応は、微生物による窒素循環において、反応性窒素である窒素酸化物を不活性な窒素ガスに変換する極めて重要な生物学的プロセスである。一

方、中間生成物である N<sub>2</sub>O は、CO<sub>2</sub> の 273 倍の地球温暖化係数を有する温室効果ガスであると同時に (IPCC, 2022)、フロンに代わる 21 世紀最悪のオゾン層破壊物質としても知られている (Ravishankara *et al.*, 2009)。従って、少なくとも排水処理などの人為的な脱窒プロセスにおいては、脱窒菌が極力 N<sub>2</sub>O を排出しないような状況を実現する必要がある。

微生物学的な観点で言うと、脱窒反応は脱窒細菌が呼吸を通してエネルギーを獲得するための手段である。ほとんどの脱窒細菌は通性嫌気性であり、好気条件では、より多くのエネルギーが得られるように酸素を電子受容体として優先的に利用する。一方、好気条件から無酸素条件に遷移する際、電子受容体を窒素酸化物に切り替えることにより、酸化還元電位が大きく変動しても円滑にエネルギーを獲得できる。しかし、酸化還元電位の変動

---

E-mail: akte@cc.tuat.ac.jp

共同研究者：黒岩 恵 (東京農工大学大学院工学研究院)

岡崎 伸 (東京農工大学大学院農学研究院)。

に対して柔軟に対応するためには、脱窒細菌は好気条件においても将来的に必要な遺伝子を発現させておく必要がある。言い換えれば、好気条件においてもコストを負担しながら、来るべき無酸素環境に対しての準備をしていることになる。

このように、環境変化に備えて必要な遺伝子を発現させておく戦略を細菌の両駆け (Bet-hedging) 機構と呼び、脱窒細菌である *Paracoccus denitrificans* においてその存在が初めて報告されている (Lycus *et al.*, 2018)。 *P. denitrificans* は、好気条件においても本来は無酸素条件で機能を発現する  $N_2O$  還元酵素をコードする *nosZ* を活発に発現させ、嫌気条件に移行した際に迅速に  $N_2O$  を利用できるように準備を整えている。このような Bet-hedging 機構が *P. denitrificans* のような限られた脱窒細菌のみが保有するものか、普遍的に脱窒細菌が保有するかは明らかになっていない。また既往の研究は、回分条件、すなわち、基質濃度や環境条件が変動する非定常条件で行われているため、Bet-hedging が  $N_2O$  生成・消費に及ぼす影響は体系的に評価されていない。さらに、脱窒細菌がもつこのような Bet-hedging 機構といった進化生物学的な生存戦略が、温室効果ガスである  $N_2O$  の削減に寄与できるかも定かでない。

そこで本研究は、精密な環境制御が可能なケモスタット型のバイオリアクターを用い、定常条件で脱窒細菌の窒素酸化物の呼吸に関与する遺伝子の発現パターンを解析し、Bet-hedging 戦略の特性を明らかにすることを目的とした。さらに、酸素暴露後に  $N_2O$  消費活性がどのように回復するかを検証し、Bet-hedging 戦略が  $N_2O$  の削減に寄与する可能性を考察した。

## 実験方法

### 培地と前培養

酢酸ナトリウムを有機炭素源とする RB1 培地 (1L あたり、 $CH_3COONa$  400mg,  $KH_2PO_4$  200mg,  $NaCl$  13.2mg,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  16.4 mg,  $KCl$  26.8 mg,  $NH_4Cl$  230 mg,  $NaHCO_3$  376mg, Trace element 1mL (組成は Miyahara *et al.*, 2010 を参照)) を *Azospira* sp. strain I13 株の培地として用いた。前培養は 200mL 容の三角フラスコに入れた 100mL の RB1 培地で行い、30℃ で 1 日間好気に 120rpm で振盪培養した。

### ケモスタット装置の概要と制御方法

Fig.1 に示す容積 2L の卓上型ジャーファーメンター (MAO-3 型, 株式会社 サンキ精機, 大阪) に 2L の RB1 培地を入れ、I13 株の前培養液 10mL を植菌して 30℃ で 90rpm で攪拌して培養し、ポンプ (07528-30 Masterflex,

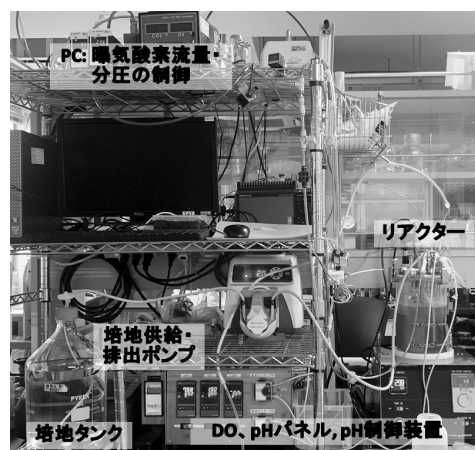


Figure 1 The overview of the chemostat system used in this study

Avantor, Radnor, PA) を用いて RB1 培地を供給した。反応容器には DO 電極 (Model. FOM-1400, 株式会社オートマチックシステムリサーチ, 東京) および pH 電極 (E-635-B225-DH, Broadley James, Bedford, UK) を装着してオンラインモニタリングを行った。DO 濃度は  $1.0L\ min^{-1}$  で通気をオンオフすることにより (YP-40VC, 安永エアポンプ株式会社, 東京) 所定の濃度に保った。また、ケモスタット運転時は常に 90rpm で攪拌を行った。pH は 1M HCl もしくは 1M NaOH を供給することによって 7.5 に維持した。

### 遺伝子発現解析の手法

#### DNA 抽出

I13 株のケモスタット培養液 10mL から DNA を抽出した。抽出には FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA) を用い、メーカーのプロトコルに従った。菌体破碎には FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals) を使用し、speed 6.0 で 40 秒間処理した。破碎には同キット付属の Lysing Matrix A tube を使用し、ガーネットマトリックス (直径 0.56-0.7mm) と、ジルコニウム球 (直径 6.35mm) により細胞を破碎した。DNA 濃度と純度は NanoDrop 2000c 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で測定し、-30℃ で保存した。

#### RNA 抽出

ケモスタットの反応容器内の細菌懸濁液を 40mL 採取し、遠心分離 ( $10000 \times g$ , 5 分) して上澄みを除いた後、RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) を入れて 4℃ で一晩冷蔵保存した。その後 RNeasy Lysis Buffer を捨て、FastRNA Pro Soil Direct Kit (MP Biomedicals, Irvine, CA) を用いた RNA 抽出

を行った。抽出には FastRNA Pro Soil Direct Kit (MP Biomedicals) を用い、メーカーのプロトコルに従った。菌体破碎には FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals) を使用し、speed 6.0 で 40 秒間処理した。破碎には同キット付属の Lysing Matrix B tube を使用し、直径 0.1mm のシリカビーズにより細胞を破碎した。得られた RNA の濃度と純度を測定し、-30℃で保存した。

#### 逆転写反応

抽出した RNA は、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて cDNA に逆転写した。反応はメーカーのプロトコルに従い、42℃で 30 分間実施し、その後 95℃で 3 分間の熱処理を行った。得られた cDNA は -30℃で保存した。

#### 定量 PCR (qPCR)

抽出した DNA と作製した cDNA に対し、定量 PCR (qPCR) により脱窒遺伝子の定量を行った。脱窒遺伝子は、亜硝酸イオンの還元酵素をコードする *nirS* (Throbäck *et al.*, 2004)、N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする Clade II *nosZ* (Chee-Sanford *et al.*, 2020) を対象とした。PCR の条件や利用したプライマーに関しては、既往研究 (Oba *et al.*, 2022) で記載された方法に準拠して実施した。qPCR の検量線には、各機能遺伝子を組み込んだプラスミド DNA をあらかじめ作製し、 $2.0 \times 10^8$  copies  $\mu\text{L}^{-1}$  を 8 連チューブに 10 倍ずつ滅菌水を用いて希釈し、qPCR を適用した。

Bet-Hedging 機構の発現の有無は、qPCR により測定した各機能遺伝子の相対転写レベルにより評価した。相対転写レベルは、各サンプリング時に抽出した RNA を逆転写させて qPCR で定量した転写産物量 (mRNA に対応する cDNA のコピー数) を、同じ試料から抽出したゲノム DNA を鋳型に qPCR を行い、対象遺伝子のコピー数 (細胞数の指標) で割った細胞当たりの相対転写活性 (mRNA コピー数/ゲノム DNA コピー数) として評価した。

#### 微小呼吸活性測定

好気条件から無酸素条件に推移した際の N<sub>2</sub>O 消費活性の回復は Suenaga ら (2018) の方法に準拠し微小呼吸活性装置 (Unisense, Aarhus, Denmark) により評価した。すなわち、クラーク型 DO 微小電極 (OX-MR, Unisense, Aarhus, Denmark) および N<sub>2</sub>O 微小電極 (N<sub>2</sub>O-MR, Unisense, Aarhus, Denmark) を容積 10mL の H 型をしたガラス容器 (MR-Ch, Unisense, Aarhus, Denmark) に装着し、 $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に制御された水浴に浸漬して、I13 株の活性に基づいた DO と N<sub>2</sub>O 濃度の変動を追跡した。実験は 0.05×PBS に懸濁した 10mL の I13 株を、あらかじめ曝気して DO 濃度を飽和付近まで上昇

させ、これをガラス容器に満たし、DO と N<sub>2</sub>O の微小電極を挿入した。ガラス容器底部にある攪拌子を 600rpm で攪拌して 5 分後、バブリングによって N<sub>2</sub>O ガスを飽和させた溶液 (N<sub>2</sub>O 濃度: 30mM) をシリンジで 20 $\mu\text{L}$  採り、H 型ガラス容器上部にあるシリンジポートより注入した。5 分後に 250mM の酢酸ナトリウム溶液 25 $\mu\text{L}$  をシリンジポートより同様に注入した (終濃度: 625 $\mu\text{M}$ )。その後、攪拌子の回転数を 300rpm まで減少させた。N<sub>2</sub>O が枯渇した後、飽和 N<sub>2</sub>O 溶液を再添加し、I13 株による N<sub>2</sub>O 消費を追跡する操作を数回繰り返した。

#### 各種測定方法

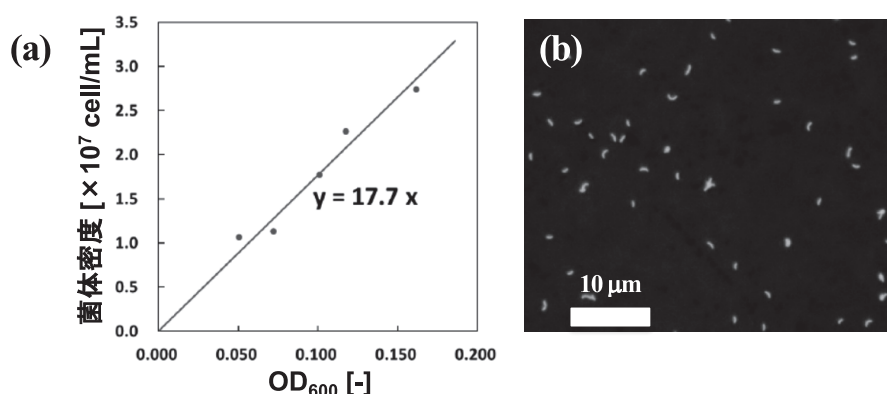
培養液の濁度は 600nm で測定した。溶存態の有機物濃度は、I13 株の培養液を遠心分離した上清を 0.2 $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し全有機体炭素計 (TOC-L, Shimadzu, Kyoto, Japan) の不揮発性有機体炭素モードで測定した。

培養液 1.5mL と 25% グルタルアルデヒド溶液 131 $\mu\text{L}$  を 2.0mL チューブ内で混合し、冷蔵庫で一晩固定化した。固定後、フィルターろ過した PBS (1L の滅菌水に対し、NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.63g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g) を 20 倍希釈した 0.05×PBS で菌体を洗浄し、1.5mL の 0.05×PBS に懸濁し、このうち 150 $\mu\text{L}$  と 0.05×PBS 1.35mL を混合した。この懸濁液 1.35mL に 98% エタノール 150 $\mu\text{L}$  を混合し、氷冷した状態で 10W で 10 秒間超音波処理 (VP-050, Taitec, Tokyo, Japan) により菌体を分散させた。0.2 $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Isopore, Merck Millipore, Germany) で懸濁液 0.5mL を透して I13 株の細胞をフィルター上で捕捉し、フィルターろ過したトリス-酢酸-EDTA 緩衝液 (TAE) (1L あたり、トリス塩基 4.84g, 氷酢酸 1.14mL, 0.5M EDTA 2mL) で 3 回ろ過した。細胞を捕捉させたフィルターを乾燥させ、スライドガラスに移して DNA 染色剤 (SYTO9, ThermoFisher, Waltham, MA) により細胞を染色し、フィルター上の細菌細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-X, Keyence, Tokyo, Japan) で観察して細胞数を計数した。

#### 結果および考察

##### Azospira sp. strain I13 の濁度と細胞濃度の関係

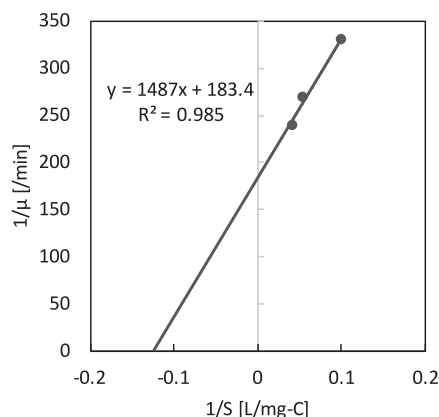
I13 株の細菌懸濁液の OD<sub>600</sub> と細胞数計数の相関、およびフィルター上に捕捉された細胞の顕微鏡像を Fig.2 に示す。I13 株の細胞は桿菌の形態を呈し、細菌数と OD<sub>600</sub> には高い相関性があった ( $R^2=0.995$ , Fig.2a)。また、OD<sub>600</sub> が高くなると細胞の凝集が見られる場合があるが、本試験で用いた細胞濃度の範囲であれば、I13 株の細胞は凝集することなく分散して存在することが確認できた (Fig.2b)。



**Figure 2** The relationship between *Azospira* sp. strain I13 cell density and optical density at 600nm ( $OD_{600}$ ) (a) and the micrograph of suspended strain I13 cells (b).

#### *Azospira* sp. strain I13 の増殖パラメータの算出

ケモスタット装置に I13 株を植菌して回分運転を行い、TOC 濃度と  $OD_{600}$  を時系列で測定した。Fig.2a に示す  $OD_{600}$  と細菌数の相関と、有機物を制限基質とした Monod 式に基づき、サンプリング間の比増殖速度の逆数と有機物濃度の逆数をプロットして増殖パラメータを求めた (Fig.3)。その結果、 $\mu_{max}$  は  $0.33h^{-1}$  ( $=7.9d^{-1}$ )、 $K_S=8.1mg\text{-Carbon L}^{-1}$  を得た。I13 株の増殖特性の解析は既往研究でも報告されており、無酸素 ( $N_2O$ ) 条件で酢酸ナトリウムを基質とした場合には  $\mu_{max}=0.16h^{-1}$  ( $=3.8d^{-1}$ )、酵母エキスを含む混合基質では  $\mu_{max}=0.26h^{-1}$  ( $=6.2d^{-1}$ ) と報告されている (Suenaga *et al.*, 2019)。



**Figure 3** Parameter estimation of the biokinetic parameters of *Azospira* sp. strain I13 by the Lineweaver-Burk plot

本研究で得られた好気条件下の  $\mu_{max}$  はこれらの値と整合し、妥当な範囲にあった。また、 $\mu_{max}$  は、高い  $N_2O$  還元能を有する *Pseudomonas stutzeri* strain DCP-1 と同等であり ( $0.33h^{-1}$ )、*Alicyclophilus denitrificans* I51 ( $0.091\text{--}0.18h^{-1}$ ) や *Dechloromonas aromatica* strain RCB ( $0.18h^{-1}$ ) より高い値となった (Suenaga *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2016)。

既報では有機物として酵母エキスなどを用いていたが、成分が不明確なので、本研究では排水処理系に豊富に存在する酢酸塩を炭素源として検討した。純粋培養系の脱窒細菌における有機物に関する半飽和定数の報告は少なく、有機物および  $N_2O$  を制限基質として Monod 式に組み込んだ微生物反応モデルで用いられている値は  $0.75mg\text{-Carbon L}^{-1}$  である (Schulthess & Gujer, 1996)。I13 株の  $\mu_{max}$  は高い増殖速度を有する *P. stutzeri* strain DCP-1 と同等であり、 $K_S$  は既報のそれに比べて 10 倍高い値であり、この細菌は酢酸塩濃度が高い環境で優先して増殖する可能性を示唆するものである。このような酢酸塩が高濃度の生態ニッチとしては、排水処理施設の曝気槽や、嫌気性消化の脱離液処理槽などが想定される。今回算出された増殖パラメータに限らず、排水処理施設の  $N_2O$  排出の正確な予測には、微生物の増殖パラメータの取得が必要とされており (例えば, Seshan *et al.* 2024)、本研究の成果は排水処理施設における  $N_2O$  排出の予測に資する基礎データとなる。

#### 増殖パラメータに基づく運転条件設定

本実験で得られた増殖パラメータを用い、Monod 式に基づくケモスタットの理論から、次式により  $N_2O$  還元活性が最大となる希釈率  $D_{max}$  を算出した。

$$D_{\max} = \mu_{\max} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_0}} \right)$$

ただし  $S_0$  はケモスタットに流入する有機物濃度 [mg-Carbon L<sup>-1</sup>] である。以上より、 $D_{\max} = 0.24 \text{ h}^{-1}$  を得た。ケモスタットにおいて  $D_{\max}$  での運転は、ウォッシュアウトのリスクから推奨されないが、本研究では実験期間が短く、N<sub>2</sub>O 還元活性が高い条件での Bet-hedging 戦略の有無を検証するため、この希釈率で運転した。

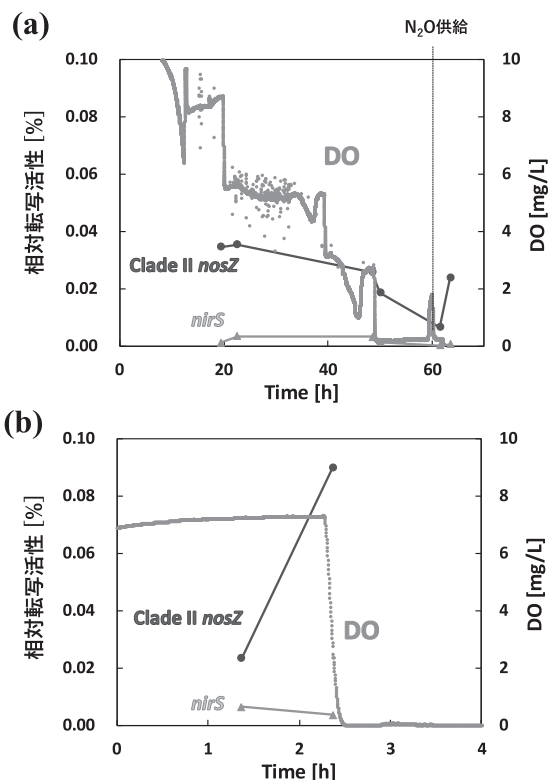
段階的な無酸素条件への推移に対する *Azospira* sp. strain I13 の遺伝子発現動態解析

I13 株の Bet-hedging に関して、①酸素枯渇に備え脱窒遺伝子を発現させる、②その発現は、酸素濃度の減少の度合いに依存しない、という2つ仮説を立てた。これを検証するため、基質や酸素濃度を精密に制御できるケモスタット装置を用い、RB1 培地による連続培養を行った。②の検証では、好気から無酸素条件への移行に関して2つのシナリオを設定した。シナリオ1では酸素分圧を21%、15%、10%、5%、0%と段階的に減少させ、シナリオ2では酸素分圧を21%から0%一気に切り替えた。なお、シナリオ1では、酸素が枯渇した直後に電子受容体として N<sub>2</sub>O と N<sub>2</sub> の混合ガス (0.02%/99.8%) を実験終了まで (6時間) 1.0L min<sup>-1</sup> で連続通気した。

シナリオ1において、N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする Clade II *nosZ* は、*nirS* よりも高い相対転写活性を示した (Fig.4a, 4b)。*nirS* の発現量は段階的に酸素分圧を低下させても大きな変化はなかったが、Clade II *nosZ* の発現量は酸素分圧の低下に伴い徐々に減少し、酸素が枯渇すると最小値となった。その後、N<sub>2</sub>O を添加すると Clade II *nosZ* の発現が速やかに回復し、N<sub>2</sub>O が Clade II *nosZ* の発現を誘導することが確認された。

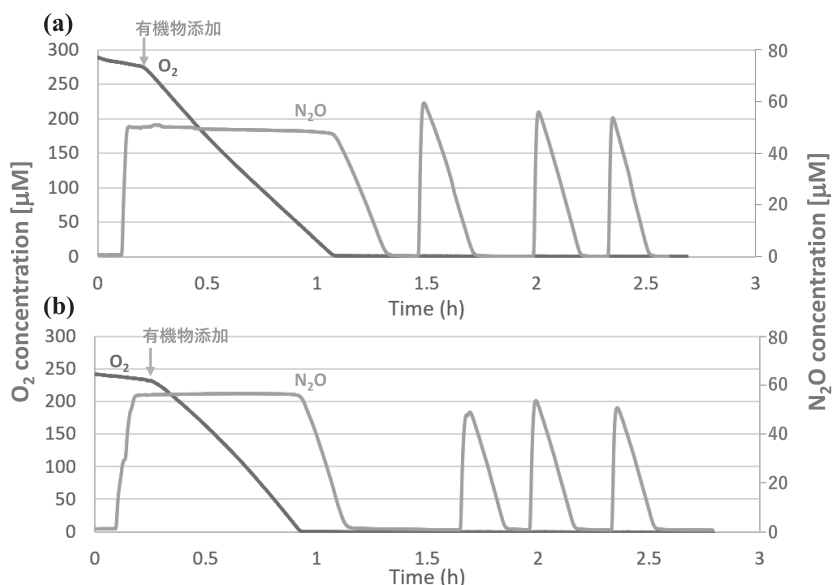
シナリオ2では、DO 濃度が高い段階から Clade II *nosZ* の発現が観察され、酸素分圧を急激に0%に切り替えると、N<sub>2</sub>O を添加しなくても Clade II *nosZ* の発現が急増した。一方、*nirS* の発現は、シナリオ1と同様に大きな変動を示さなかった。

本研究では、特に I13 株の優れた N<sub>2</sub>O 消費能力に着目し、I13 株のリスクヘッジ機構である Bet-hedging の有無やその特性に迫るため、2つの仮説の検証を実施した。①の「Bet-hedging を行って酸素枯渇に備え脱窒遺伝子の発現を行う」という仮説の検証では、窒素酸化物が存在せず、酸素のみが電子受容体として存在する条件でも、I13 株は脱窒遺伝子を発現していた (Fig.4a, 4b)。特に Clade II *nosZ* の発現が顕著であったことから仮説①は支持された。一方、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>還元酵素をコードする *nirS*



**Figure 4** The effect of oxygen concentration in the chemostat system on the denitrifying gene expressions of *Azospira* sp. strain I13: (a) Scenario 1 (Oxygen partial pressure 21% → 15% → 10% → 5% → 0%) and (b) Scenario 2 (Oxygen partial pressure 21% → 0%). The experiment was conducted twice, and representative data is shown.

の発現は微弱で定量結果にはほとんど反映されなかった。これにより I13 株の Bet-hedging は主として N<sub>2</sub>O 還元酵素において優先して起きることが示唆された。仮説②の検証の結果、すべての DO レベルで N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする Clade II *nosZ* の発現が確認され、この仮説は支持された (Fig.4a, 4b)。さらに、酸素濃度を急激に0%に下げた際には Clade II *nosZ* の発現が顕著に増加し、酸化還元電位が急変する条件下で Bet hedging が強まる可能性が示唆された (Fig.4b)。このような結果は、好気条件と嫌気条件が繰り返される排水処理施設においても I13 株が N<sub>2</sub>O 還元を行い、N<sub>2</sub>O の排出削減に寄与し得ることを示唆する。本研究では Clade II *nosZ* の発現を蛍光検出するための遺伝子組換え株を用い、細胞集団内の Bet-hedging ポピュレーションの可視化・定量も検討したが、本報告書にまとめるには至らなかった。現時点では細胞集団全体を平均的に扱って遺伝子発現を評価しているが、今後は表現型の不均一性を解析し、細胞集



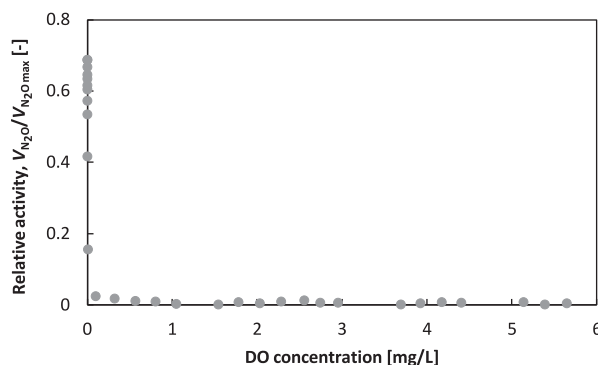
**Figure 5** Oxygen and N<sub>2</sub>O concentration dynamics using a batch incubation in a microrespiration system: (a) *Azospira* sp. strain I13 and (b) *Azospira* sp. strain I09.

団の中での Bet-hedging 戦略を明らかにすることが課題である。

無酸素条件への推移に対する *Azospira* sp. strain I13 の N<sub>2</sub>O 消費活性の回復挙動解析

無酸素条件への推移に伴う N<sub>2</sub>O 消費活性の回復を、微小呼吸活性装置を用いた回分試験で評価した。(方法は Zhou *et al.*, 2021 に準拠)。前培養した I13 株 (OD<sub>600</sub>=0.1) を、酢酸ナトリウムが含まれていない RB1 培地で満たした容積 10mL の H 型のチャンバーに接種し、DO 濃度が飽和に近い条件から試験を開始した。その後、50mL バイアルに蒸留水 25mL を封入し、純 N<sub>2</sub>O ガスを室温で 10 分間バブリングさせて N<sub>2</sub>O 溶解させ、N<sub>2</sub>O 溶解水を作製した (濃度 24mM at 25°C)。N<sub>2</sub>O 溶解水を 20μL 注入後、250mM の酢酸ナトリウムを 25μL 注入し、DO および溶存 N<sub>2</sub>O 濃度を追跡した。比較対象として *Azospira* sp. strain I09 についても同様に評価した。

Fig.5 に示すように、I13 株は有機物添加後に N<sub>2</sub>O 濃度が速やかに減少した (Fig.5a)。一方、I09 株では、DO が残存している間は N<sub>2</sub>O 濃度の減少は見られなかった (Fig.5b)。DO 枯渇後に N<sub>2</sub>O を添加する操作を 3 回繰り返し、N<sub>2</sub>O 濃度の減少を線形近似して最大 N<sub>2</sub>O 消費速度を計算したところ、I13 株では  $1.25 \pm 0.25 \text{ pmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$ 、I09 株では  $1.59 \pm 0.38 \text{ pmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$  であり、有意差は認められなかった。この結果から、両株は同等の最大活性を有するが、I13 株は酸素の存在下でも N<sub>2</sub>O 消費を維



**Figure 6** The effect of dissolved oxygen (DO) concentrations on the relative activity of N<sub>2</sub>O consumption of *Azospira* sp. strain I13

持できることがわかった。さらに、I13 株の N<sub>2</sub>O 消費は、DO 濃度 1mg L<sup>-1</sup> 付近でも維持されることが明らかになった (Fig.6)。これらの結果は、I13 株が好気条件においても clade II *nosZ* を発現し、嫌気条件下で迅速に N<sub>2</sub>O 呼吸を再開するために Bet-hedging を行っていることを示唆する。すなわち、本研究の学術的問いである「N<sub>2</sub>O 還元に関する Bet-hedging 機構」は、酸化還元条件が大きく変動する排水処理施設のような環境で、N<sub>2</sub>O 排出の削減に寄与する可能性を示した。今後は、酸素耐性や N<sub>2</sub>O 消費回復特性と Bet-hedging 機構の関連性を、ケモスタット系で体系的に検証することが課題である。

## 要 約

本研究では、排水処理装置から単離した高い N<sub>2</sub>O 還元活性を有する脱窒細菌 *Azospira* sp. strain I13 を対象に、N<sub>2</sub>O 還元における Bet-hedging 戦略の有無を調査した。安定した条件で検討するためにケモスタット連続培養系を用い、I13 株の最大比増殖速度と有機物に対する半飽和定数を算出して運転条件を設定した。連続培養での検討の結果、酸素のみが電子受容体となる条件においても、N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする機能遺伝子 Clade II *nosZ* の転写が認められ、そのレベルは亜硝酸還元酵素をコードする *nirS* よりも高かった。さらに、微小呼吸活性測定装置を用いた解析により、酸素暴露後も無酸素条件下で迅速に N<sub>2</sub>O 消費活性が回復することが確認された。これらの結果から、I13 株は好気条件においても *nosZ* を発現することで、嫌気条件への移行後も速やかに N<sub>2</sub>O 還元を開始できる性質を備えており、N<sub>2</sub>O 排出削減に貢献できる可能性があることが示された。なお、N<sub>2</sub>O 消費活性の回復機構と Bet-hedging 機構との関連の解明は今後の課題である。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 城戸未沙希, 大場康平, 黒岩恵, 寺田昭彦. 2025. N<sub>2</sub>O還元細菌 *Azospira* sp. I13株のBet-hedging機構の追跡. 第59回日本水環境学会年会 (2025年3月17-19日, 札幌)
- 2) Terada, A. 2024. Revealing ecophysiology of N<sub>2</sub>O-reducing bacteria in anammox biofilms. The IWA Biofilms 2024 Conference (October 23-26 2025, Shanghai, China)

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた東京農工大学大学院工学府の大場康平さん、同大学工学部の城戸未沙希さん、村上亜廉さんをはじめとする学生諸氏に感謝の意を表します。

## 文 献

Chee-Sanford, J.C., Connor, L., Krichels, A., Yang, W.H. & Sanford, R.A. 2020. Hierarchical detection of diverse Clade II (atypical) *nosZ* genes using new primer sets for classical- and

multiplex PCR array applications. *J. Microbiol. Methods* **172**: 105908.

IPCC 2022 Climate Change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [H.-O. Pörtner, D.C.R., M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegria, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem & B. Rama (eds.)] (ed), p. 3056, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

Lycus, P., Soriano-Laguna, M.J., Kjos, M., Richardson, D.J., Gates, A.J., Milligan, D.A., Frostegård, Å., Bergaust, L. & Bakken, L.R. 2018. A bet-hedging strategy for denitrifying bacteria curtails their release of N<sub>2</sub>O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**: 11820-11825.

Miyahara, M., Kim, S.W., Fushinobu, S., Takaki, K., Yamada, T., Watanabe, A., Miyauchi, K., Endo, G., Wakagi, T. & Shoun, H. 2010. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4619-4625.

Oba, K., Suenaga, T., Kuroiwa, M., Riya, S. & Terada, A. 2022. Exploring the functions of efficient canonical denitrifying bacteria as N<sub>2</sub>O sinks: Implications from <sup>15</sup>N tracer and transcriptome analyses. *Environ. Sci. Technol.* **56**: 11694-11706.

Ravishankara, A.R., Daniel, J.S. & Portmann, R.W. 2009. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* **326**: 123-125.

Suenaga, T., Riya, S., Hosomi, M. & Terada, A. 2018. Biokinetic characterization and activities of N<sub>2</sub>O-reducing bacteria in response to various oxygen levels. *Front. Microbiol.* **9**: Article 697.

Suenaga, T., Hori, T., Riya, S., Hosomi, M., Smets, B.F. & Terada, A. 2019. Enrichment, isolation, and characterization of high-affinity N<sub>2</sub>O-reducing bacteria in a gas-permeable membrane reactor. *Environ. Sci. Technol.* **53**: 12101-12112.

Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, Å. & Hallin, S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 401-417.

Schulthess, R.V. & Gujer, W. 1996. Release of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from denitrifying activated sludge: Verification and application of a mathematical model. *Water Res.* **30**: 521-530.

Seshan, S., Poinapen, J., Zandvoort, M.H., van Lier, J.B. & Kapelan, Z. 2024. Limitations of a biokinetic model to predict the seasonal variations of nitrous oxide emissions from a full-scale wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* **917**: 170370.

Yoon, S., Nissen, S., Park, D., Sanford, R.A. & Löffler, F.E. 2016. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I *nosZ* from those harboring clade II *nosZ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 3793-3800.

Zhou, Y., Suenaga, T., Qi, C., Riya, S., Hosomi, M. & Terada, A. 2021. Temperature and oxygen level determine N<sub>2</sub>O respiration activities of heterotrophic N<sub>2</sub>O-reducing bacteria: Biokinetic study. *Biotechnol. Bioeng.* **118**: 1330-1341.

## 2019年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：2019年10月～2025年3月



# 多様な糸状菌類の固体基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

京都大学農学研究科糸状菌・環境インターフェイス工学講座

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

## Establishment of environmental interface technologies in filamentous fungi based on elucidation of solid substrate recognition and colonization mechanisms across diverse filamentous fungi

Moriyuki Kawauchi

Laboratory of Environmental Interface Technology of Filamentous Fungi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Kitashirakawaoiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Filamentous fungi play a central role in biogeochemical cycles as decomposers. Unlike yeasts and bacteria, they can colonize and decompose solid substrates. The colonization begins with contact between the fungal hyphae and the substrate. At the hyphal tips, where the cell surface interfaces with the substrate, the fungus recognizes nutrients and environmental information and responds accordingly. This mode of survival is extremely diverse. Filamentous fungi encompass a diverse range of organisms, including saprophytic species, and ecologically specialized groups. These include plant pathogenic fungi with a strong affinity for living hosts; industrial filamentous fungi, with high substrate degradation and material production capabilities; and wood-decaying fungi, which have evolved lignin degradation capabilities. Traditionally, these phenomena have been studied in isolation across academic disciplines, each with distinct objectives and employing specific fungal species and methods. However, no comprehensive study has examined filamentous fungi as a unified research subject, nor has previous research elucidated the basic molecular principles of the processes occurring at substrate interfaces. Furthermore, little is understood about how the ability to recognize environments and solid substrates evolved through adaptation, or how evolutionary history related cell-surface interactions. In this research project, we investigated the mechanisms of environmental and substrate recognition, colonization, and decomposition in filamentous fungi, using ecologically and phylogenetically comparable characteristic fungal species. Particular emphasis was placed on analyzing their cell surface structures. Based on these insights, we developed preliminary technologies that enhance fungal enzyme productivity and modify the physical properties of filamentous fungal-derived materials by genetically engineering cell surface structures.

### 第一章 はじめに

糸状菌は、地球上に220万種以上存在すると考えられており、最も「成功」した分類群と言われている

---

E-mail: Kawauchi.moriyuki.8c@kyoto-u.ac.jp

教員：吉見 啓（京都大学農学研究科）。

寺内 裕貴（現、山口大学中高温微生物研究センター）。

辻 健也（京都大学農学研究科）。

（Harksworth & Lücking, 2017）。分解者として地球規模の物質循環に中心的な役割を果たしているが、酵母や細菌類とは異なり、固体を基質として侵入分解することができるという特徴を持つ。この固体を攻略する適応進化こそが、まさに糸状菌「成功」の鍵であったと考えられる。糸状菌の固体攻略はまず、菌と固体基質との接触から始まる。さらに、固体基質へ侵襲する際、菌糸先端の細胞表層接触面において栄養基質の存在や外界環境情報を認識し、その環境に応じた反応（基質分解酵素生産・

分泌、二次代謝産物生産・分泌、侵入器官形成、分解物の取込および代謝)を行なっている。この糸状菌・環境インターフェイスで展開される事象は、糸状菌たる生き様を特徴づけるものと考えられる。従来、これらの事象は、研究目的が異なる学問領域の研究者により、特定の菌種を用いて探求されてきた。一方、糸状菌には基本的な腐生能を有するだけでなく、病原菌(宿主への親和性)、産業用糸状菌(高い基質分解能と物質分泌能)、木材分解菌(リグニン分解能の獲得)、共生菌(動植物の内生菌や菌根菌)等、生態的に特殊化した多様な菌群が存在する。そのため、これらの多様な糸状菌を包括的に取り扱う前例のない研究を展開することで、それらの糸状菌の中で、環境・固体基質の認識能が適応進化によりどのように多様化し、新しい外界との連絡や物質交換に寄与し得たのか、それらの特徴を抽出することで、糸状菌・環境インターフェイスの多様性と進化生態を総合的に理解することが可能になるのではないかと考えられた。

そこで本寄附講座では、生存様式・分類の異なる糸状菌を複数用いて、糸状菌・環境インターフェイスで起こる事象の共通性と多様性を明らかにすることとした。特に、糸状菌が固体への接着・侵襲の際に最も最初に固体と接触する、細胞表層構造に着目し、その構造の共通性と進化及び役割の変化を解析し、それらがどのように個々の糸状菌の持つ特徴に寄与し得たかを詳らかにすることを旨とした。さらに得られた知見を活かした細胞表層工学を展開し、木材分解酵素の効率的生産に向けた新たな培養法の考案及び菌糸を素材としたサステイナブルなマテリアルの物性改変に挑戦し、将来の地球の環境負荷低減につながるような応用面にも研究挑戦した。

## 第二章 研究成果の概要

### 1. 糸状菌の菌糸撥水性発現及びハイドロフォビンの生理機能の多様化

糸状菌類の菌糸表面の濡れ性/表面疎水性は固体基質表面への接着性や定着性に強く関与すると考えられる。糸状菌類の濡れ性/表面疎水性に関与する主要な因子として、両親媒性の分泌タンパク質であるハイドロフォビンが知られている。ハイドロフォビンは、多様な菌種間においてアミノ酸配列の相同性は低いものの、4つのジスルフィド結合を形成する8つのシステイン残基は高度に保存されており、類似した疎水性パターンを示す。その疎水性パターンと凝集体の溶媒への溶解性にに基づき、クラスIとクラスIIに分類される(Sehuren & Wessels, 1990; Wösten, 2001)。クラスIハイドロフォビンはトリフルオロ酢酸には可溶であるが、高温のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)には不溶である。一方で、クラスIIハイドロフォビンはSDSにも可溶である(Wessels *et al.*, 1991)。さらにハイドロフォビンは、糸状菌の表面疎水性に貢献するだけでなく、菌中菌糸の形成、ストレス耐性および病原性に関与することも知られている(Wösten, 2001)。

これまでの解析で、47種の子囊菌のゲノムデータに基づく解析から、子囊菌の推定ハイドロフォビン遺伝子の平均数は5.30であり、最大で13個であると報告されている(Li *et al.*, 2021)。その一方で、2021年時点でゲノム解読されたすべての真正担子菌の中で、予測されるハイドロフォビンの平均遺伝子数は10を超えている(Xu *et al.*, 2021)。また、クラスIのハイドロフォビンは

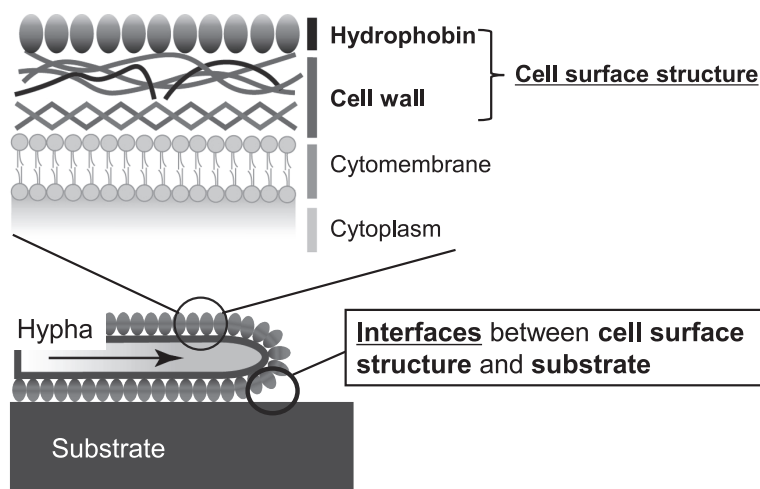


Fig. 1 Interface between cell surface structure and substrate.

子嚢菌と担子菌の両方で同定されているが、クラスIIのハイドロフォビンは子嚢菌でのみ見つかっている(Wösten, 2001)。このように、糸状菌においては子嚢菌と担子菌において、ゲノム中に推定されているハイドロフォビンの性質並びに推定遺伝子数において大きな差があることが分かってきており、子嚢菌と担子菌の間でハイドロフォビンの機能に何らかの差があるものと予測された。加えて、ハイドロフォビンの機能は、単一の種内で重複していると考えられていたが、特に上述のようにゲノム中におけるハイドロフォビンの推定遺伝子数が多いと推測されている担子菌においては、種内におけるハイドロフォビンの機能分担が起こっている可能性がある。そこで本研究では、ハイドロフォビンの単一の種内で機能の分化はあるのか、担子菌と子嚢菌で何らかの機能的な差が存在するのかを明らかにするため、産業菌 *Aspergillus oryzae*、植物病原菌 *Bipolaris maydis*、白色腐朽菌 *Pleurotus ostreatus* の3種の生存様式・分類の異なる糸状菌を用いて解析を実施した。

*A. oryzae* では、これまでの研究でハイドロフォビン RolA が、クチナーゼ CutL1 (植物表層にも存在するクチンの分解酵素) と相互作用し、CutL1の基質分解作用を促進することが知られている (Takahashi *et al.*, 2005)。一方、RolA 以外のハイドロフォビンに関し、その正確な数及びその機能についての知見は限られている。そこで、*A. oryzae* のハイドロフォビンを探索し、それらの機能を解析した。まず、ゲノムデータベースより RolA 以外に HypB, HypC, HypD の3つハイドロフォビンを見出した。これらのハイドロフォビンをコードする遺伝子の転写状況を解析したところ、RolA, HypB は液体または固体培養において発現していたが、HypC, HypD はどの培養条件においても発現が認められなかった。そこで、*rolA* または *hypB* 遺伝子に焦点を絞り、それらの遺伝子破壊株を造成して表現型を解析した。その結果、*rolA* 遺伝子破壊株において、分生子数の減少並びに分生子表面の RolA 自己組織化構造の消失が認められた。MATH アッセイを用いた疎水度の定量解析から、RolA の喪失により分生子の疎水度が減少することが明らかになった。また、*hypB* 遺伝子破壊株においては、菌糸表面の突起状構造が消失し、菌糸表面が比較的平滑に変化するという菌糸表面の構造変化が確認された。これらの結果から、麹菌における各ハイドロフォビンは、細胞器官ごとに機能分化していることが示唆された。

続いて、*B. maydis* におけるハイドロフォビン遺伝子の機能解析を行った。まず *B. maydis* のゲノムには4つのハイドロフォビン遺伝子が存在し、それぞれは Class I に属する Hyp1, および Class II に属する Hyp2, Hyp3, Hyp4 であり、これらすべてが発現していること

が明らかになった。各遺伝子の単独破壊株に加えて、三重および四重破壊株も作出した。その結果、菌糸の成長、分生子形成、ストレス耐性、病原性、有性生殖のいずれにおいても、野生株との間に明確な差異は認められなかった。さらに、すべての破壊株におけるコロニーの疎水性も野生株と同様であった。一方、*Aspergillus nidulans* の  $\Delta dewA$  破壊株ではコロニーの疎水性が著しく低下したが、この株に *HYP1* 遺伝子を導入すると、コントロール株と同程度までその疎水性は回復した。これらの結果から、*B. maydis* のハイドロフォビンは本菌における生物学的プロセスには大きく関与していないものの、少なくとも Hyp1 はその機能を保持していることが明らかになった。この結果は、ハイドロフォビンの機能が菌種に依存して異なることを改めて示している。また、本菌の変異集団をスクリーニングした結果、顕著な親水性コロニーを示す変異株が見出された。ゲノム比較の解析から、この表現型の原因遺伝子が *NPS4* であることを見出した。この結果は、本菌の疎水性は機能的なハイドロフォビンを有しているのにもかかわらず、*Nps4* によって産生される物質に依存していることを示している。

続いて、*P. ostreatus* におけるハイドロフォビンの機能解析を実施した。*P. ostreatus* では、以前の研究で20以上のハイドロフォビン遺伝子を持つことが推定されていた (Xu *et al.*, 2021)。さらに、木材分解条件や実験室生育条件では *vmh2*, *vmh3* 及び *hydp16* の3つのハイドロフォビン遺伝子が独占的に発現していることが明らかとなっていた (Alfaro *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021)。そこで、これら3つのハイドロフォビンの菌糸成長、細胞表層構造形成、木材分解などにおける生理的機能に着目し研究を進めた。まず、寒天培養を行った結果、 $\Delta vmh2$  及び  $\Delta vmh3$  株では目に見えるような変化は見られなかった一方で、 $\Delta hydp16$  株では気中菌糸形成能の低下が見られた。次に、それぞれの遺伝子破壊株の表面疎水性について、寒天培養後の菌体に0.2% SDSを滴下し評価した結果、 $\Delta vmh2$  及び  $\Delta vmh3$  株では水滴の消失が見られた。一方で  $\Delta hydp16$  株では、水滴の消失および接触角の変化が見られなかったことから、特に *Vmh2* と *Vmh3* が菌糸の疎水性維持に必須であることが明らかとなった。次に、透過型電子顕微鏡を用いて細胞表層構造の詳細な観察を実施した。野生株では、細胞壁の上に黒いタンパク質の凝集層と考えられる層が存在している。 $\Delta vmh2$  及び  $\Delta vmh3$  株ではこの黒い層の消失が見られた。 $\Delta hydp16$  株ではこの黒い層は維持されている一方で、細胞壁の厚さは野生株と比較して40%薄くなった。しかしながら、細胞壁成分であるキチンや $\beta$ -グルカンの相対含有量、細胞壁合成関連遺伝子の発現レベルには有意な差は認められなかった。これらの結果か

ら、Vmh2及びVmh3は細胞壁表層で機能し表面疎水性の維持に寄与することが明らかとなった (Han *et al.*, 2023a)。またHydph16は、細胞壁構造を形成するタンパク質として細胞壁多糖と同様に重要な役割を担っていることが明らかとなった。これまで糸状菌全般で栄養菌糸の細胞壁形成にハイドロフォビンが寄与することは報告がなく、糸状菌において初の発見である (Han *et al.*, 2024)。続いてブナ木粉培地を用いた木材分解実験を実施した結果、 $\Delta vmh3$  および  $\Delta hydph16$  株では、リグニン分解の進行に遅延が見られた。また両株では、菌体外に分泌されるリグニン分解酵素類の活性には差が見られなかった。 $\Delta hydph16$  株ではブナ木粉培地上での菌糸成長の低下が見られ、これがリグニン分解遅延することの原因と考えられた。一方、*vmh3* 破壊株ではそのような成長障害は認められず、Vmh3の欠損によってリグニン分解に遅延が生じたことが明らかとなった (Han *et al.*, 2023b)。この結果は、ハイドロフォビンが白色腐朽菌による木材分解に関与する可能性を世界で初めて示したものである。また興味深いことに $\Delta hydph16$  株は、寒天培養や液体培養では特に生育不良が見られておらず木粉培養時のみ生育不良が見られている。以上のことから、Vmh3とHydph16はそれぞれ正常な木材分解に必須であるものの、木材分解における機能に差があることが示唆された。

本研究の成果をFig.2にまとめる。本解析により糸状菌においてハイドロフォビンと考えられる遺伝子は保存されているものの、それぞれの存在容態や役割は進化的

背景に応じて多様に変化することで、生態学的なニーズに合わせた進化を果たしていることが明らかとなった。特に白色腐朽菌では、その最大の特徴である木材分解能の獲得にハイドロフォビンが関与している可能性が示唆された。また植物病原菌における研究から、ハイドロフォビン以外の因子が、菌糸の表面疎水性発現の主たる要因になり得ることが示された。

## 2. 糸状菌の基質及び環境認識に関わる因子の探索とその機能解析

糸状菌が基質表面を含めた外部環境を認識し、適切に応答行動を開始、基質侵入、分解行動を持続するには細胞内シグナル伝達経路が重要な役割を担う。その代表的なものとしてMAPK経路や二成分制御系が挙げられる。本項目では、モデル子囊菌*A. nidulans*及び植物病原菌*B. maydis*に関して、それぞれの外部環境認識に関わるシグナル伝達経路の解析を実施した。

まず、モデル子囊菌*A. nidulans*を用いて、二成分性情報伝達系の構成因子の一つであり、ヒスチジンキナーゼからレスポンスレギュレーター (RR) へのリン酸基受渡し仲介因子であるYpdAに着目した研究を実施した。まず、*ypdA* 遺伝子の欠損は致死であることが知られていることから、プロモーター置換により、*ypdA* 遺伝子の発現を制御可能なConditional-*ypdA* 株 (*CypdA* 株) を造成して解析を進めた。本株においてYpdA低減時における細胞応答を顕微鏡により観察したところ、YpdA低減により隔壁間長の縮小、核分布の異常、核の分断化、

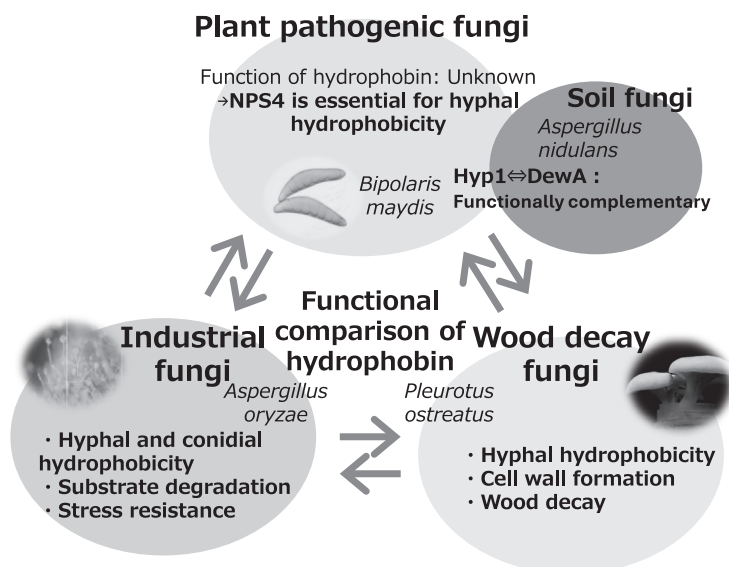


Fig. 2 Summary of functional analysis of hydrophobins in filamentous fungi.

液胞の異常発達を生じることが確認された。これは、抗真菌剤である Fludioxonil で処理した際の細胞応答と酷似していた。また、*CypdA* 株を親株とした RR 破壊株 (*CypdA-sskAΔ*, *CypdA-srrrAΔ*, *CypdA-sskAΔsrrrAΔ*) を用いた解析により、上記の細胞異常は全て片側の経路、すなわち SskA 経路に依存していることが明らかになった。一方、Fludioxonil の抗真菌作用発現や *ypdA* 欠損による致死性には SrrA 経路も関与していることが示唆されていることから、観察された細胞の異常形態は致死性の直接的な要因ではないと考えられた (Yoshimi *et al.*, 2021)。今後、RNA-seq や他菌種における解析結果との比較解析を進めていけば、本シグナル伝達経路の全容解明が期待できる。

続いて、植物病原菌 *B. maydis* の宿主認識機構に関わるシグナル伝達系の解析を行った。多くの植物病原糸状菌は“付着器”と呼ばれる特殊な細胞を介して宿主植物に侵入することが知られており、付着器は植物病原菌の感染戦略の中でも最も重要な器官とされる。この器官形成は菌の外界認識システムとその情報を核内に伝達するシグナル伝達系によって制御されており、*B. maydis* では、センサータンパク質 Opy2, Msb2, Sho1 が外界の疎水面認識に、MAP キナーゼ Chk1 が情報伝達に関与することが報告されている (Yoshida *et al.*, 2025; Izumitsu *et al.*, unpublished)。また、疎水面認識に関わるセンサーの欠損、例えば Opy2 の欠損はポリスチレン樹脂上では付着器形成能を欠くが、宿主葉上では付着器を形成することが知られている (Yoshida *et al.*, 2025)。このことは、本菌は複数の外界認識システムを持つことを示唆している。さらに、その認識対象が植物由来の多糖成分ペクチンであることも明らかになっている。しかし、ペクチン添加が付着器形成を誘導するメカニズムは依然として不明である。本課題では、第一にペクチン添加による付着器形成の誘導メカニズムに関連する因子の探索とその機能解析を試みた。まず、*OPY2* 破壊株 ( $\Delta$ *opy2* 株) を親株として、ペクチンを添加しても付着器を形成しない変異株 D296 株を単離した。また、D296 株は孢子発芽後に「直線的で分岐の少ない菌糸」を伸長させるという特徴も見出した。次に、順遺伝学的な解析により、「ペクチン添加による付着器形成の誘導不全」と「直線的で分岐の少ない菌糸」は、単一の遺伝子変異により制御されていることが明らかになった。さらに、比較ゲノム解析により、 $\alpha/\beta$ -hydrolase をコードする遺伝子における SNP が、D296 の特徴形質とリンクしていることが判明した。この遺伝子を *LAG1* と命名し、遺伝子破壊株の解析、機能ドメインの推定、Lag1 の局在解析を行った。特に *LAG1* 破壊株では、D296 株に類似した「直線的で分岐の少ない菌糸」が観察され、疎水表面上での付着器

形成率が減少するとともに、ペクチンによる付着器形成誘導も認められなかった。これらの結果は、Lag1 がこの菌の付着器形成において重要な役割を担うことを示唆している。また、*LAG1* 遺伝子と *OPY2* 遺伝子の二重破壊株の解析から、Lag1 は Chk1 MAPK 経路のシグナル伝達の制御に関わることも示唆された。

他方、センサータンパク質とは異なり Chk1 経路の下流の制御機構についてはほとんど何も情報が得られてこなかった。そこで本課題では、第二に Chk1 経路の制御機構と基質表面認識との関係を探るため、Chk1 のネガティブレギュレーターとして機能することが予想されるホスファターゼ Dsp2 の機能解析を行った。まず、*DSP2* 遺伝子の破壊株を解析したところ、*DSP2* 破壊株 ( $\Delta$ *dsp2* 株) は野生型株と比較して発芽率と病原性の低下を示した。また、各センサータンパク質遺伝子と *DSP2* の二重破壊株を解析したところ、各センサータンパク質欠損株が示す疎水面上での付着器形成の異常が、*DSP2* の破壊により大きく回復することが明らかになった。このことから、Dsp2 は Chk1 に特異的なホスファターゼであり、付着器形成を負に制御していることが示唆された。次に、野生型株、 $\Delta$ *dsp2* 株について付着器形成を経時的に観察したところ、野生型株では一定時間経過後に同調的に付着器が形成されるのに対し、 $\Delta$ *dsp2* 株では野生型株より形成開始時間は早まるが、その後の形成は緩やかに増加するという異なるパターンを示した。このことから、Dsp2 は複数の上流因子が関与する MAP キナーゼ Chk1 経路の各上流から伝わる軽微なシグナルによる経路の不適切な活性化を防いでいるものと考えられた。また、このメカニズムは本菌の宿主侵入行動の同調化に繋がり、菌の感染効率を向上させる戦略に寄与することが考えられた。

### 3. 糸状菌の細胞壁イメージング技術及び木材分解酵素の効率的生産に向けた高密度液体培養の達成

植物感染や木材腐朽を含むバイオマス分解において、固体基質表面と細胞表層の接触は、最初に起こるプロセスである。対象となる基質が異なる糸状菌間では、細胞表層構造にも差異があると考えられる。本項目では、細胞表層構造の中でも特に細胞壁に着目した研究を実施し、その構造改変による液体高密度培養法の開発を実施した。

真菌類の細胞壁は、細胞の最外層に位置し、細胞の形状維持、環境ストレスからの保護などの役割を担う生存に必須の構造体であり、主に  $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン、キチンなどの多糖類やタンパク質で構成されている (Gow *et al.*, 2017)。近年では、固体 NMR 法を用いた細胞壁の構造解析が進められ、担子菌 *Schizophyllum*

*commune* と子囊菌 *Aspergillus fumigatus* の構造が比較されている (Ehren *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2018). その結果、多糖の構成には共通点がある一方で、 $\beta$ -グルカンの分布などに大きな構造的違いがあることが明らかとなった。たとえば、*S. commune* では細胞壁全体に $\beta$ -グルカンが豊富に存在するが、*A. fumigatus* では中間層に限られており、さらにどちらかにしかない多糖 (アラビナン、 $\beta$ -1,4-グルカン、フコースなど) も発見された。ただし、これらのモデルは菌糸を破碎して分析しているため、多糖の局在に関しては推測が含まれており、より精密なモデルの構築には非破壊的な細胞壁解析が求められている。そこで本項目においては、多糖特異的結合タンパク質を使用した細胞壁イメージング技術の開発を実施した。イメージングには、2つの多糖特異的結合タンパク質を使用した。DCD-tetraRFP は、*Bacillus circulans* 由来の $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA) の3つの基質結合ドメインとDsRedの融合タンパク質であり $\alpha$ -1,3-グルカンに特異的に結合する (Otsuka *et al.*, 2022a)。また、BGBD-GFP は *Lisobacter enzymogenes* 由来の $\beta$ -グルカナーゼの基質結合ドメインとGFPの融合タンパク質であり、 $\beta$ -1,3-結合を主鎖とするグルカンを標識できる (Otsuka *et al.*, 2022b)。担子菌であるヒラタケ (*P. ostreatus*) 及び子囊菌である麹菌 (*A. oryzae*) を用いてイメージング解析を行った結果、菌糸の染色パターンは両種間で顕著な違いを示し、*P. ostreatus* の細胞壁表面層は主に $\beta$ -グルカンで構成されているのに対し、*A. oryzae* は $\alpha$ -1,3-グルカンで構成されており、これらの2つの糸状菌の細胞壁の外層多糖が明確に異なることが示された。また本解析と合わせて、アルカリ分画法を用いて栄養菌糸の細胞壁構成成分を分析した結果、*A. oryzae* と比較し細胞壁中の $\beta$ -グルカン量は、*P. ostreatus* の方が1.5倍ほど多く、キチンは*P. ostreatus* の方がやや少なかった。また、*P. ostreatus* の細胞壁中の $\alpha$ -1,3-グルカン量は、*A. oryzae* と比較し半分以下であることも明らかとなった。以上の解析から担子菌であるヒラタケと子囊菌である麹菌の細胞壁を構成する基本的な多糖には共通性が見られる一方で、外層多糖並びに多糖の組成は大きく異なる事が示された。今後、複数の担子菌・子囊菌を用いた同手法による細胞壁多糖構造の解析を行っていくことで細胞壁構造の門レベルでの特徴や共通性が明らかになっていくものと考えられる。また、細胞壁合成酵素遺伝子の進化系統学的解析からキチン合成酵素遺伝子については、担子菌と子囊菌のそれぞれに特異的なクレードが見つかっており (Schiphof *et al.*, 2024)、これらの解析も併せて実施することで細胞壁構造とその合成を支える基盤となるユニーク合成機構が明らかになると期待される。

本研究では、細胞壁イメージング技術の開発に加えて、細胞壁構造の改変による白色腐朽菌を用いた木材分解酵素生産に向けた高密度液体培養法の開発を試みた。多くの糸状菌は液体培養時に菌糸塊を形成することが知られている。そのため液体培養効率を高める方法のひとつに、菌糸の分散性を高めて高密度に培養する方法がある (Miyazawa *et al.*, 2016, 2019)。*Aspergillus nidulans* では以前、細胞壁多糖を合成する酵素である $\alpha$ -グルカン合成酵素の遺伝子破壊によって、菌糸体の分散性が改善された (Miyazawa *et al.*, 2020)。従って、細胞壁構造が分散性の主要因であると推測される。その一方で白色腐朽菌である *P. ostreatus* を用いて $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の破壊を実施したところ、子囊菌の知見とは異なり、液体培養時の菌糸塊形成に変化は見られなかった (Kawauchi *et al.*, unpublished)。また、その他の細胞壁合成酵素遺伝子の破壊株においても同様に菌糸塊形成に変化は見られなかった (Kawauchi *et al.*, unpublished)。本研究における解析結果から子囊菌と担子菌の細胞壁多糖に大きな違いがあることが明らかとなったため、子囊菌における知見をそのまま白色腐朽菌に適用しても液体高密度培養の達成は難しいと考えられた。そこでこれまでの担子菌における研究成果から、複数の細胞壁合成関連遺伝子の活性に関わると予測される遺伝子 *pkac2* の破壊株 ( $\Delta$ *pkac2*) を *P. ostreatus* で作製した。 $\Delta$ *pkac2* 株は細胞壁の $\beta$ -グルカン量が減少してだけでなく、ペレットが形成されず液体培地での高密度培養が可能であった。また、 $\Delta$ *pkac2* 株の木材分解酵素生産能力を評価したところ、高いセルラーゼ及びキシラナーゼ生産能力を持つことを明らかになった (Otsuka *et al.*, 2025)。これらの結果は、 $\Delta$ *pkac2* 株が液体培地で効率的に培養できることを示しており、木材分解酵素の工業的生産に適した菌株となり得る可能性を示している (Otsuka *et al.*, 2024)。本研究により、白色腐朽菌で初めて液体培養時の菌糸塊の分散株の開発に成功し、工業レベルでの液体高密度培養に向けた足掛かりをつかむことができた。一方本研究で開発した $\Delta$ *pkac2*株は、培養安定性、ストレス耐性の面で改善が必要と考えられる。今後は *pkac2* の下流で働く遺伝子の同定及びその遺伝子破壊による菌糸塊分散の達成が可能なのかを検証し、よりよい液体高密度培養系の達成を目指していきたいと考えている。

#### 4. 白色腐朽菌における細胞壁合成制御系の解明及びその操作によるマッシュルームマテリアルの物性改変

白色腐朽菌は、農業・林業廃棄物を培地として生育可能であるため、サステイナブルな資源として注目されており、近年マッシュルームレザーなどの代替材料の開発に利用され始めている。この素材を既存の用途に留める

ことなく、航空機等での利用に耐える強固なレザーや生分解性プラスチック等、多用途且つ付加価値の高い材料へと発展させるためには、菌糸体の有する物性を大規模かつ効率的に改変できる新たなアプローチが必要である。そのような中で、先行研究によって細胞壁が菌糸体の強度や撥水性などの物性に強く寄与することが示唆されたことから、細胞壁を標的とした分子育種に期待が集まっている (Haneef *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2025)。

本研究開始前の最初の試みとしてヒラタケをモデルに  $\alpha$ -1,3-グルカン合成遺伝子 *ags1* 及び担子菌特異的キチン合成構成遺伝子 *chsb* の破壊株を用いた簡易的な菌糸体マット生産試験やコンポジット生産試験を行っていた。しかしながら、この最初の試みにおいては、菌糸体マットやコンポジットの物理的性質に大きな変化は見られなかった (data not shown)。この研究開始前の結果を踏まえて、まずは細胞壁構造を大幅に改変できる可能性のある遺伝子の機能解析を実施し、その上でマテリアル生産試験を新たに実施することとした。

子囊菌や担子菌酵母において細胞壁の物理的な損傷や環境ストレスに応答して細胞壁合成を制御する経路として、Cell Wall Integrity signaling pathway (CWI 経路) が知られている (Dichtl *et al.*, 2016; Levin, 2011)。白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) においては、*Saccharomyces cerevisiae* の CWI 経路構成因子の多くのホモログが確認されており CWI 経路の基本経路は保存されている可能性が示唆されている (河内, 2025)。また、白色腐朽菌を含む他の糸状担子菌においても CWI 構成遺伝子の Rho1 や Slt2 (Mpk1) の機能解析がなされ、細胞壁多糖合成への寄与が明らかとされている (Zan *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2019)。したがって、白色腐朽菌においても CWI 経路が細胞壁合成を制御する経路の1つとして機能すると考えられる。一方で、白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) と *S. cerevisiae* の CWI 経路との差異も確認され、センサータンパク質、GTPアーゼ、MAP2K 及び転写因子にそれぞれタンパク質の欠損がみられ、Rom2 や Rho1、Mpk1 及び Crz1 には重複が生じていることが分かった。加えて、*P. ostreatus* における Rlm1 は、成長率に甚大な影響を及ぼし、主に  $\beta$ -グルカン合成を制御することが示唆されているが (Kojima *et al.*, unpublished)、*Aspergillus* 属における Rlm1 (RlmA) は、成長率に与える影響は軽微で、主に  $\alpha$ -グルカンの合成制御を担うことが示されており、転写因子 Rlm1 の機能に大きな違いが見られることが分かった (Damveld *et al.*, 2005; Fujioka *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2016)。したがって、CWI 経路の基本経路は保存されている可能性が示唆されているものの、個々のタンパク質の機能には子囊菌とは異なる担子菌にユニークな点が存在すると考

えられる。

CWI 経路の下流で働くと考えられる転写因子として、Mbp1、Swi4、及び Swi6 が *S. cerevisiae* において同定されている。この3つの転写因子は、高度に保存された DNA 結合ドメイン (APSES ドメイン) を有する APSES ファミリー転写因子である (Longo *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015)。APSES ファミリーに属する転写因子は、A、B、C、及び D の4つのクレードに分けられ、先の3つの転写因子は、このうちクレード A に属する (Longo *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015)。そこでまずクレード A APSES ファミリー転写因子の保存度を再確認するために、複数の担子菌・子囊菌からクレード A APSES ファミリー転写因子のホモログと考えられる遺伝子を抽出し、進化系統樹解析を実施した。その結果全ての担子菌及び子囊菌において Mbp1 及び Swi6 が見られたため、両転写因子は真菌類で広く保存されていることが示唆された。一方で、Swi4 は Saccharomycotina 亜門にのみ見られたため、Saccharomycotina 亜門に特有の転写因子であると考えられた。そのため、Swi4 を有する子囊菌酵母 (Saccharomycotina 亜門) と Swi4 を持たない糸状菌や担子菌酵母とでは進化的な分化によって Mbp1 及び Swi6 の機能に差がある可能性が考えられた。*S. cerevisiae* を除いては、クレード A APSES ファミリー転写因子の細胞壁合成制御における機能的な重複及び差異は不明であったことから、*P. ostreatus* をモデルに Mbp1 及び Swi6 の機能解析を実施した。 $\Delta$ *mbp1* 破壊株では、 $\beta$ -グルカンの含有割合やその合成酵素遺伝子の発現量が低下していた。さらに、キチン含有割合に変化がない一方で、いくつかのキチン合成酵素遺伝子の発現量に変化が見られた。加えて、 $\Delta$ *mbp1* 株では、菌糸表層を覆う  $\beta$ -グルカン合成異常やキチン合成遺伝子の発現プロファイルの変化に起因すると考えられる、菌糸表面に露出しているキチン蛍光の増加が観察された。これらの結果より、Mbp1 は正常な  $\beta$ -グルカン・キチン合成制御に必須の役割を有することが示された (Kojima *et al.*, 2024)。一方、 $\Delta$ *swi6* 株では、細胞壁の平均的な厚さ、 $\beta$ -グルカンの含有割合や合成酵素遺伝子の発現量に変化が見られなかったが、細胞壁の厚さのばらつき、キチンの含有割合・局在・合成酵素遺伝子の発現プロファイルが変化したことから、Swi6 は特にキチン合成を制御することが示唆された (Kojima *et al.*, 2025)。そこで特に、細胞壁中の  $\beta$ -グルカン及びキチンの両方に影響を与える Mbp1 にフォーカスして、菌糸体マテリアルの試作を実施した。菌糸体マットを作成し引張試験を実施した結果、野生株と比較しヤング率と引張強度が増加し、より硬く変形しにくい物性に変わることが分かった。また、菌糸体コンポジットは、野生株より高い圧縮強度を示した。

本研究により、Mbp1及びSwi6の細胞壁合成制御における機能的重複・差異が白色腐朽菌で初めて明らかとなった。またMbp1の細胞壁合成制御における詳細な機能を真菌類で初めて示すことができた。今後、糸状子囊菌においてもMbp1及びSwi6の細胞壁における役割を解明し、本研究成果との比較を実施することでCWI経路下流における細胞壁制御の相違が明らかとなることが期待され、蛍光イメージングにより見えてきた、子囊菌と担子菌の細胞壁構造の差異を生み出す一因が明らかになるのかもしれない。また、*mbp1*破壊株を用いたマッシュルームマテリアルの試作試験の結果は、細胞壁の改変によるマッシュルームマテリアルの物性改変が可能であることを示しており、今後さらに研究を進めることで、革新的なマテリアル開発につながっていけばと考えている。

### 第三章 おわりに

本寄附講座では、生存様式・分類の異なる糸状菌として産業菌 *Aspergillus oryzae*、植物病原菌 *Bipolaris maydis*、白色腐朽菌 *Pleurotus ostreatus* の3種を中心として特に細胞表層構造に着目した研究を展開した。特にハイドロフォビンに着目した研究においては、これまでの通説を覆す多くの発見に至った。*B. maydis*では菌糸の表面疎水性発現は、主にNPS4によって生産される環状ペプチドを主体としており、ハイドロフォビンの関与は極めて軽微かほぼ無いことが明らかとなった。これは、糸状菌においてハイドロフォビン以外の物質が菌糸の疎水性発現の主たる要因になり得ることを示している。ハイドロフォビンの局在については未検証のため推測の域をでないが、*B. maydis*が感染するトウモロコシが、もし菌糸表層のハイドロフォビンを認識するようなレセプターを持つ場合には、これまで解析のなされてきた糸状菌のように、ハイドロフォビンが菌糸表面に存在する場合、トウモロコシが *B. maydis* の存在を容易に認識し、感染は正立しないことになる。もしかしたら、*B. maydis* が宿主への親和性を獲得する手段として、ハイドロフォビンに変わる代替因子として環状ペプチド生産能を獲得し、他の糸状菌とは異なる菌糸の表面疎水性発現機構を選択したのかもしれない。また白色腐朽菌 *P. ostreatus* においても、特に正常なリグニン分解速度の維持においてハイドロフォビンが必須であることを示すことができた。そのため、ハイドロフォビンは、木材腐朽菌が持つ木材分解という特異な能力を獲得する上で、1つのドライブフォースになった可能性が考えられた。ハイドロフォビンは、これまでは菌糸の疎水性発現が主たる機能として考えられたが、本寄附講座による様々な生態環境に適応した糸状菌を用いた解析を通して、各々の糸状菌が対象

とする固体基質又は宿主に応じ、ハイドロフォビンの機能が緻密に進化していることを示すことができた。今後ハイドロフォビンがどのようなメカニズムで木材分解に関わるのか、*B. maydis*におけるハイドロフォビンの機能は果たして何なのか、このような未解決の課題を解析していくことで、ハイドロフォビンの糸状菌・環境インターフェイスにおける真の役割が明らかになっていくものと考えている。

ハイドロフォビンとともに、菌糸の細胞表構造を担う細胞壁の解析を進める過程で、細胞壁多糖の非破壊かつ生細胞におけるイメージングを可能とする新たな技術開発に成功した。当該技術により子囊菌門と担子菌門に属する糸状菌の間で細胞壁多糖の層構造が大きく異なる可能性を示すことができた。本寄附講座の研究期間においては限られた菌における細胞壁イメージングしか実施できなかったが、今後様々な子囊菌・担子菌に本技術を適用し解析することで細胞壁構造の共通性とそれぞれの持つユニークな構造が可視化されるものと考えている。

また、特に白色腐朽菌における細胞壁合成制御機構の解明を進めていく中で、木材分解酵素の効率的生産につながる、液体高密度培養系の構築に成功した。白色腐朽菌の持つリグニン分解酵素は、細菌や酵母を宿主とした異種発現では、活性が低く、白色腐朽菌そのものを使った効率的培養法の提案が求められていたことから、本研究で開発したシステムを成熟させていくことで、これまで難しかった白色腐朽菌を用いた木材分解酵素の効率的生産が実現できるかもしれない。また、白色腐朽菌の細胞壁改変によりバイオコンポジットの強度を高めることに成功した。本研究成果は、マッシュルームマテリアル改良に向けた細胞壁の標的としての可能性を示し、将来の「細胞壁工学」確立に向けてその基盤を固める第一歩となるものと考えている。今後さらに研究を進めることで、本研究で試作した梱包材やプレリミナリーなレザーに留まらず、航空機等での利用に耐える強固なレザーや生分解性プラスチック等など開発につながるような技術革新につながればと考えている。

### 謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成31年度寄附講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして、寄附講座特定研究員（吉田裕史、Xu Haibo, Zhang Weitong）、寄附講座技術補佐員（辻村尚子、西田水穂）の協力のもとに実施しました。また、世話人である京都大学大学院農学研究科森林科学専攻森林生化学分野の本田与一教授及び京都大学大学院農学研究科地球環境学堂資源循環学廊生産環境微生物学論分野の田中千



尋教授の多大なご支援とご協力、両分野の研究室に在籍した大学院生の皆さんの協力の賜物です。また研究に関し様々な技術支援をいただいた、京都大学大学院農学研究科森林科学専攻森林生化学分野中沢威人助教、山形大学大学院理工学研究科矢野成和准教授、滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科入江俊一教授にあわせて感謝します。さらに、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(B)(吉見啓 22H02238)、基盤研究(C)(河内護之 22K05763)、海外連携研究(河内護之 24KK0119)、二国間交流事業(河内護之 JPJSBP 120238807)、および特別研究員奨励費(寺内裕貴 20J01300、韓浚弦 24KJ1336、大塚唯 23KJ1191)の支援にも感謝致します。

## 文 献

- Alfaro M., Castanera R., Lavín J.L., Grigoriev I.V., Oguiza J.A., Ramírez L. & Pisabarro A.G. 2016. Comparative and transcriptional analysis of the predicted secretome in the lignocellulose-degrading basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Microbiol.* **18**: 4710–4726.
- Chen, D.D., Shi, L., Yue, S.N., Zhang, T.J., Wang, S.L., Liu, Y.N., Ren, A., Zhu, J., Yu, H.S. & Zhao, M.W. 2019. The Slt2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genet. Biol.* **123**: 70–77.
- Damveld, R.A., Arentshorst, M., Franken, A., VanKuyk, P.A., Klis, F.M., Hondel, C.A.M. van den & Ram, A.F.J. 2005. The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol. Microbiol.* **58**: 305–319.
- Dichtl, K., Samantaray, S. & Wagener, J. 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol.* **18**: 1228–1238.
- Ehren, H.L., Appels, F.V.W., Houben, K., Renault, M.A.M., Wösten, H.A.B. & Baldus, M. 2020. Characterization of the cell wall of a mushroom forming fungus at atomic resolution using solid-state NMR spectroscopy. *Cell Surf.* **6**: 100046.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T. & Abe, K. 2007. MpkA-dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1497–1510.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P. & Munro, C.A. 2017. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* **5**: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016.
- Han, J., Kawauchi, M., Schiphof, K., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023a. Features of disruption mutants of genes encoding for hydrophobin Vmh2 and Vmh3 in mycelial formation and resistance to environmental stress in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **370**: fnad036.
- Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Physiological function of hydrophobin Hydph16 in cell wall formation in agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **176**: 103943.
- Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023b. Physiological function of hydrophobin Vmh3 in lignin degradation by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **76**: ovad048.
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I.S., Heredia-Guerrero, J.A. & Athanassiou, A. 2017. Advanced materials from fungal mycelium: Fabrication and tuning of physical properties. *Sci. Rep.* **7**: 41292.
- Hawksworth, D.L. & Lücking, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectr.* **5**: 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M.C.D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F. & Wang, T. 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* **9**: 2747.
- Kojima, H., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Putative APSES family transcription factor *mbp1* plays an essential role in regulating cell wall synthesis in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **175**: 103936.
- Kojima, H., Izumi, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2025. Role of putative APSES family transcription factor Swi6 in cell wall synthesis regulation in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Biol.* **129**: 101526.
- Levin, D.E. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145–1175.
- Li, X., Wang, F., Xu, Y., Liu, G. & Dong, C. 2021. Cysteine-rich hydrophobin gene family: Genome wide analysis, phylogeny and transcript profiling in *Cordyceps militaris*. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 643.
- Longo, L.V.G., Ray, S.C., Puccia, R. & Rappleye, C.A. 2018. Characterization of the APSES-family transcriptional regulators of *Histoplasma capsulatum*. *FEMS Yeast Res.* **18**: foy087.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Zhang, S., Sano, M., Nakayama, M., Gomi, K. & Abe, K. 2016. Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1853–1863.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Sano, M., Tabata, F., Sugahara, A., Kasahara, S., Koizumi, A., Yano, S., Nakajima, T. & Abe, K. 2019. Both Galactosaminogalactan and  $\alpha$ -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Front. Microbiol.* **10**: 2090.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A. & Abe, K. 2020. The mechanisms of hyphal pellet formation mediated by polysaccharides,  $\alpha$ -1,3-glucan and galactosaminogalactan, in *Aspergillus* species. *Fungal Biol. Biotechnol.* **7**: 10.
- Otsuka, Y., Kawauchi, M., Elisashvili, V., Endo, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T., Irie, T. & Honda, Y. 2025. High productivity of cellulase and xylanase enzymes in the mycelial-dispersed *Pleurotus ostreatus*  $\Delta$ *pkac2* strain. *J. Biosci. Bioeng.* in press.
- Otsuka, Y., Kawauchi, M., Yoshizawa, K., Endo, S., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Elisashvili, V., Nakazawa, T., Irie, T. & Honda, Y., 2024. Disruption of the *pkac2* gene in *Pleurotus ostreatus* alters cell wall structures and enables mycelial dispersion in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **371**: fnae101

- Otsuka, Y., Sasaki, K., Suyotha, W., Furusawa, H., Miyazawa, K., Konno, H. & Yano, S. 2022a. Construction of a fusion protein consisting of  $\alpha$ -1,3-glucan-binding domains and tetrameric red fluorescent protein, which is involved in the aggregation of  $\alpha$ -1,3-glucan and inhibition of fungal biofilm formation. *J. Biosci. Bioeng.* **133**: 524–532.
- Otsuka, Y., Sato, K., Yano, S., Kanno, H., Suyotha, W., Konno, H., Makabe, K. & Taira, T. 2022b. GH-16 type  $\beta$ -1,3-glucanase from *Lysobacter* sp. MK9-1 enhances antifungal activity of GH-19 type chitinase, and its glucan-binding domain binds to fungal cell-wall. *J. Appl. Glycosci.* **69**: 49–56.
- Rocha, M.C., Fabri, J.H., Franco de Godoy, K. *et al.* 2016. *Aspergillus fumigatus* MADS-Box transcription factor *rlmA* is required for regulation of the cell wall integrity and virulence. *G3*. **6**: 2983–3002.
- Sehuren, F. H. J. & Wessels, J. G. H. 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* **90**, 199–205.
- Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Functional analysis of basidiomycete specific chitin synthase genes in the agaricomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **172**: 103893
- Shin, H.J., Ro, H.S., Kawauchi, M. & Honda, Y. 2025. Review on mushroom mycelium-based products and their production process: from upstream to downstream. *Bioresour Bioprocess* **12**: 3.
- Takahashi, T., Maeda, H., Yoneda, S., Ohtaki, S., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T. & Abe, K. 2005. The fungal hydrophobin RoLA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. *Mol. Microbiol.* **57**: 1780–1796.
- Wessels, J. G. H., de Vries, O. M. H., Ásgeirsdóttir, S. A. & Schuren, F. H. J. 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* **3**: 793–799.
- Wösten, H. A. B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 625–646.
- Wu H., Nakazawa T., Xu H., Yang R., Bao D., Kawauchi M., Sakamoto M. & Honda Y., 2021. Comparative transcriptional analyses of *Pleurotus ostreatus* mutants on beech wood and rice straw shed light on substrate-biased gene regulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **105**, 1175–1190.
- Xu, D., Wang, Y., Keerio, A.A. & Ma, A., 2021. Identification of hydrophobin genes and their physiological functions related to growth and development in *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol. Res.* **247**: 126723.
- Yoshida, H., Shigeyoshi, S., Goto, S. *et al.* 2025. Dual regulation of appressorium development in the maize pathogen *Bipolaris maydis*: BmOPY2-mediated hydrophobic surface recognition and pectin recognition. *Mycoscience*. in press.
- Yoshimi, A., Hagiwara, D., Ono, M. *et al.* 2021. Downregulation of the *ypdA* gene encoding an intermediate of His-Asp phosphorelay signaling in *Aspergillus nidulans* induces the same cellular effects as the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Front. Fungal Biol.* **2**: 67549
- Zan, X.Y., Zhu, H.A., Jiang, L.H., Liang, Y.Y., Sun, W.J., Tao, T.L. & Cui, F.J. 2020. The role of *Rho1* gene in the cell wall integrity and polysaccharides biosynthesis of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **165**: 1593–1603.
- Zhao, Y., Su, H., Zhou, J., Feng, H., Zhang, K.Q. & Yang, J. 2015. The APSES family proteins in fungi: Characterizations, evolution and functions. *Fungal Genet. Biol.* **81**: 271–280.
- 河内護之. 2025. マッシュルームマテリアル改良に向けて:分子育種による白色腐朽菌細胞壁構造の改変. *応用糖質科学* **15**: 120–124.

# 糸状菌の菌糸撥水性発現及びハイドロフォビンの生理機能の多様化

辻 健也, 寺内 裕貴, 河内 護之, 吉見 啓

京都大学農学研究科糸状菌・環境インターフェイス工学講座

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

## Hyphal hydrophobicity in filamentous fungi and the diversification of physiological functions of hydrophobin

Kenya Tsuji, Yuki Terauchi, Moriyuki Kawauchi, Akira Yoshimi

Laboratory of Environmental Interface Technology of Filamentous Fungi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Kitashirakawaoiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Hydrophobins are small amphiphilic proteins secreted by filamentous fungi. These proteins confer hydrophobic properties to hyphae and conidia. They have also been reported to be involved in various biological processes. In this study, we investigated the biological functions of hydrophobins in the plant pathogenic fungus *Bipolaris maydis*. The genome of *B. maydis* contains four hydrophobin genes: Hyp1, which belongs to class I, and Hyp2, Hyp3, and Hyp4, which belong to class II. All four genes were confirmed to be expressed. We generated single gene deletion mutants as well as triple and quadruple mutants. However, no significant differences were observed between the wild-type strain and all mutants in terms of radial growth, conidiation, stress tolerance, virulence, or sexual reproduction. Furthermore, colony hydrophobicity of all the mutants was similar to that of the wild-type strain. In contrast, the colony hydrophobicity of the  $\Delta dewA$  mutant of *Aspergillus nidulans* was significantly reduced. However, when the *HYP1* gene from *B. maydis* was introduced into this mutant, its hydrophobicity was restored to the level of the control strain. Taken together, these results suggest that hydrophobins in *B. maydis* are not significantly involved in its biological processes, although Hyp1 retains its functional activity. Our data further provide additional evidence that the functions of hydrophobins depend on the fungal species. Additionally, through screening of collections of mutants of *B. maydis*, we identified found a strain that formed markedly hydrophilic colonies. Genome comparison analysis showed that this phenotype was caused by a mutation in the *NPS4* gene. The *NPS4* gene disruptants also formed the hydrophilic colony. These results indicate that colony hydrophobicity in *B. maydis* depends not on hydrophobins, but on a compound produced by Nps4.

Key words: *Bipolaris maydis*, Hydrophobicity, Hydrophobin, NRPS

### 緒 言

ハイドロフォビンは、糸状菌によって分泌される低分子量の両親媒性タンパク質である (Wösten, 2001)。ア

ミノ酸配列の相同性は低い一方で、類似した疎水性パターンを示すことが知られている。これらは、4つのジスルフィド結合を形成する8つのシステイン残基からなる高度に保存された配列を持ち、その疎水性パターンおよび凝集体の溶媒への溶解性に基づき、クラスIとクラスIIに分類される (Sehuren & Wessels, 1990; Wösten, 2001)。クラスIハイドロフォビンはトリフルオロ酢酸には可溶であるが、高温のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) には不溶である。一方で、クラスIIハイドロフォビンはSDSにも可溶である (Wessels *et al.*, 1991)。

一般的に、糸状菌の表面は疎水性に保たれており、この特性は環境中での生存、増殖、および病原性の発現に

E-mail: yoshimi.akira.8c@kyoto-u.ac.jp

共同研究者：吉田 裕史 (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)。

佐波 雅史 (京都大学大学院農学研究科)。

韓 浚弦 (京都大学大学院農学研究科)。

中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)。

本田 与一 (京都大学大学院農学研究科)。

田中 千尋 (京都大学大学院地球環境学堂)。

において多くの利点をもたらす (Wösten, 2001). 菌糸が疎水化されることで水を弾き, 過剰な水分による浸軟を防ぐことができる. また, 空気中への立ち上がりを助け, 気中菌糸および高所での分生子形成を可能にする. さらに, 分生子表面の疎水性は空気中での効率的な分散を促進し, 生息域の拡大にも寄与すると考えられている. 胞子や気中菌糸の表面において, クラスIハイドロフォビンがrodletと呼ばれる特殊な凝集構造を形成することも知られている. 担子菌や子嚢菌を含む多くの糸状菌において, この表面疎水性には細胞外に分泌されたハイドロフォビンが関与している. 実際, 多くの菌種でハイドロフォビン遺伝子の欠失により, コロニーおよび分生子が親水性を示すことが報告されており, これはハイドロフォビンに共通する機能であると考えられている.

さらに, ハイドロフォビンはその他の多様な生物学的プロセスにも関与していることが明らかとなっている (Wösten, 2001). たとえば, *Aspergillus oryzae* では, ハイドロフォビンがクチナーゼと相互作用することで, 固体ポリマーの効率的な分解に寄与することが報告されている (Takahashi *et al.*, 2005). 同様に, 植物病原菌 *Pyricularia oryzae* においても, ハイドロフォビンが植物表面のワックス層の分解に関与していると考えられている (Pham *et al.*, 2016). 特に, クラスIハイドロフォビン遺伝子 *MPG1* の欠失は, 付着器 (植物への侵入器官) の形成および病原性の発現に影響を及ぼす (Beckerman & Ebbolle, 1996; Talbot *et al.*, 1996). さらに, 同菌のクラスIIハイドロフォビン遺伝子 *MHP1* も完全な病原性に必要である (Kim *et al.*, 2005). *Verticillium dahliae* では, クラスIIハイドロフォビン *VDH1* および *VdHP1* が正常な菌核形成に必要である (Klimes *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2022). *VDH1* の欠損は病原性に大きな影響を与えないが, *VdHP1* の欠損は毒素産生量の増加と病原性の強化を引き起こす (Zhang *et al.*, 2022). 一方, *Cladosporium fulvum* や *Botrytis cinerea* では, ハイドロフォビンは病原性に必須ではないと報告されている (Whiteford & Spanu, 2001; Mosbach *et al.*, 2011). これらの知見から, ハイドロフォビンの機能は菌種によって多様であることが示唆される. 多くの糸状菌は複数のハイドロフォビンを有しており, モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では6つ, 病原菌 *Fusarium graminearum* では5つ, *B. cinerea* では3つ, *P. oryzae* では2つのハイドロフォビン遺伝子が存在することが知られている (Talbot *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005; Mosbach *et al.*, 2011; Grünbacher *et al.*, 2014; Quarantin *et al.*, 2019). *B. cinerea* では, 2つ以上のハイドロフォビンを欠失すると子のう盤形成に異常が生じるが, 1つの遺伝子の欠失では有性生殖に影響しないことから, 複数のハイドロフォビンが

冗長的な機能を持つと考えられている (Terhem & van Kan, 2014).

*B. maydis* (syn: *Cochliobolus heterostrophus*) は, トウモロコシごま葉枯病を引き起こす植物病原菌である. Turgeon *et al.* (2008) は, 本菌において非リボソームペプチド合成酵素4遺伝子 (*NPS4*) の欠失はコロニーの疎水性が低下することを報告している. また, MAPキナーゼ *CHK1* 遺伝子を欠失した株でも, 野生型株に比べてコロニーの疎水性が有意に低下することが示されている (Degani *et al.*, 2013). *B. maydis* には少なくとも4つのハイドロフォビン遺伝子が存在するとされているが (Degani *et al.*, 2013), それらが本菌の疎水性に関与している確証は得られていない. また, これらの遺伝子はBLAST検索により同定されたものであるが, ハイドロフォビン間の配列相同性が低いため, 全ての関連遺伝子が網羅されていない可能性もある. さらに, 疎水性以外にもこれらのハイドロフォビンが機能するか否か, すなわち形態形成や病原性に影響を及ぼすか否かについては未だ十分に解析されていない. そこで本研究では, *B. maydis* におけるハイドロフォビン遺伝子を網羅的に同定するために, 公開されているアミノ酸配列データを用いた包括的な *in silico* 解析を行った. さらに, 同定されたハイドロフォビンの機能解析を目的として, 単一または複数のハイドロフォビン遺伝子を欠失させた変異株を作成し, 各種表現型を解析した. 加えて, 異種間における機能的互換性を調べるため, *B. maydis* 由来のハイドロフォビンを *A. nidulans* のコロニー疎水性欠損株において異種発現させた.

## 実験方法

### 菌株および培養条件

本研究を通して *B. maydis* HITO7711 (交配型遺伝子 *MAT1-2*) を野生株として利用した (Tanaka *et al.*, 1991). 交配実験にはアルビノ株 *alb3* (交配型遺伝子 *MAT1-1*) を利用した. すべての形質転換株はHITO7711株を親株として生み出された (Tanaka *et al.*, 1991). MAPキナーゼをコードする遺伝子 *CHK1* の破壊株は疎水性試験のポジティブコントロールとして利用した (Izumitsu *et al.*, 2009; Degani *et al.*, 2013). MASHIKI2-2はHITO7711株とは異なる交配型因子を持ち, 子孫を得るための交配株として利用した. ハイドロフォビン遺伝子の四重破壊株 (*MAT1-1*) は四重破壊株 (*MAT1-2*) とMASHIKI2-2との交配により得られた. 親水性コロニーを形成する突然変異株をD86株もまた本研究に供試した. すべての株は平板完全培地 (CMA, Tanaka *et al.*, 1991) もしくは野菜ジュース培地を用い

て維持した。交配試験には Sach's 培地を使用した (Tanaka *et al.*, 1991)。

*A. nidulans* ABPU1 ( $\Delta ligD$ ) は *dewA* 遺伝子欠損株を得るための親株として利用した (Hagiwara *et al.*, 2007; Yoshimi *et al.*, 2013)。*argB* 遺伝子が相補された BPU1 株は表現型解析におけるコントロール株 (CNT) として利用した (Hagiwara *et al.*, 2007; Miyazawa *et al.*, 2021)。*Czapek-Dox* 平板培地 (CDA) は *A. nidulans* を培養するための基準培地として使用された (Fujioka *et al.*, 2007)。

#### *B. maydis* におけるハイドロフォビンの同定

ハイドロフォビンは保存されたシステイン配列とシグナルペプチドを有している両親媒性のタンパク質である。*B. maydis* のハイドロフォビンを同定するために DOE Joint Genome Institute (JGI) のウェブサイト ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5\\_3/CocheC5\\_3.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5_3/CocheC5_3.home.html), Ohm *et al.*, 2012; Condon *et al.*, 2013) から *Cochliobolus heterostrophus* C5 v2.0 の翻訳済み配列をダウンロードした。このデータセットからまず、システイン残基が豊富 ( $\geq 4$ ) および低分子 ( $\leq 250$  amino acid) なタンパク質を探索した。また次にこれらのタンパク質がシグナルペプチドを有しているかどうかを、SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) を用いて確認した。絞り込まれたデータの中から、ハイドロフォビンに保存されたシステインパターンを持つタンパク質を目視で選択した。ハイドロパシープロットは Kyte & Doolittle (1982) の手法に基づき、Prot Scale を用いて解析した。*B. maydis* と *P. oryzae* のハイドロフォビンのアミノ酸配列は、MEGA11 を用いて MUSCLE でアライメントした (Edgar, 2004; Tamura *et al.*, 2021)。このアライメントおよびハイドロパシープロットの解析では *P. oryzae* のハイドロフォビン Mpg1 (クラス I) および Mhp1 (クラス II) の各アミノ酸配列をリファレンスとして使用した。*B. maydis* のそれぞれのタンパク質の特徴づけには Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) を使用した。

#### ハイドロフォビン遺伝子の RT-PCR 解析

野生株は、3つの異なる条件下、液体培地、固体培地、およびトウモロコシの葉上、で培養した。液体培地の場合、分生子 (最終濃度  $10^5$  個/mL) を 100 mL の液体完全培地 (CML) に添加し、振とう培養した。固体培地の場合、100 個の胞子をセロファン膜の上に接種し、その膜を CMA に移して培養した。宿主葉上での培養の場合、トウモロコシを接種して 1 か月間生育させ、健全な葉を

採取した。一枚の葉の上に胞子懸濁液 ( $5.0 \times 10^5$  個/mL の 20  $\mu$ L) を、5 か所に接種した。その後、葉から 5 か所の病斑部を切り取り、収集した。すべての培養は 25°C の暗所で 3 日間行い、反復数は 3 回とした。Torizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、菌糸または葉の病斑部から Yoshida & Tanaka (2020) の手法により、トータル RNA を抽出した。得られたトータル RNA から、SuperScript IV 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を合成した。

#### ハイドロフォビン遺伝子破壊株の作出

推定ハイドロフォビンをコードする各遺伝子に対して破壊カセットを構築した。これらのカセットを構築するための PCR は、Takara Ex Taq (タカラバイオ, 草津, 日本) を用いて実施した。遺伝子破壊の PCR 確認はすべて、SapphireAmp Fast PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いて行った。

*HYP1* 遺伝子破壊株 ( $\Delta hyp1$ ): *B. maydis* HITO7711 株のゲノム DNA は、Izumitsu *et al.* (2012) による方法に従って抽出した。*HYP1* 遺伝子の ORF 上流領域および下流領域は、ゲノム DNA から PCR で増幅した。ジェネティシン遺伝子 (*NPTII*) カセットは、pZGenI プラスミドから PCR で増幅した (Sumita *et al.*, 2017)。これら 3 つの増幅産物は、fusion-PCR によって融合した。得られたカセットをエタノール沈殿で精製し、*HYP1* 遺伝子の破壊に使用した。形質転換は、Izumitsu *et al.* (2009) に記載された方法に基づいたプロトプラスト-PEG 法で行った。*HYP1* 遺伝子が破壊カセットにより置換されたかどうかは、PCR によって確認した。同様の手法により、*HYP2-HYP4* を個別に破壊し、 $\Delta hyp2-\Delta hyp4$  株を作出した。

二重、三重、および四重破壊株: 二重破壊株  $\Delta hyp2\Delta hyp3$  を作製するために、親株である  $\Delta hyp3$  株において *HYP2* 遺伝子をナオセオスリシン耐性遺伝子 (*NAT*) を含む破壊カセットで置換した。*NAT* 遺伝子は、pZMAT1 プラスミド (Izumitsu *et al.*, 2009) から PCR で増幅した。三重破壊株  $\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$  を作製するために、二重破壊株  $\Delta hyp2\Delta hyp3$  における *HYP4* 遺伝子をピアラホス耐性遺伝子 (*BAR*) を含む破壊カセットで置換した。*BAR* 遺伝子カセットは、pCB1546 プラスミド (Sweigard *et al.*, 1997) を用いて PCR で増幅した。四重破壊株  $\Delta hyp1\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$  を作製するために、三重破壊株における *HYP1* 遺伝子をハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (*HPH*) を含むカセットで置換した。*HPH* カセットは、pCB1004 プラスミド (Carroll *et al.*, 1994) から PCR で増幅した。

### ストレス試験

CMAに、0.05% SDS, 0.015% 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), または25µg/mLのカルコフルオロホワイト (CFW; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) をそれぞれ添加した。それぞれの菌株は25°Cで7日間、各種培地上で培養し、コロニーの直径を測定した。菌糸成長の抑制を定量化するために、無処理コントロールと比較して成長の減少率(%)を算出した。

### 病原性試験

トウモロコシ (*Zea mays* cv. Takanestar) は、25°Cで1ヵ月間栽培した。回収した葉を、プラスチックケースの上に敷いた湿らせたペーパータオルの上に固定した。各菌株の分生子は、野菜ジュース培地上で7日間培養したコロニーから回収した。分生子懸濁液 (5.0×10<sup>5</sup> 個/mL) には0.01%のTween-20を添加し、葉の表面に20µLずつ滴下した。その後、25°Cの暗所で3日間培養した。葉に形成された病斑の長径を測定した。

### 交配試験

*B. maydis* は、偽子嚢殻と呼ばれる特徴的な有性生殖器官を形成する。通常、野生型株では黒色を呈し、アルビノ株では淡黄褐色になる。任意の菌株が偽子嚢殻を形成する能力は、交配試験にアルビノ株を用いることで評価できる。交配試験はTanaka *et al.* (1991) に従って実施した。乾燥させたトウモロコシの葉をSach's培地上に置き、それぞれの破壊株 (*MAT1-2*) とアルビノ株 (*MAT1-1*) をトウモロコシの葉をはさんで、対峙するように接種し、25°Cの暗所で30日間培養した。形成された黒色および淡黄褐色の偽子嚢殻をそれぞれ回収し、スライドガラス上に滴下した10%グリセロール内でそれらを解剖し、顕微鏡 (Leica DML) 下で偽子嚢殻内の子嚢および子嚢胞子を観察した。

### *A. nidulans* のハイドロフォビン遺伝子破壊株および相補株の作出

プラスミド構築のためのPCRは、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いて実施した。すべてのPCRによる確認は、Takara Ex Premier DNAポリメラーゼ (タカラバイオ) を使用した。DNA断片の融合には、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。菌類の形質転換は、Yoshimi *et al.* (2013) に記載された方法に従って実施した。

*A. nidulans* のクラスIハイドロフォビンをコードする遺伝子 *dewA* の破壊カセットを構築するために、この遺伝子の上流および下流領域を、ゲノムDNAを用いて

PCRで増幅した。選択マーカーとして使用した *A. oryzae* 由来の *argB* 遺伝子は、pAORBプラスミドからPCRで増幅した (Furukawa *et al.*, 2002)。これら3つの増幅産物は、*Bam*HIで直鎖化したpUC19プラスミドに融合した。得られたプラスミドから、*dewA* 遺伝子破壊カセットを増幅し、エタノール沈殿により精製した。その後プロトプラスト-PEG法により、ABPU1 ( $\Delta$ *ligD*) 株のプロトプラストに導入した。形質転換により得られた破壊候補株は、アルギニンを含まない選択CDA上に接種し、培養した。最後に、*dewA* 遺伝子が *argB* 遺伝子に置き換わっているかどうかをPCRにより確認した。

*dewA* および *HYP1* 遺伝子を用いた相補実験のために、 $\Delta$ *dewA* 株に対して野生型 *dewA* 遺伝子を再導入するプラスミド、および *HYP1* 遺伝子を導入するためのプラスミドを構築した。

まず、pUC-pyrGプラスミドを作製するために、*A. nidulans* の *pyrG* 遺伝子全体 (推定プロモーター領域を含む) をPCRで増幅した後、*Bam*HIで線状化したpUC19ベクターに融合した。

次に、*dewA* 相補プラスミドを作製するために、プロモーターとORFを含む *dewA* 遺伝子全体をPCRで増幅し、*Sma*Iで線状化したpUC-pyrGプラスミドに融合した。

*HYP1* 相補プラスミドを作製するために、開始コドンから3'非翻訳領域を含む *HYP1* 遺伝子を、*B. maydis* のゲノムDNAからPCRで増幅した。また、*dewA* ORFの上流約1000bpの推定プロモーター領域を、PCRで増幅した。これら2つのPCR断片を *Sma*Iで直鎖化したpUC19-pyrGプラスミドに融合した。

*dewA*<sup>comp</sup> 株および *HYP1*<sup>comp</sup> 株を作製するために、それぞれの相補プラスミドをプロトプラスト-PEG法で  $\Delta$ *dewA* 株に導入した。得られた候補株は、アルギニン、ウリジン、ウラシルを含まない選択CDA上で培養した。プラスミドの導入の有無はPCRにより確認した。

### 疎水性試験

*B. maydis* の野生型株および全てのハイドロフォビン遺伝子破壊株のコロニーを、CMA上で25°C、7日間培養した。コロニーの縁から1cmの位置を直径1cmのコルクボーラーで打ち抜き、0.2% SDSおよび50mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む溶液10µLを菌糸ディスク上に滴下した。これらの液滴の変化を記録するために、10分ごとに30分間、写真撮影した。

また、*A. nidulans* のCNT株、 $\Delta$ *dewA* 株、*dewA*<sup>comp</sup> 株、*HYP1*<sup>comp</sup> 株を、CDA上で37°C、4日間培養した。それぞれの株の疎水性は、上記と同様の方法で評価し、1分ごとに3分間写真撮影した。

親水性コロニー形成株のスクリーニングと候補遺伝子の破壊

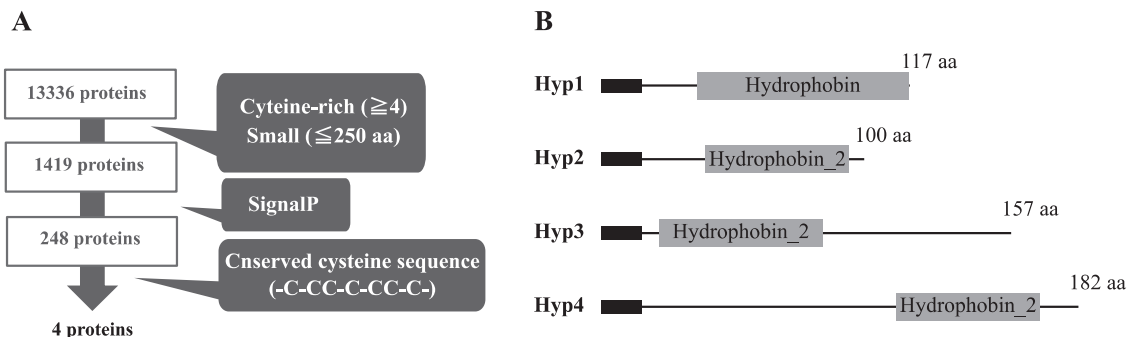
*B. maydis*を突然変異誘引剤として4-Nitroquinoline 1-Oxide (NQO)により処理し、その結果得られた突然変異集団の中で顕著な親水性コロニーを形成するD86株を見出した。交配試験では、D86株に対してMASHIKI2-2株を掛け合わせ、得られた子孫株の表現型を解析した。交配試験により得られたD86株の子孫株のうち、親水性コロニー変異型の株から2株、疎水性コロニー型の株から1株を選択し、これら計3株についてゲノムDNAを抽出した。抽出にはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用い、抽出DNAをマクロジェン・ジャパン (Tokyo, Japan)に送付して、次世代シーケンサーNovaSeq6000 (Illumina, San Diego, USA)による解析を委託した。得られたショートリード配列 (100 bp paired-end)はFastQC (ver. 0.10.1)によるクオリティチェックを行い、Cutadapt (ver.1.1) (Martin, 2011)によってアダプター配列を除去した。得られたショートリード配列は、Burrows-Wheeler Aligner (BWA ver. 0.7.12, Li & Durbin, 2009)を用いて*B. maydis* C5株のゲノムコンティグに対してマッピングした。さらにSAMtools/BCFtools (ver. 0.1.19, Li *et al.*, 2009)を用いて*B. maydis* C5株と供試菌株との間の一塩基多型 (SNP)を探索した。続いて、HITO7711株とMASHIKI2-2株由来のSNPを除去し、供試3株のSNPサイトデータをそれぞれ取得した。さらに、親水性コロニー型の2株に共通するSNPのうち、疎水性コロニー型のSNPに重複しないSNPサイトを抽出した。抽出したSNPがORF上に存在するか否かを*B. maydis*のC5株のデータベースv3.0 ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5\\_4m/CocheC5\\_4m.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5_4m/CocheC5_4m.home.html))を用いて評価し、ORF上にSNPを含んでいた原因遺伝子NPS4を見出した。

NPS4 遺伝子破壊株 ( $\Delta nps4$ )は以下の手順で作出した。*B. maydis* HITO7711株のゲノムDNAは、Izumitsu *et al.* (2012)による方法に従って抽出した。NPS4 遺伝子のORF上流領域および下流領域は、ゲノムDNAからPCRで増幅した。NPTIIカセットは、pZGenIプラスミドからPCRで増幅した (Sumita *et al.*, 2017)。これら3つの増幅産物は、fusion-PCRによって融合した。得られたカセットをエタノール沈殿で精製し、NPS4 遺伝子の破壊に使用した。形質転換は、Izumitsu *et al.* (2009)に記載された方法に基づいたプロトプラスト-PEG法で行った。NPS4 遺伝子が破壊カセットにより置換されたかどうかは、PCRによって確認した。

結 果

*B. maydis*における4つのハイドロフォビンの同定

JGIのウェブサイトに掲載されている*C. heterostrophus* C5株のタンパク質データを検索することで、シグナルペプチドおよびハイドロフォビンに特徴的なシステインパターンを持つ4つの候補タンパク質を同定した (Fig. 1A)。Hyp1は全長117アミノ酸、Hyp2は全長100アミノ酸、Hyp3は全長157アミノ酸およびHyp4は全長182アミノ酸であった。いずれのハイドロフォビン遺伝子も2つのエキソンを有していた。Hyp1の疎水性プロファイルは*P. oryzae*のクラスIハイドロフォビンMpg1に類似しており、Hyp2のプロファイルは*P. oryzae*のクラスIIハイドロフォビンMhp1に類似していた。Hyp3およびHyp4のプロファイルも、一部の領域を除きMhp1に類似していた。Hyp3には、第8番目のシステインの後に71アミノ酸からなるユニークな配列が存在し、その中に第9番目のシステインが含まれていた。Hyp4には、シグナルペプチドと最初のシステイン



**Fig. 1** Identification of hydrophobins in *B. maydis*. (A) Strategy to search for hydrophobin in the total protein data of this fungus. (B) Schematic illustration of *B. maydis* hydrophobin proteins. Interproscan was used for the domain search. Filled black squares indicate signal peptides. Filled grey squares showed Hydrophobin (IPR001338) and Hydrophobin\_2 (IPR010636), respectively.

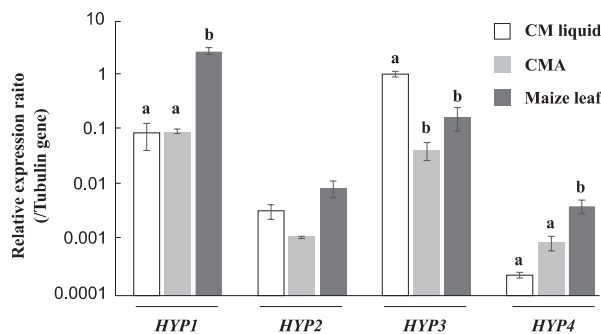
の間が90アミノ酸あり, その約半分がグリシンで構成されていた. InterProScanによる検索の結果, Hyp1はClass I Hydrophobin (InterPro IRR001338)に属しており, Hyp2-Hyp4はClass II Hydrophobin (InterPro IRR010636)に分類された (Fig.1B). 上記の結果から, 本菌は一つのクラスIおよび三つのクラスIIハイドロフォビンを有していることが明らかになった.

#### ハイドロフォビンをコードする四つの遺伝子の発現

液体培地, 固体培地, またはトウモロコシ葉上で培養した *B. maydis* の菌糸体では, すべてのハイドロフォビン遺伝子が発現していたが, その発現レベルには差が見られた. *HYP1* および *HYP3* の転写レベルは, *HYP2* および *HYP4* よりも高かった (Fig.2). この結果は本菌が主に Hyp1 と Hyp3 を利用している可能性を示唆している. *HYP1* のトウモロコシ葉中および *HYP3* の液体培養中での転写レベルは, 内部標準遺伝子である  $\beta$  チューブリンと同程度を示した (Fig.2). *HYP4* の転写レベルはトウモロコシ葉中で最も高かった一方, *HYP2* の転写レベルは三つの条件間で有意な差は認められなかった (Fig.2). このことから, *HYP2* を除くすべてのハイドロフォビン遺伝子の発現レベルが培養条件によって有意に異なることが明らかになり, それぞれのハイドロフォビンが異なる条件下で使い分けられている可能性が示唆された.

#### ハイドロフォビン遺伝子の四重破壊株の表現型

*B. maydis* の各ハイドロフォビン遺伝子の単一破壊株 ( $\Delta hyp1$ ,  $\Delta hyp2$ ,  $\Delta hyp3$  および  $\Delta hyp4$ ), クラスIIハイドロフォビン欠失株 ( $\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$ ) および4つすべての



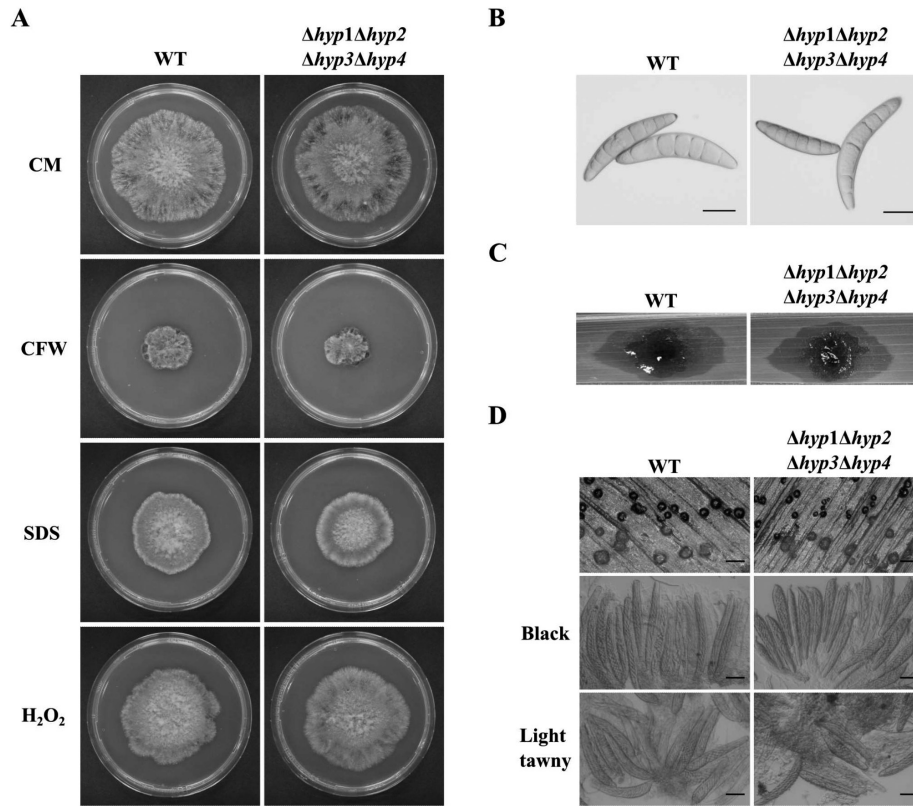
**Fig. 2** Transcript levels of *B. maydis* hydrophobin genes. Hyphae were cultured for 3 days in CM liquid, on cellophane membranes on CMA, or on the leaves of host plants (maize). RNA was extracted and used for qRT-PCR. Error bars, standard error ( $n=3$ ). Different letters within each gene indicate significant differences (Tukey's test,  $P<0.05$ ).

ハイドロフォビンを欠失した株 ( $\Delta hyp1\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$ ) を作出した. 次に, 四重破壊株をCMA上に接種し, 25℃で7日間培養した. コロニー生育は, 野生株と破壊株の間で有意な差は認められなかった (Fig.3A). また, 四重破壊株を, ストレス誘導化合物 (CFW, NaOH, または SDS) を含んだCMA上で培養した. その結果, 各培地におけるコロニー生育の減少率について, 四重破壊株と野生型株との間に有意な差は認められなかった (Fig.3A). これらの結果は, *B. maydis* のハイドロフォビンがコロニー生育および上記のタイプのストレス耐性に寄与していないことを示している. 野菜ジュース培地で7日間培養した四重破壊株のコロニーから分生子を回収し, その形態を観察した. 本菌の分生子は紡錘形で, 多数の隔壁によって区切られた細胞から構成されている. 四重破壊株と野生型株の間で分生子の形態に顕著な違いは見られなかった (Fig.3B). これらの結果は, 本菌においてハイドロフォビンの欠失が分生子形成に影響を与えないことを示している. *B. maydis* のハイドロフォビンが病原性に関与しているか否かを調べるため, トウモロコシの葉を用いて病原性試験を行った. 四重破壊株および野生型株の間で病斑の大きさに有意な差は認められなかった (Fig.3C). これらの結果は, ハイドロフォビンの欠失が *B. maydis* の病原性に影響を与えないことを示している. 次に, 交配試験を行ったところ, 野生型株と *alb3* 株の交配では, 両菌株の接触線に沿って黒色と淡い黄褐色の偽子嚢果が形成された (Fig.3D). 四重破壊株と *alb3* 株の交配においても, 黒色および淡い黄褐色の偽子嚢果が形成された (Fig.3D). この結果は, ハイドロフォビンの欠失は雌性器官の形成に影響しないことを示している. ハイドロフォビンが子嚢や子嚢胞子の発達に関与しているかどうかを調べるために, 両色の偽子嚢果を回収し, 子嚢内を観察した. アルビノ株とのすべての交配では, 両色の偽子嚢果内に子嚢胞子を含む子嚢の形成を確認できた (Fig.3D). これらの結果から, *B. maydis* のハイドロフォビンが有性生殖には必須でないことが明らかになった. 上記の実験は  $\Delta hyp1$ ,  $\Delta hyp2$ ,  $\Delta hyp3$ ,  $\Delta hyp4$  および  $\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$  株を用いても行ったが, すべての破壊株の表現型は野生株と同様であった (data not shown).

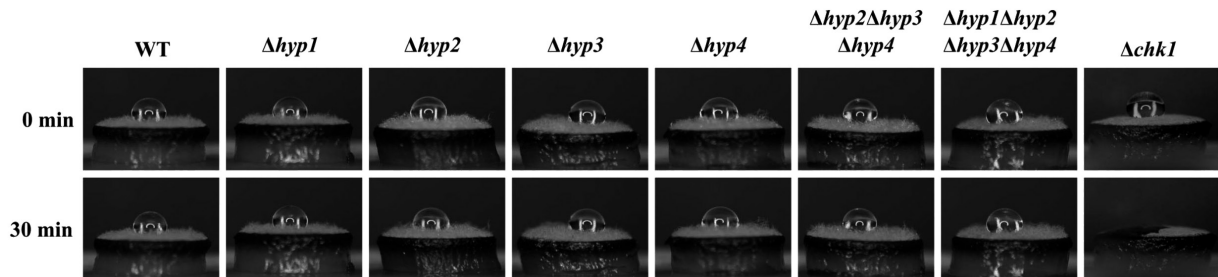
#### ハイドロフォビン遺伝子破壊株のコロニー疎水性

*B. maydis* のコロニーの疎水性にハイドロフォビンが関与しているかどうかを調べるために, 0.2% SDS および 50mM EDTA を含む溶液を菌糸体ディスクに滴下した. MAP キナーゼをコードする *CHK1* 遺伝子の破壊株である  $\Delta chk1$  株は, 野生型株に比べてコロニーの疎水性が著しく低いため, ポジティブコントロールとして利用





**Fig. 3** Phenotype of the quadruple disruptant ( $\Delta hyp1\Delta hyp2\Delta hyp3\Delta hyp4$ ). (A) Sensitivity of the wild-type (WT) strain and the quadruple disruptant to stress agents. All strains were incubated on CMA supplemented with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Calcofluor White (CFW), 0.05 % SDS, or 0.015 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 7 days. (B) Conidial morphology of the wild-type strain and the quadruple disruptant. Each strain was cultured on VJA for 7 days. Conidia were harvested from three colonies of each strain. Bars: 20  $\mu\text{m}$ . (C) Pathogenicity assay on maize leaves. Photos were taken 3 days after inoculation on maize leaves. (D) Sexual reproduction of the quadruple disruptant. The wild-type strain and the quadruple disruptant were crossed with an albino strain. Black and light tawny pseudothecia were harvested 30 days after the cross and dissected to observe asci and ascospores. Bars: 1 mm (top), 50  $\mu\text{m}$  (middle and bottom).



**Fig. 4** Hydrophobicity of the wild-type (WT) strain and disruptants of hydrophobin genes. A 10- $\mu\text{L}$  droplet of solution containing 0.2 % sodium dodecyl sulfate and 50mM ethylenediaminetetraacetic acid was placed on the mycelial disk of each strain and observed at the indicated time points.

した (Degani *et al.*, 2013).  $\Delta chk1$  株の菌糸円盤上の液滴は 30 分後には完全に消失した (Fig.4)。野生型株上の液滴は 30 分経過しても変化を示さなかった (Fig.4)。また、四重破壊株を含むすべての破壊株でも、30 分経

過後の液滴に変化は見られなかった (Fig.4)。これらの結果は、*B. maydis* のハイドロフォビンがコロニーの疎水性に必須でないことを示した。

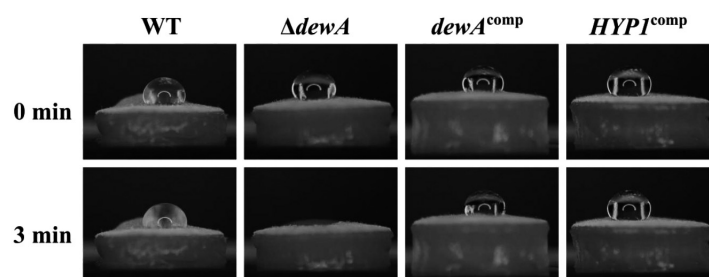
### HYP1 遺伝子導入による *A. nidulans* $\Delta dewA$ 株の相補実験

*B. maydis* がハイドロフォビンを自身の疎水性因子として利用していない場合、本菌のハイドロフォビンは菌体に疎水性を付与する能力を失っているのではないかとの仮説を立てた。この仮説を検証するために、*B. maydis* の Hyp1 が *A. nidulans* のハイドロフォビン欠損変異株における疎水性を回復できるかどうかを調査した。*A. nidulans* におけるクラス I ハイドロフォビンをコードする *dewA* 遺伝子破壊株は、親水性のコロニーを示す (Grünbacher *et al.*, 2014)。そこでまず、この *dewA* 遺伝子破壊株を作出した。CNT 株上の液滴は3分経過しても変化がなかったが、 $\Delta dewA$  株上の液滴は3分で完全に消失することが観察された (Fig.5)。この結果は、既報研究の結果と矛盾がなかった (Stringer & Timberlake, 1995; Grünbacher *et al.*, 2014)。次に、野生型 *dewA* 遺伝子を  $\Delta dewA$  株に再導入して *dewA*<sup>comp</sup> 株を

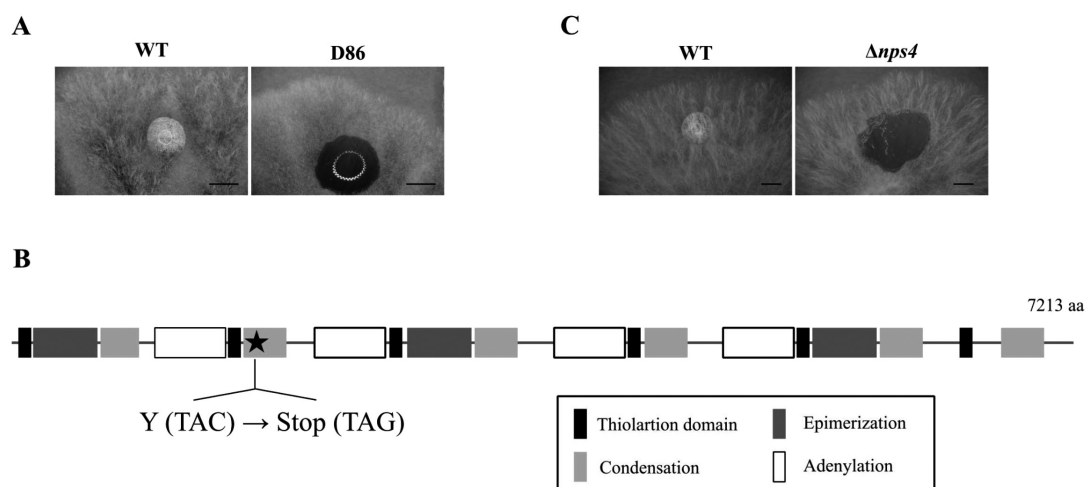
作出した。*dewA*<sup>comp</sup> 株は CNT 株と同様の疎水性を示した (Fig.5)。さらに、*B. maydis* の *HYP1* 遺伝子を *dewA* プロモーターの制御下で  $\Delta dewA$  株に導入した *HYP1*<sup>comp</sup> 株も作製した。*HYP1*<sup>comp</sup> 株も *dewA*<sup>comp</sup> 株と同様にコロニーの疎水性を回復した (Fig.5)。この結果から、*B. maydis* の Hyp1 がコロニーに疎水性を付与する能力を失っていないことが明らかになった。

### D86 株の親水性コロニーに関与する原因遺伝子の同定

本菌における新たな疎水性関連遺伝子を探索するため、変異誘導剤処理による本菌の変異株集団の作成を行った。その変異集団の中から見出され D86 株は野生株とは異なり親水性コロニーを形成する (Fig.6A)。この表現型の原因突然変異を同定するために、交配により得られた子孫株の分離から、変異の原因が単一の遺伝子によるか否かを調べた。まず、野生株 MASHIKI2-2 株



**Fig. 5** Hydrophobicity of the wild-type (WT),  $\Delta dewA$ , *dewA*<sup>comp</sup>, and *HYP1*<sup>comp</sup> strains of *A. nidulans*. A 10- $\mu$ L droplet of solution containing 0.2% sodium dodecyl sulfate and 50mM ethylenediaminetetraacetic acid was placed on the mycelial disk of each strain and observed at the indicated time points.



**Fig. 6** Characterization of *NPS4* gene in *B. maydis*. (A) Hydrophobicity of the wild-type (WT) and D86 strains. A 10- $\mu$ L droplet of solution containing 0.2% sodium dodecyl sulfate and 50mM ethylenediaminetetraacetic acid was placed on the 3 days-old colony of each strain and observed 1 minute after it was dropped. (B) Schematic illustration of *NPS4* gene with mutation. (C) Hydrophobicity of the wild-type and  $\Delta nps4$  strains. Hydrophobicity assay was performed using the same technique as in (A).

と D86 株の交配試験により 100 株の子孫株を取得した。子孫株の形成したコロニーの表現型を確認した結果、41 株 (カイ二乗検定:  $\chi^2=0 < \chi^2(1, 0.05)=3.24$ ) の子孫株が親水性コロニーを形成した。以上の結果から、D86 株の親水性コロニー形成の表現型は 1 遺伝子の変異に由来していることが示唆された。

次に、比較ゲノム解析により原因遺伝子の同定を試みた。D86 株と野生株 MASHIKI2-2 株との交配により得られた子孫株のうち親水性コロニーを形成する 2 株と疎水性コロニーを形成する 1 株を選定し、計 3 株からゲノム DNA を抽出した。これら 3 株についてゲノム DNA の塩基配列を次世代シーケンサーにて決定した。BWA プログラムと SAMtools/BCFtools を用いて、*B. maydis* C5 株と DNA 抽出を行った株間との SNP サイトを探索し、それに続いて野生株 HITO7711 株と MASHIKI2-2 株由来の SNP サイトを除去した。抽出した SNP サイトから親水性コロニー型の 2 株に共通し、疎水性コロニー型の 1 株には含まれない SNP サイトを抽出し、3722 ヶ所の SNP サイトを得た。その中からトランスポゾン上の SNP を除去し、CDS 上に変異が生じておりかつシノニマスの変異ではない SNP を JGI における *B. maydis* C5 株のデータベースを用いて探索した結果、最終的に 122 ヶ所の SNP サイトを候補遺伝子変異として絞り込んだ。この候補遺伝子群の中には非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) をコードする *NPS4* 遺伝子も存在していた。本菌におけるこの遺伝子の欠損はコロニーの疎水性を著しく低下させることが報告されている (Turgeon *et al.*, 2008)。D86 株の親水性コロニーを形成する子孫株 10 株における *NPS4* 遺伝子のシーケンスの結果、本遺伝子の変異 (C → G) がこの表現型と連鎖していることが明らかになった (Fig. 6B)。また、この塩基置換により Nps4 (全 7213 アミノ酸) 内の 1660 番目のアミノ酸がトリプトファンから終止コドンへ変化することが推定された。さらに、野生株 HITO771 を親株とした *NPS4* 遺伝子の破壊株を作出し、表現型解析を行った結果、D86 株と同様に顕著な親水性コロニーを示すことが明らかになった (Fig. 6C)。この結果は、*B. maydis* は自身の疎水性をハイドロフォビンではなく Nps4 が生産する化合物に依存している可能性を示している。

## 考 察

これまでの子囊菌や担子菌に関する研究から、多くの糸状菌が複数のハイドロフォビンをコードする遺伝子を持っていることが示されている。これらの菌類、およびその他の菌類において、ハイドロフォビンは生物学的プロセスに関して多岐にわたる機能を有していることが明

らかになっている。例えば、*P. oryzae* では、ハイドロフォビン Mpg1 および Mhp1 が附着器形成および病原性に関与している (Talbot *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2005)。*Aspergillus fumigatus* の分生子上の RodA は、細胞壁成分が宿主の免疫系に認識されるのを遮蔽する (Aimanianda *et al.*, 2009)。*A. oryzae* では、RoIA がクチナーゼ CutL1 と相互作用し、ポリブチレンサクシネートコアジペートの効率的な分解に関与している (Takahashi *et al.*, 2005)。担子菌類の *P. ostreatus* においては、ハイドロフォビンが効率的なリグニン分解および環境ストレス耐性に重要である (Han *et al.*, 2023a, b, 2024)。しかしながら、植物病原菌 *B. maydis* のハイドロフォビンに関する情報は限られていた。本研究では、クラス I ハイドロフォビン (Hyp1) 1 種とクラス II ハイドロフォビン (Hyp2–Hyp4) 3 種を同定した (Fig. 1)。これらのハイドロフォビンのクラスおよび数は、本菌類のハイドロフォビン遺伝子を別の方法で探索した Degani *et al.* (2013) の報告と一致していた。

本研究で我々は、まず 4 つある各ハイドロフォビン遺伝子について、単一遺伝子破壊株を作出し、機能解析を行った。しかし、いずれの破壊株も、コロニー生育、分生子形成、環境ストレス耐性、病原性、および有性生殖のいずれにおいても、野生株と比較して有意な差は認められなかった。複数の遺伝子が存在する場合、単一の遺伝子を破壊しても必ずしも表現型に変化が現れるわけではない。そのため、複数の遺伝子を破壊した株を用いた表現型解析も重要である。例えば、*B. cinerea* では、単一のハイドロフォビン遺伝子破壊株では異常が見られなかったものの、二重および三重破壊株の一部で異常な子囊盤が観察された (Terhem & van Kan, 2014)。また、*F. graminearum* では、ハイドロフォビン遺伝子の単一から五重破壊が作出され、病原性、分生子形成、および二次代謝に影響を与えることが報告されている (Shin *et al.*, 2022)。

本研究では、*B. maydis* におけるハイドロフォビン遺伝子三重および四重破壊株も作出した。しかし、他の菌類に関する報告とは異なり、これらの株の表現型は野生型株や単一破壊株と顕著な変化は観察されなかった (Fig. 3)。したがって、子囊菌類や担子菌類を含む多くの糸状菌とは異なり、*B. maydis* のハイドロフォビンは生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていない可能性が考えられた。

一般に、ハイドロフォビンは細胞外マトリックスに分泌され、菌糸や分生子に疎水性を付与すると考えられている (Wösten, 2001)。*A. nidulans* においては、クラス I ハイドロフォビン DewA または RodA が欠失すると、コロニーの疎水性が顕著に低下する (Grünbacher *et al.*,

2014). また, ハイドロフォビンは *P. oryzae* や *B. cinerea* を含むいくつかの植物病原糸状菌における, コロニーの疎水性に参与している (Talbot *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005; Mosbach *et al.*, 2011). しかし, 本研究においては, 野生型株, 単一破壊株, および四重破壊株の間で, コロニーの疎水性に有意な差は認められなかった (Fig. 4). この結果は, 本菌においてハイドロフォビンがコロニーの疎水性に参与しないことを示している.

*B. maydis* におけるハイドロフォビンの機能をより詳細に調べるために, コロニーの疎水性が低下している *A. nidulans* の  $\Delta dewA$  株に *HYP1* 遺伝子を導入した. 興味深いことに, この株は CNT 株と同等のコロニーの疎水性を示した (Fig. 5). このことは, *Hyp1* がコロニーに疎水性を付与する能力を有していることを示している. この発見は, たとえ同一のハイドロフォビンでも菌種によってその機能が変化することを示唆している.

また, 本菌の変異集団を用いたスクリーニングにより野生株と比較して顕著な濡れ性を示すコロニーを形成する変異株を見出した (Fig. 6A). ゲノム比較により, 濡れ性の表現型と *NPS4* 遺伝子内に存在する変異が連鎖していることを明らかにした (Fig. 6B). また, *NPS4* 遺伝子の破壊株を作出した結果, 顕著な濡れ性の表現型を示した (Fig. 6C). この結果は, Turgeon *et al.*, (2008) の報告と同様であった. 加えて本菌および近縁種 *Bipolaris oryzae* の場合, NRPS の活性化に関係する Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase をコードする遺伝子 *PPT1* の欠損もまたコロニーの顕著な濡れ性を示すことが報告されている (Zainudin *et al.*, 2015). このことから, 本菌におけるコロニーの疎水性は *Nps4* の産物によって担われているもしくはその産物がハイドロフォビンを調節していると考えられていた (Turgeon *et al.*, 2008). 今回の研究結果と先行研究から総合的に判断すると, おそらく前者の可能性が高いと考えられる. この研究の濡れ性試験においてポジティブコントロールとして用いた MAP キナーゼ *Chk1* の欠損株は親水性コロニーを示すので (Degani *et al.*, 2013; Fig. 4), MAP キナーゼ経路の下流には *NPS4* 遺伝子が存在しているのかもしれない. *B. maydis* 以外の糸状菌においても NRPS の産物を表面疎水性に利用している可能性が示されている. *Alternaria brassicicola* では *Nps4* のオルソログである *Nps2* が菌糸の表面疎水性に必須であることが明らかになっている (Kim *et al.*, 2007). *F. graminearum* の *Nps4* ホモログが生産する化合物は *Fusahexin* と呼ばれる環状ペプチドであることが特徴づけられており, その遺伝子の欠損もまた, コロニーを疎水性から親水性へと表現型を変える. しかしながら, *F. graminearum* のハイドロフォビン遺伝子欠損株においてもコロニーが濡れ

性を示すことから, 菌種によって二つの疎水性因子の依存度が異なるかもしれない. つまり, *B. maydis* は自身の疎水性特性をハイドロフォビンではなく *Nps4* が生産する物質に依存している可能性が考えられる.

今回の研究において, *B. maydis* のハイドロフォビン遺伝子の四重破壊株においても, 表現型の変化を検出できなかった. しかし, この菌におけるハイドロフォビンをコードする4つの遺伝子すべてが発現しており, 少なくとも *Hyp1* はハイドロフォビンとしての機能を失っていないことを明らかにした. したがって, これらのハイドロフォビンはこの菌において何らかの機能を持っていると考えられる. これらの機能を明らかにするためには, 本菌のハイドロフォビンの局在解析やタンパク質を回収しその物理的特性についてさらに調査する必要がある. また, 本菌における *Nps4* が合成に関与する化合物およびその化合物がどのように本菌の疎水性に参与しているのか未だ不明である. 化合物の同定および新たな疎水性低下株の作出により本菌の疎水性メカニズムに関する研究に更に取り組んでいきたい. 今回の研究で見出した同一のハイドロフォビンが *B. maydis* と *A. nidulans* という2つの種で異なる機能を持つという事実は, ハイドロフォビンに関する新たな知見となる. コロニーの疎水性メカニズムが異なるこれら2つの菌種におけるハイドロフォビンの発現制御の解析は, ハイドロフォビンの機能の多様化を解明する上で重要な手掛かりとなる. また, *HYP1* 遺伝子で相補された *A. nidulans* 株は, 多様化解析のための有用なツールとなり得るであろう.

## 要 約

ハイドロフォビンは, 糸状菌によって分泌される低分子量の両親媒性タンパク質であり, 菌糸や分生子に疎水性を付与する. さらに, さまざまな生物学的プロセスにも関与していることが報告されている. 本研究では植物病原菌 *B. maydis* におけるハイドロフォビンの生物学的機能について調査した. *B. maydis* のゲノムには4つのハイドロフォビン遺伝子が存在し, それぞれは Class I に属する *Hyp1*, および Class II に属する *Hyp2*, *Hyp3*, *Hyp4* であり, これらすべてが発現していることが明らかになった. 各遺伝子の単独破壊株に加えて, 三重および四重破壊株も作出した. その結果, 菌糸の成長, 分生子形成, ストレス耐性, 病原性, 有性生殖のいずれにおいても, 野生株との間に明確な差異は認められなかった. さらに, すべての破壊株におけるコロニーの疎水性も野生株と同様であった. 一方, *A. nidulans* の  $\Delta dewA$  破壊株ではコロニーの疎水性が著しく低下したが, この株に *HYP1* 遺伝子を導入すると, コントロール株と同程度

までその疎水性は回復した。これらの結果から、*B. maydis* のハイドロフォビンは本菌における生物学的プロセスには大きく関与していないものの、少なくとも Hyp1 はその機能を保持していることが明らかになった。この結果は、ハイドロフォビンの機能が菌種に依存して異なることを改めて示している。また、本菌の変異集団をスクリーニングした結果、顕著な親水性コロニーを示す変異株が見出された。ゲノム比較の解析から、この表現型の原因遺伝子が *NPS4* であることを見出した。この結果は、本菌の疎水性は機能的なハイドロフォビンを有しているのにもかかわらず、*Nps4* によって産生される物質に依存していることを示している。

### 本助成で得られた研究成果の報告

#### 口頭発表

- 1) 吉田裕史, 佐波雅史, 寺内裕貴, 田中千尋, 本田与一, 河内護之, 吉見啓. 2020. *Bipolaris maydis* の表面疎水性異常ミュータントにおける病原性喪失. 令和2年度日本植物病理学会関東部会 (9月28-29日, オンライン)
- 2) 吉田裕史, 佐波雅史, 寺内裕貴, 田中千尋, 本田与一, 河内護之, 吉見啓. 2020. *Bipolaris maydis* の菌糸表面疎水性とハイドロフォビン機能の関連についての検討. 令和2年度日本植物病理学会関西部会 (11月7-8日, オンライン)
- 3) 吉田裕史, 佐波雅史, 寺内裕貴, 田中千尋, 本田与一, 河内護之, 吉見啓. 2020. *Bipolaris maydis* の菌糸表面疎水性に関わる未知機能因子及び制御因子の突然変異体解析. 第8回糸状菌分子生物学研究会若手の会WS (11月13日, オンライン)
- 4) 佐波雅史, 吉田裕史, 吉見啓, 田中千尋. 2021. ゲノム比較解析を用いた *Bipolaris maydis* 表面疎水性変異株の原因遺伝子の同定. 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月11-12日, オンライン)
- 5) 寺内裕貴, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 本田与一, 河内護之. 2022. 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォビン RolA および HypB 破壊株の表現型解析. 日本菌学会第66回大会 (8月20-28日, オンライン)
- 6) 韓浚弦, 河内護之, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 坂本正弘, 本田与一. 2022. 白色腐朽菌ヒラタケの栄養菌糸ハイドロフォビン Vmh3 の機能解析. 日本菌学会第66回大会 (8月20-28日, オンライン開催)
- 7) 韓浚弦, 河内護之, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 坂本正弘, 本田与一. 2022. 白色腐朽菌ヒラタケの栄養菌糸ハイドロフォビン Vmh3 の機能解析. 日本菌学会第66回大会 (8月20-28日, オンライン開催)
- 8) Yoshimi, A., Tsuji, K., Saba, M., Terauchi, Y., Ruiz-Nava, D. C., Kawauchi, M., Honda, Y., & Tanaka, C. 2023. Exploring Factors Conferring Hydrophobicity on Hyphal Surfaces in *Bipolaris maydis*: Rethinking the Role of Hydrophobins as the Primary Factor. Asian Mycological Congress 2023 (Oct. 10-13, Busan, Republic of Korea)
- 9) 韓浚弦, 河内護之, 辻健也, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 本田与一. 2024. 木材分解時に高発現する白色腐朽菌ヒラタケのハイドロフォビン *hydph16* の機能解析. 第74回日本木材学会大会 (3月13-15日, 京都)

#### 原著論文

- 1) Han, J., Kawauchi, M., Schiphof, K., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023a. Features of disruption mutants of genes encoding for hydrophobin Vmh2 and Vmh3 in mycelial formation and resistance to environmental stress in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol. Lett. 370: fnad036.
- 2) Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023b. Physiological function of hydrophobin Vmh3 in lignin degradation by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Lett. Appl. Microbiol. 76: ovad048.
- 3) Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Physiological function of hydrophobin Hydph16 in cell wall formation in agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. Fungal Genet. Biol. 176: 103943.
- 4) Tsuji, K., Yoshida, H., Saba, M., Terauchi, Y., Kawauchi, M., Honda, Y., Tanaka, C. & Yoshimi, A. 2025. Hydrophobin Hyp1 in *Bipolaris maydis* does not contribute to colony hydrophobicity, but its heterologous expression alters colony hydrophobicity in *Aspergillus nidulans*. Front. Fungal Biol., accepted.
- 5) Terauchi, Y., Tsuji, K., Kobayashi, H., Kawauchi, M., Tanaka, C., Honda, Y. & Yoshimi, A. 2025. Hydrophobins RolA and HypB from *Aspergillus oryzae* function on the surface of conidia and aerial hyphae, respectively. (unpublished).

#### その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Tanaka, T., Terauchi, Y., Yoshimi, A. & Abe, K. 2022. *Aspergillus* hydrophobins: Physicochemical properties, biochemical properties, and functions in solid polymer degradation. Microorganisms. 10: 1498

### 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の学生諸氏に感謝の意を表します。

さらに、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究 (B) (吉見啓 22H02238) および特別研究員奨励費 (寺内裕貴 20J01300, 韓浚弦 24KJ1336) の支援にも感謝致します。

### 文 献

- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S. *et al.* 2009. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. Nature 460: 1117-1121.
- Beckerman, J. L. & Ebbole, D. J. 1996. MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. Mol. Plant Microbe Interact. 9: 450-456.
- Carroll, A. M., Sweigard, J. A. & Valent, B. 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. Fungal Genet. Newsl. 41: 135-143.

- Condon, B. J., Leng, Y., Wu, D. *et al.* 2013. Comparative genome structure, secondary metabolite, and effector coding capacity across *Cochliobolus* pathogens. *PLoS Genet.* **9**: e1003233.
- Degani, O., Lev, S. & Ronen, M. 2013. Hydrophobin gene expression in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **83**: 25–34.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T. & Abe, K. 2007. MpkA-dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1497–1510.
- Furukawa, K., Katsuno, Y., Urao, T., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Yamada-Okabe, H., Yamagata, Y., Abe, K. & Nakajima, T. 2002. Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5304–5310.
- Grünbacher, A., Throm, T., Seidel, C. *et al.* 2014. Six hydrophobins are involved in hydrophobin rodlet formation in *Aspergillus nidulans* and contribute to hydrophobicity of the spore surface. *PLoS One* **9**: e94546.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J. *et al.* 2007. The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1003–1014.
- Han, J., Kawauchi, M., Schiphof, K., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023a. Features of disruption mutants of genes encoding for hydrophobin Vmh2 and Vmh3 in mycelial formation and resistance to environmental stress in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **370**: fnad036.
- Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Physiological function of hydrophobin Hydph16 in cell wall formation in agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **176**: 103943.
- Han, J., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023b. Physiological function of hydrophobin Vmh3 in lignin degradation by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **76**: ovad048.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T. *et al.* 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* **53**: 396–401.
- Izumitsu, K., Yoshimi, A., Kubo, D., Morita, A., Saitoh, Y. & Tanaka, C. 2009. The MAPKK kinase *ChSte11* regulates sexual/asexual development, melanization, pathogenicity, and adaptation to oxidative stress in *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* **55**: 439–448.
- Kim, K.H., Cho, Y., Cramer, R.A. Jr. & Lawrence, C.B. 2007. Functional analysis of the *Alternaria brassicicola* non-ribosomal peptide synthetase gene *AbNPS2* reveals a role in conidial cell wall construction. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 23–39.
- Kim, S., Ahn, I.P., Rho, H.S. & Lee, Y.H. 2005. *MHP1*, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol. Microbiol.* **57**: 1224–1237.
- Klimes, A., Amyotte, S.G., Grant, S., Kang, S. & Dobinson, K.F. 2008. Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: Regulation and differential expression of the hydrophobin gene *VDHI*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 1525–1532.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105–132.
- Li, H., & Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics* **25**: 1754–1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A. *et al.* 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**: 2078–2079.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Jour.* **17**: 10–12.
- Miyazawa, K., Yamashita, T., Takeuchi, A. *et al.* 2021. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored alpha-amylase encoded by *amyD* contributes to a decrease in the molecular mass of cell wall alpha-1,3-glucan in *Aspergillus nidulans*. *Front. Fungal Biol.* **2**: 821946.
- Mosbach, A., Leisen, T., Mendgen, K. & Hahn, M. 2011. Lack of evidence for a role of hydrophobins in conferring surface hydrophobicity to conidia and hyphae of *Botrytis cinerea*. *BMC Microbiol.* **11**: 10.
- Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B. *et al.* 2012. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen *Dothideomycetes* fungi. *PLoS Pathog.* **8**: e1003037.
- Pham, C.L., Rey, A., Lo, V., Soules, M., Ren, Q., Meisl, G., Tuomas, P. J., Knowles, Kwan, A. H. & Sunde, M. 2016. Self-assembly of MPG1, a hydrophobin protein from the rice blast fungus that forms functional amyloid coatings, occurs by a surface-driven mechanism. *Sci. Rep.* **6**: 25288.
- Quarantin, A., Haderler, B., Kroger, C., Schafer, W., Favaron, F., Sella, L. & Martínez-Rocha, A. L. 2019. Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. *Front. Microbiol.* **10**: 751.
- Sehuren, F. H. J. & Wessels, J. G. H. 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* **90**, 199–205.
- Shin, Y. K., Kim, D. W., Lee, S. W., Lee, M. J., Baek, S. G., Lee, T. & Yun, S. H. 2022. Functional roles of all five putative hydrophobin genes in growth, development, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **160**: 103683.
- Stringer, M. A. & Timberlake, W. E. 1995. *dewaA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* **16**: 33–44.
- Sumita, T., Izumitsu, K. & Tanaka, C. 2017. Characterization of the autophagy-related gene *BmATG8* in *Bipolaris maydis*. *Fungal Biol.* **121**: 785–797.
- Sweigard, J. A., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L. & Valent, B. 1997. A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genet. Newsl.* **44**: 52–53.
- Takahashi, T., Maeda, H., Yoneda, S., Ohtaki, S., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T. & Abe, K. 2005. The fungal hydrophobin RoIA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. *Mol. Microbiol.* **57**: 1780–1796.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J. & Hamer, J. E. 1993. Identification and

- characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**: 1575-1590.
- Talbot, N. J., Kershaw, M. J., Wakley, G. E., De Vries, O., Wessels, J. & Hamer, J. E. 1996. *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**: 985-999.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 3022-3027.
- Tanaka, C., Kubo, Y. & Tsuda, M. 1991. Genetic analysis and characterization of *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* **95**: 49-56.
- Terhem, R.B. & van Kan, J.A. 2014. Functional analysis of hydrophobin genes in sexual development of *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* **71**: 42-51.
- Turgeon, B.G., Oide, S. & Bushley, K. 2008. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants. *Mycol. Res.* **112**: 200-206.
- Wessels, J. G. H., de Vries, O. M. H., Ásgeirsdóttir, S. A. & Schuren, F. H. J. 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* **3**: 793-799.
- Whiteford, J. R. & Spanu, P. D. 2001. The hydrophobin HCf-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal Genet. Biol.* **32**: 159-168.
- Wösten, H. A. B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 625-646.
- Yoshida, H. & Tanaka, C. 2019. Monitoring of in planta gene expression for xylan degradation and assimilation in the maize pathogen *Bipolaris maydis*. *Mycoscience* **60**: 116-124.
- Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A. *et al.* 2013. Functional analysis of the alpha-1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *AgsB* is the major alpha-1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One* **8**: e54893.
- Zainudin, N. A. I. M., Condon, B., De Bruyne, L., Van Poucke, C., Bi, Q., Li, W., Höfte, M. & Turgeon, B. G. 2015. Virulence, host-selective toxin production, and development of three *Cochliobolus* phytopathogens lacking the Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase Ppt1. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**: 1130-1141.
- Zhang, X., Zhao, L., Liu, S. *et al.* 2022. Identification and functional analysis of a novel hydrophobic protein VdHP1 from *Verticillium dahliae*. *Microbiol. Spectr.* **10**: e02478-21.

## 糸状菌の基質及び環境認識に関わる因子の探索とその機能解析

辻 健也, 河内 護之, 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

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

## Identification and Functional Analysis of Factors Involved in Substrate and Environmental Sensing in Filamentous Fungi

Kenya Tsuji, Moriyuki Kawauchi, Akira Yoshimi

Laboratory of Environmental Interface Technology of Filamentous Fungi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Kitashirakawaoiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

In phytopathogenic fungi, adhesion to plant substrates is followed by environmental sensing and the initiation of degradation processes. The mechanisms underlying substrate surface recognition are considered critical components of the pathogen's survival strategy. For instance, certain species of phytopathogenic fungi, such as *Bipolaris maydis*, develop specialized infection structures known as appressoria during infection that penetrate the host. Appressorium formation is triggered by the recognition of surface hydrophobicity and host-derived compounds. The  $\Delta\text{opy2}$  strain of *B. maydis* remains pathogenic but is deficient in recognizing hydrophobic surfaces and does not efficiently form appressoria on such surfaces. The addition of host-derived pectin induces appressorium formation in  $\Delta\text{opy2}$ , but the underlying mechanism remains unclear. In this study, we isolated a mutant strain, D296, derived by mutating the  $\Delta\text{opy2}$  strain, which fails to form appressoria in response to pectin and had straight hyphae with fewer branches than the  $\Delta\text{opy2}$  strain following spore germination. Genetic crosses involving the wild-type strain, D296, and their progeny suggested that these phenotypes are controlled by a single gene. Whole-genome comparisons among wild-type and mutant progenies revealed a single-nucleotide polymorphism in a gene encoding an  $\alpha/\beta$ -hydrolase that was associated with the observed traits. Introduction of the wild-type gene into the D296 strain restored both appressorium formation and hyphal morphology; we named this gene *LAG1*. In *lag1*-disrupted strains, elongated hyphae were similar to those in the D296 strain, appressorium formation on hydrophobic surfaces was significantly reduced, and pectin-induced appressorium formation was abolished. These results demonstrate that *LAG1* plays a key role in appressorium formation in this fungus.

Key words: *Bipolaris maydis*,  $\alpha/\beta$  hydrolase, appressorium formation, hyphal elongation, pectin

### 緒 言

多くの作物病害は植物病原性の糸状菌によって引き起こされることが知られており、その感染はまず菌の胞子が植物基質に接着することから始まる。植物基質に接着した菌は、その環境を認識し、侵入・分解のプロセスに移行する。この過程において基質表面の認識・侵入に関わる細胞システムは生存戦略上極めて重要であると言える。例えば、本課題で取扱ったトウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) を含めた多くの植物病原糸状菌は“付着器”と呼ばれる特殊な細胞器官を介して宿主植

---

E-mail: yoshimi.akira.8c@kyoto-u.ac.jp

共同研究者：安本 俊作 (京都大学大学院農学研究科).

佐波 雅史 (京都大学大学院農学研究科).

徳岡 柚月 (京都大学大学院農学研究科).

Ruiz-Nava, Diana, Cecilia

(京都大学大学院農学研究科).

本田 与一 (京都大学大学院農学研究科).

田中 千尋 (京都大学大学院地球環境学堂).

泉津 弘佑 (滋賀県立大学環境科学部).



物に侵入する。このことから付着器は、植物病原菌の感染戦略の中でも最も重要な細胞器の一つとされる。

*Bipolaris maydis* では付着器形成に関わる細胞内シグナル伝達系の因子の一つとして MAP キナーゼ (MAPK) である CHK1 がよく知られている (Lev *et al.*, 1999)。CHK1 型 MAPK は本菌以外にも、イネいもち病菌 (Park *et al.*, 2006)、灰色かび病菌 (Zheng *et al.*, 2000) など、多くの植物病原菌において付着器形成に関与している。CHK1 自体やこの MAPK カスケードの因子を欠損すると、付着器形成能が完全に失われる。例えば、CHK1 の上流因子である STE7 (MAPKK) や STE11 (MAPKKK)、それに結合するアダプタータンパク質である STE50 を欠損すると、あらゆる基質表面において付着器は形成できなくなる (Izumitsu *et al.*, 2009; Kitade *et al.*, 2015; Sumita *et al.*, 2019)。一方、STE50 と相互作用する OPY2 について、その欠損は疎水面上での付着器形成能を失うが、OPY2 欠損株でも宿主葉上では付着器を形成し、病斑も形成される (Yoshida *et al.*, 2025)。

一般に、植物病原菌の付着器形成には宿主の認識が不可欠であり、宿主の認識によって生じたシグナルが MAPK 経路を活性化して付着器形成が誘導されると考えられている。宿主の認識は、1) 疎水面の認識、2) 宿主由来化学物質の認識の2つが寄与する (DeZwaan *et al.*, 1999; Kamakura *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2013)。このうち OPY2 は、1) 疎水面の認識に関わっており、疎水面認識に関わるセンサータンパク質であるか、それに深く関わる因子であることが推察されている (Elion *et al.*, 1990; Truckses *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2010)。さらに、OPY2 以外にも MSB2 や SHO1 と呼ばれる因子がこの疎水面認識に関わることも明らかにされている (Yoshida *et al.*, 2025; Izumitsu *et al.*, unpublished)。すなわち、OPY2 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ opy2 株)、MSB2 遺伝子破壊株、SHO1 遺伝子破壊株はいずれも、プラスチック (疎水面) 上においては付着器を形成できないが、宿主であるトウモロコシ葉上では正常に付着器を形成する。また、 $\Delta$ opy2 株などの疎水面の認識能を欠く株でも、人工基質上でペクチンを外部添加すると付着器形成が誘導される。このことから、宿主葉上と人工基質上での付着器形成能の違いを生じさせる宿主由来化学物質としてペクチンの関与が示唆されている (Yoshida *et al.*, 2025)。しかしながら、これまでにペクチンを認識するメカニズムについては何も明らかにされていない。

本研究では、このメカニズムを解明するため、 $\Delta$ opy2 株を親株として突然変異原を処理し、外部からペクチンを添加しても付着器形成が誘導されない変異株 (D296 株) を獲得した。D296 株では、ペクチンが付着器形成を誘導するメカニズムに関わる遺伝子に変異が生じてい

ることが推察されるため、順遺伝学的なアプローチと比較ゲノム解析により原因となる遺伝子変異を同定し、同定した責任遺伝子 *LAG1* について、分子遺伝学的アプローチによりその機能解析を試みた。

## 実験方法

順遺伝学的アプローチと比較ゲノムによる *LAG1* 遺伝子の同定

本研究では、*B. maydis* の野生株として HITO7711 株 (*MAT1*-2) を用いた (Tanaka *et al.*, 1991)。また、交配試験には MASHIKI2-2 株 (*MAT1*-1) を用いた (Tanaka *et al.*, 1991)。*OPY2* 遺伝子破壊株 ( $\Delta$ opy2 株) は野生株 (HITO7711 株) の *OPY2* 遺伝子をジェネティシン耐性マーカーで置換したものをを用いた (Yoshida *et al.*, 2025)。 $\Delta$ opy2 株に対し、突然変異誘引剤として 4-Nitroquinoline 1-Oxide (NQO) を処理し、その結果得られた突然変異株の1つである D296 株を本研究に供試した。供試菌株は、V8 または野菜ジュース寒天培地において 25°C で培養した。交配試験では、D296 株に対して MASHIKI2-2 株を掛け合わせ、得られた子孫株の表現型を解析した。さらに、D296 株と同じ表現型を示した子孫株 D296OS-95 株 (*MAT1*-1) に対して  $\Delta$ opy2 株 (*MAT1*-2) を掛け合わせ、得られた子孫株の表現型を解析した。定法に従い、交配にはザックス培地と滅菌トウモロコシ葉を用いた (Morita *et al.*, 2012)。

交配試験により得られた D296 株の子孫株のうち (同定した変異遺伝子を *lag1* と命名)、遺伝子型が変異型 ( $\Delta$ opy2, *lag1*) の株から 2 株、親株型 ( $\Delta$ opy2, *LAG1*) の株から 1 株を選択し、これら計 3 株についてゲノム DNA を抽出した。抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、抽出 DNA をマクロジェン・ジャパン (Tokyo, Japan) に送付して、次世代シーケンサー NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, USA) による解析を委託した。得られたショートリード配列 (100bp paired-end) は FastQC (ver. 0.10.1) によるクオリティチェックを行い、Cutadapt (ver.1.1) (Martin, 2011) によってアダプター配列を除去した。得られたショートリード配列は、Burrows-Wheeler Aligner (BWA ver. 0.7.12) (Li & Durbin, 2009) を用いて、Joint Genome Institute (JGI) の *B. maydis* C5 株データベースのゲノムコンティグに対してマッピングした。さらに SAMtools/BCFtools (ver. 0.1.19) (Li *et al.*, 2009) を用いて *B. maydis* C5 株と供試菌株との間の塩基多型 (SNP) を探索した。続いて、HITO7711 株と MASHIKI2-2 株由来の SNP を除去し、供試 3 株の SNP サイトデータをそれぞれ取得した。さらに、遺伝

子型 ( $\Delta\text{opy2}$ ,  $\text{lag1}$ ) の2株に共通する SNP のうち、遺伝子型 ( $\Delta\text{opy2}$ ,  $\text{LAG1}$ ) の SNP に重複しない SNP サイトを抽出した。抽出した SNP が ORF 上に存在するか否かを *B. maydis* C5 株のデータベース v3.0 ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5\\_4m/CocheC5\\_4m.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/CocheC5_4m/CocheC5_4m.home.html)) を用いて評価し、ORF 上に SNP を含んでいた遺伝子を  $\text{LAG1}$  の候補遺伝子とした。

#### 遺伝子破壊株と相補株、蛍光株の作成

目的の遺伝子組換え株を作成するために、各遺伝子組換えカセットを含むプラスミドとして、野生型  $\text{LAG1}$  遺伝子を発現する相補用プラスミド (pLAG1C)、2 回交差により  $\text{LAG1}$  遺伝子をマーカーカセットと置換できる破壊用プラスミド (pdlag1)、pLAG1C から  $\text{LAG1}$  遺伝子の部分領域を欠失させた3種のプラスミド (pdNv1-3)、蛍光標識用プラスミド (pNGLAG1)、さらに pNGLAG1 のプロモーターを *tef* プロモーターに置換したプラスミド (pNGLAG1OE) を構築した。その際、pdlag1 には pZErO-2、その他のプラスミドには pZN3HisLR3 (Yasumoto *et al.*, unpublished) をベクターとして使用した。カセットに使用した DNA 断片のうち、*B. maydis* 由来のものは、*B. maydis* 野生株のゲノム DNA をテンプレートとして PCR により増幅した。遺伝子破壊における選択マーカーとして、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPH*) を用い、*HPH* 遺伝子断片はプラスミド pCB1004 (Carroll *et al.*, 1994) を鋳型として PCR により増幅した。pdNv1-3 の作製では、pLAG1C をテンプレートとして PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いた PCR ベースの方法により、 $\text{LAG1}$  の部分領域を欠損させた。pNGLAG1 および pNGLAG1OE については、プロモーター断片、NeonGreen 断片、 $\text{LAG1}$  遺伝子断片を連結し、 $\text{LAG1}$  の N 末端側に NeonGreen が融合した NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  発現株の作成に供試した。

糸状菌への形質転換は定法に従いプロトプラスト PEG 法により行った (Izumitsu *et al.*, 2009)。想定通りの組換えが生じたことを PCR により確認し、典型的な形質を示す菌株をその後の表現型解析に供試した。また、NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  発現株については、プラスミドの導入により *lag1* の変異形質が相補される、すなわち NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  が  $\text{LAG1}$  として機能することを確認したのち局在解析に供試した。

#### 表現型解析 (付着器形成能, 病原性, $\text{LAG1}$ 局在解析)

付着器形成能の評価: 白金鉤を用いて各菌株のコロニーから分生子を掻き取り、滅菌水を 1mL 入れたエッペンドルフチューブに懸濁した。次に、プラスチックシャーレの底面を 10mL の滅菌水あるいはペクチン溶液

で満たし、孢子懸濁液を 100 $\mu$ L 滴下した。シャーレを 25 $^{\circ}$ C 暗黒下で 6 時間静置し、倒立顕微鏡を用いて付着器を観察した。付着器形成率 = 付着器を形成した孢子数 / 発芽した孢子数として集計した。

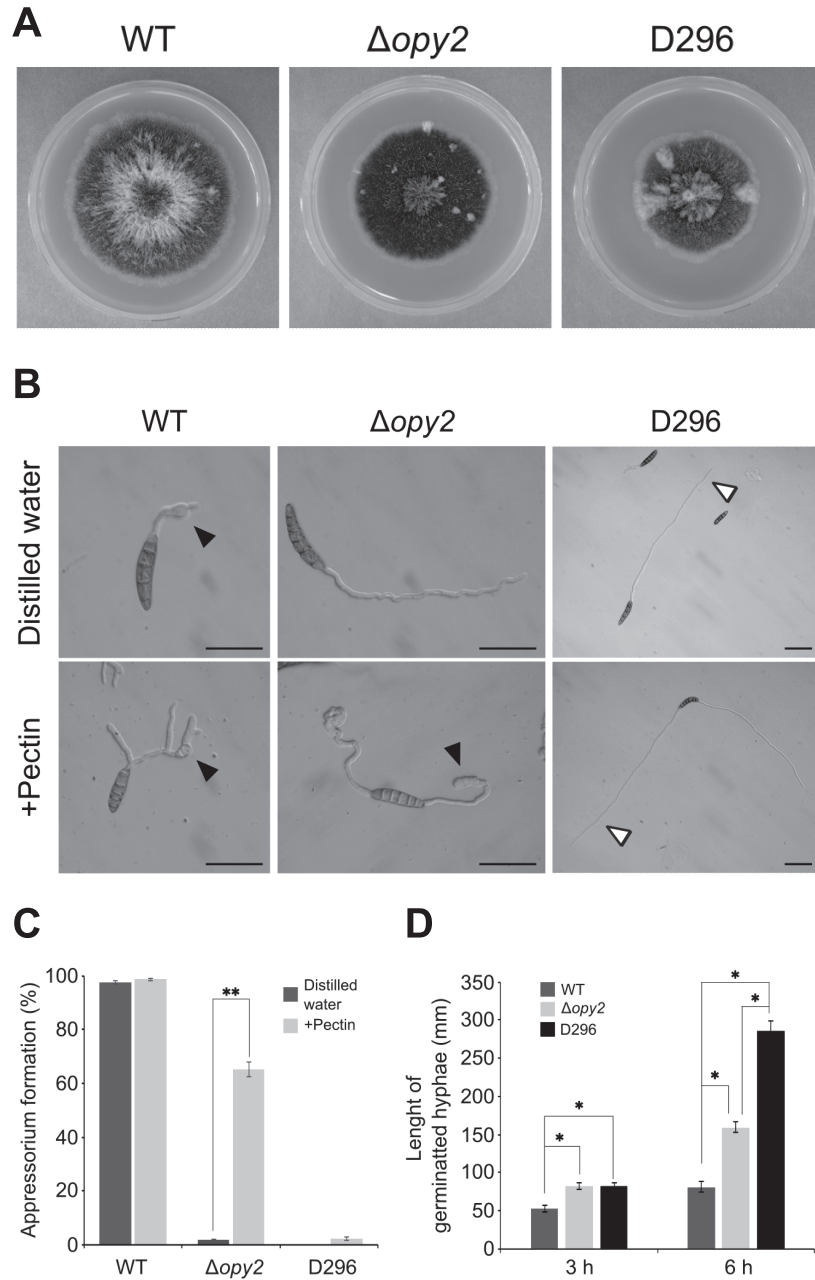
病原性評価: 白金鉤を用いて各菌株のコロニーから分生子を掻き取り、0.1% Tween 水を 1mL 入れたエッペンドルフチューブに懸濁した。適宜、菌糸残渣などを濾過した後、0.1% Tween 水における孢子数を  $5.0 \times 10^5$  個/mL に調整し、孢子懸濁液とした。プラスチックバット内に十分に水で湿らせたキムタオルを敷き、播種 30 日後のトウモロコシ葉を切り取ってキムタオル上に固定した。孢子懸濁液 13 $\mu$ L のドロップをトウモロコシ葉上に接種し、25 $^{\circ}$ C 暗黒下で 3 日間静置した。その後、病斑の長径の長さに基づき病原性を評価した。

$\text{LAG1}$  局在解析: NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  発現株 (NGLAG1 株) を用いて  $\text{LAG1}$  の細胞内局在を解析した。また、NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  の発現を *tef* プロモーターで制御した過剰発現型株 (NGLAG1<sup>OE</sup> 株) も作成し、局在解析に供試した。白金鉤を用いて、得られた NeonGreen 融合  $\text{LAG1}$  発現株のコロニーから分生子を掻き取り、滅菌水あるいはペクチン溶液 1mL を入れたエッペンドルフチューブに懸濁した。撥水剤 (Glaco: SOFT99, Osaka, Japan) を塗布したカバーガラスに孢子懸濁液を 20 $\mu$ L 滴下し、十分に湿らせたキムワイブと共にシャーレに入れ、暗黒下で静置した。培養開始後、2, 3, 4 時間後の孢子、菌糸、形成された付着器を観察した。蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡 STELLARIS 5 WLL (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用い、励起光 491nm / 検出波長 510–530nm の条件で観察した。

## 結 果

#### D296 株の作出とその表現型解析

ペクチンが付着器形成を誘導するメカニズムを明らかにするため、疎水表面認識能を欠く  $\Delta\text{opy2}$  株を親株として突然変異株を作出した。NQO 処理により、約 0.1% の生存率条件において 894 株の突然変異株を取得し、これらについてペクチン溶液を用いたスクリーニングを実施した。その結果、「ペクチン添加による付着器形成誘導」を示さない株として D296 株が単離された。D296 株は野生株や親株と比較して僅かにコロニー生育が悪化していた (Fig. 1A)。また、D296 株は「ペクチン添加による付着器形成の誘導不全」だけでなく (Fig. 1B & C)、分生子発芽後、「直線的で分岐の少ない菌糸」を伸長した (Fig. 1B)。これを定量的に評価するため、培養 3 時間及び 6 時間後の菌糸の長さを計測すると、6 時間後では親株の  $\Delta\text{opy2}$  株と比較して有意に長い菌糸を伸長して



**Fig. 1** Vegetative growth and appressorium formation in the wild-type (WT), parental  $\Delta\text{opy}2$ , and D296 strains. (A) Colony growth at 7 days after inoculation on Vegetable Juice Agar medium. (B) Hyphal growth on plastic plates in distilled water with or without pectin for 6h. Scale bars, 50 $\mu\text{m}$ . Black arrowheads, appressoria; while white arrowheads, elongated hyphae. (C) Appressorium formation rates at 6h of incubation on plastic plates in sterile water with or without pectin. The rate was defined as the number of conidia forming appressoria divided by the number of germinated conidia ( $n=100$ ). Data are the mean of three replicates  $\pm$  standard error. Significance of differences between treatments was assessed using Welch's t-test (\*\* $P<0.01$ ) and interpreted as indicating 'induction of appressorium formation by pectin addition'. (D) Hyphal lengths at 3 or 6h of incubation on plastic plates in sterile water with or without pectin. Data are the mean hyphal lengths of 100 germinated conidia  $\pm$  standard error. Multiple comparisons were performed using Tukey's test at a 5% significance level ( $*P<0.05$ ).

いた (Fig.1D). 以上より, D296 株は「ペクチン添加による付着器形成誘導」に関与する遺伝子に変異を持つことが示唆されたため, これらの表現型に寄与する遺伝子変異の同定へと研究を展開した.

#### D296 の特性に関与する責任遺伝子の同定

D296 株は「ペクチン添加による付着器形成の誘導不全」と「直線的で分岐の少ない菌糸」という特徴的な表現型を示す. これら表現型の原因突然変異を同定するため, 交配による子孫株に見られる表現型の分離比から, 変異の原因が単一の遺伝子によるか否かを明らかにすることを試みた. まず, 野生株 MASHIKI2-2 株と D296 株の交配試験により 100 株の子孫株を得た. そのうち, D296 株の親株である  $\Delta opy2$  株由来のジェネティシン耐性を示す子孫株は 48 株 (カイ二乗検定:  $\chi^2=1.96 < \chi^2(1, 0.05)=3.84$ ) であった. 子孫株の分生子を採取し, 胞子発芽後の菌糸の形態を観察したところ, 50 株 (カイ二乗検定:  $\chi^2=0 < \chi^2(1, 0.05)=3.84$ ) の子孫株の発芽胞子において直線的な菌糸が観察された. 続いて, 得られた子孫株の中でジェネティシン耐性を持ち, 且つ直線的な菌糸を形成した株から D296OS-95 株 (*MAT1-1*) を選抜し,  $\Delta opy2$  株との交配試験を行った. この交配から 100 株の子孫株を取得し, それらすべてがジェネティシン耐性を持つことを確認した. 子孫株の分生子を採取し, 胞子発芽後の菌糸の形態を観察したところ, 52 株 (カイ二乗検定:  $\chi^2=1.96 < \chi^2(1, 0.05)=3.84$ ) の子孫株において直線的な菌糸が観察された. また, これらの 52 株ではペクチンを添加しても付着器形成誘導は観察されなかった. 以上の結果から, D296 株に見られた表現型「ペクチン添加による付着器形成の誘導不全」と「直線的で分岐の少ない菌糸」は同一の遺伝子変異に起因し, さらにこれらは 1 遺伝子の変異に由来していることが示唆された. この原因変異遺伝子を *LAG1* と命名し, さらなる探索を行った.

次に, 比較ゲノム解析により *LAG1* の同定を試みた. D296 株と野生株 MASHIKI2-2 株との交配により得られた子孫株のうち「ジェネティシン耐性」と「直線的で分岐の少ない菌糸」が見られる株 ( $\Delta opy2$ , *lag1*) として D296OS-15 株及び D296OS-95 株の 2 株を, 「ジェネティシン耐性」を示すが「直線的で分岐の少ない菌糸」が見られない株 ( $\Delta opy2$ , *LAG1*) として D296OS-41 株を選定し, 計 3 株からゲノム DNA を抽出した. これら 3 株についてゲノム DNA の塩基配列を次世代シーケンサーにて決定した. BWA プログラムと SAMtools/BCFtools を用いて, *B. maydis* C5 株と DNA 抽出を行った株間との SNP サイトを探索し, それに続いて野生株 HITO7711 株と MASHIKI2-2 株由来の SNP サイトを除去した. そ

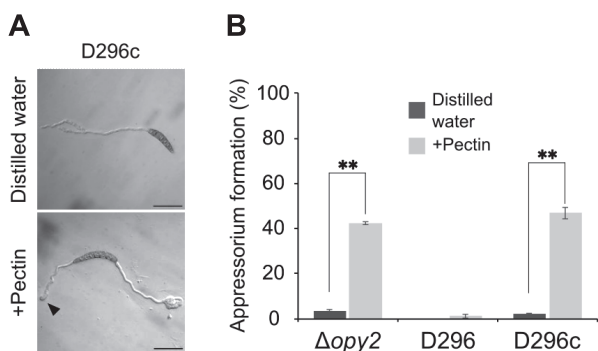
の結果, C5 株との間に D296OS-15 株では 22067 ケ所, D296OS-95 株では 18716 ケ所, D296OS-41 株では 18954 ケ所の SNP サイトを見出した. これらの SNP サイトから遺伝子型:  $\Delta opy2$ , *lag1* の 2 株に共通し, 且つ遺伝子型:  $\Delta opy2$ , *LAG1* の株には含まれない SNP サイトを抽出し, 2680 ケ所の SNP サイトを得た. JGI における *B. maydis* C5 株のデータベースを用いて探索した結果, CDS 上に変異が生じていた SNP サイトは 698 ケ所であった. またここからトランスポゾンを除く 159 ケ所の SNP サイトのうち, シノニマス変異を生じるものを手動で除去して最終的に 14 ケ所の SNP サイトを候補遺伝子変異として絞り込んだ.

続いて, 候補 SNP を含む遺伝子の中から D296 株の表現型を引き起こす責任遺伝子を同定するため, 交配子孫株の中で遺伝子型:  $\Delta opy2$ , *lag1* の株を 10 株, 遺伝子型:  $\Delta opy2$ , *LAG1* の株を 10 株選定し, ゲノム DNA を抽出した. 各遺伝子型の 10 株のゲノム DNA を均等な濃度で混合し, 候補 SNP サイト周辺を PCR によって増幅した. この増幅断片をサンガー法でシーケンス解析し, リファレンス配列と一致するか, あるいは遺伝子型:  $\Delta opy2$ , *lag1* 由来の断片にのみ含まれている変異であるか否かを確認した. これにより Protein ID: 1166414 をコードする遺伝子の ORF 上の変異 (G → C) が子孫株の表現型と連鎖していることが明らかになった. また, この塩基置換により  $\alpha/\beta$ -hydrolase ドメイン (ABHD) において, アルギニンがプロリンへと変化する変異であることが推定された.

さらに, Protein ID: 1166414 中の変異が本表現型の原因であるという確証を得るため, 野生株の Protein ID: 1166414 の遺伝子配列を D296 株に異所的に導入した. Protein ID: 1166414 の翻訳領域の約 1500bp 上流から約 200bp 下流までの領域を PCR によって増幅し, *HIS3* ローカスをターゲットとして 2 回交差組換えによって遺伝子を導入した. 得られた相補株 (D296c 株) は「直線的で分岐の少ない菌糸」が観察されず, 「ペクチン添加による付着器形成誘導」も回復した (Fig. 2A and B). この結果から, D296 株の表現型は, Protein ID: 1166414 中の 760 番目のアミノ酸残基におけるアルギニンからプロリンへの変化に起因することが明らかになった. Protein ID: 1166414 を *LAG1* と同定し, 以降 *LAG1* 遺伝子の機能解析を実施した.

#### 野生株あるいは $\Delta opy2$ 株を親株とした *LAG1* 遺伝子破壊株の造成

*LAG1* の機能を詳解するため, 野生株を親株とした *LAG1* 遺伝子破壊株 ( $\Delta lag1$  株) および  $\Delta opy2$  株を親株とした *OPY2* との二重破壊株 ( $\Delta opy2\Delta lag1$  株) の作出

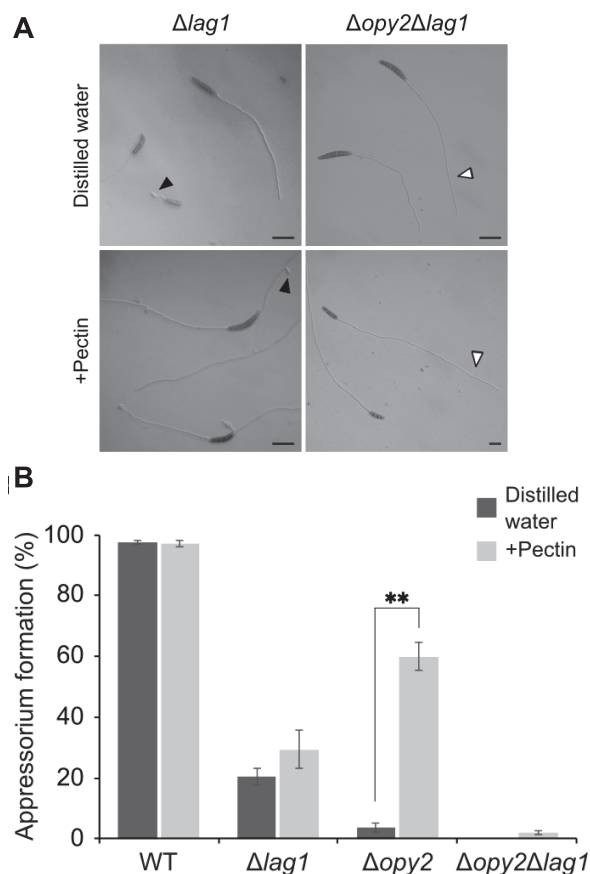


**Fig. 2** Hyphal growth and appressorium formation in the *LAG1*-complemented D296c strain. (A) Hyphal growth on plastic plate in distilled water with or without pectin for 6h. Black arrowhead, appressorium. (B) Appressorium formation rates of the  $\Delta\text{opy}2$ , D296, and D296c strains at 6h of incubation on plastic plates in sterile water with or without pectin. The rate was defined as the number of conidia forming appressoria divided by the number of germinated conidia (n=100). Data are the mean of three replicates  $\pm$  standard error. Significance of differences between treatments was assessed using Welch's *t*-test (\*\* $P < 0.01$ ).

を試みた。まず、ハイグロマイシン耐性カセットを *LAG1* 遺伝子の翻訳領域の外側領域で挟み込み、2回交差型の遺伝子置換カセットを構築した。これをプロトプラスト PEG 法により野生株 HITO7711 および  $\Delta\text{opy}2$  株へと導入して、遺伝子破壊株を取得した。これらの株について分生子を採取し、プラスチックシャーレ（疎水面）上の滅菌水およびペクチン溶液中で6時間培養した。いずれの分生子においても正常に発芽した後、「直線的で分岐の少ない菌糸」が観察された（Fig. 3A）。 $\Delta\text{opy}2\Delta\text{lag}1$  株は突然変異株である D296 株と同じく、滅菌水中、ペクチン溶液中のいずれでもほとんど付着器を形成せず「ペクチン添加による付着器形成誘導」も認められなかった（Fig. 3B）。また、 $\Delta\text{lag}1$  株は *OPY2* 遺伝子を保持しているにも関わらず疎水面上での付着器形成率が 20.5% まで低下し、さらにペクチン溶液中でも付着器形成率は 29.3% にとどまった（Fig. 3B）。すなわち、「ペクチン添加による付着器形成誘導」は認められなかった。一方、興味深いことに、 $\Delta\text{lag}1$  株の付着器形成の観察過程において、菌糸側面から付着器が形成される様子も観察され（Fig. 3A）、 $\Delta\text{lag}1$  株はペクチンに応答する能力自体は保持していることが推察された。

#### LAG1 の完全な機能に必要なドメインの探索

LAG1 の機能を予測するため、ドメイン予測ツールによるドメイン検索を行った。ドメイン検索には InterProScan



**Fig. 3** Hyphal growth and appressorium formation in the *lag1* single-disrupted strain ( $\Delta\text{lag}1$ ) and the  $\Delta\text{lag}1$  strain derived from the  $\Delta\text{opy}2$  strain ( $\Delta\text{opy}2\Delta\text{lag}1$ ). (A) Hyphal growth on plastic plate in distilled water with or without pectin for 6h. Scale bars, 50 $\mu\text{m}$ . Black arrowheads, appressoria; white arrowheads, elongated hyphae. (B) Appressorium formation rates (defined as in Fig. 1) at 6h of rates of incubation on plastic plates in either sterile water or pectin solution. The rate was defined as the number of conidia forming appressoria divided by the number of germinated conidia (n=100). Data are the mean of three replicates  $\pm$  standard error. Significance of differences between treatments was assessed using Welch's *t*-test (\*\* $P < 0.01$ ). WT, wild type.

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), NCBI DELTA-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いた (Table 1). この結果と ABHD (CDD 予測では MhpC ドメイン) 中の変異が *LAG1* 遺伝子破壊と類似した形質を示すことを鑑みると、*LAG1* は主に加水分解酵素として機能しており、さらにその機能には ABHD が重要であることが強く示唆された。

**Table 1** Domain prediction of LAG1

Tools Used	Domain Hits	Interval
InterProScan*	Abhydrolase_6	739-888
CDD**	HCR super family	313-450
	DUF1645 super family	467-622
DELTA-BLAST***	MhpC	739-900
	PRK12704	351-410
	GBP_C	361-411
	MhpC	739-900
	Abhydrolase_6	741-868

\*InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)

\*\*CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

\*\*\*DELTA-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

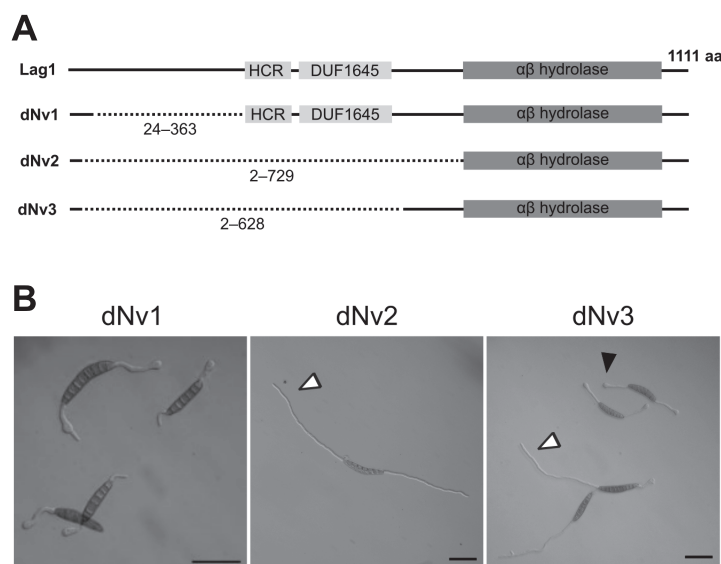
次に、ABHD以外のドメインがLAG1の機能に関与しているか否かを明らかにするため、ドメイン欠損株の作成を試みた。ドメイン予測の結果に基づき、ABHDを除く領域を欠く3種の変異株を造成した (Fig. 4A)。以下に造成した3株の欠損領域とその表現型を記す。

1) dNv1株：糸状菌において保存されているN末端側の24番目から363番目のアミノ酸残基を欠く (Fig. 4A)。複数得られたdNv1株はいずれも「直線的で分岐の少ない菌糸」は観察されず、付着器形成率の低下も認められなかった (Fig. 4B)。このことから、24番目から363番目の領域を欠損してもLAG1の機能には影響しないと考えられた。

2) dNv2株：ABHDを除く領域 (2から729番目のアミノ酸残基) を欠失 (Fig. 4A)。得られたdNv2株はいずれも、 $\Delta lag1$ 株と同様に「直線的で分岐の少ない菌糸」と付着器形成率の低下が観察された (Fig. 4B)。これにより、予測されたABHD領域 (734から888番目のアミノ酸残基) は不十分であり、 $\alpha/\beta$ -hydrolaseとしての機能を完全に発現するには予測領域よりN末端側の領域も必要であることが示唆された。

3) dNv3株：ABHD領域の近傍までを除く領域 (2から628番目のアミノ酸残基) を欠失 (Fig. 4A)。得られたdNv3株はいずれも付着器形成率に影響は見られなかったが、野生株やdNv1株と比較して、付着器を形成するまでに菌糸を長く伸長したものが多く観察された (Fig. 4B)。

以上の結果から、LAG1の完全な機能にはdNv1株とdNv3株の差である364番目から628番目のアミノ酸残基を含む領域が必要であると推察された。これらの領域にはCDDによって313から450番目にHCRが、467から622番目にDUF1645が、また、DELTA-BLASTによって361から411番目にGBP\_Cが予測されており (Table 1, Fig. 4A)、さらに近縁種の菌によく保存されている領域も含んでいた。どちらのドメインが重要かの特定には至っていないが、少なくともいずれかの領域がLAG1の完全な機能に必要なことが示唆される。さらに、dNv3株では付着器形成自体には影響が見られなかったことから、LAG1の付着器形成への寄与はそのほとんどをABHDの機能に依存していることが示唆された。



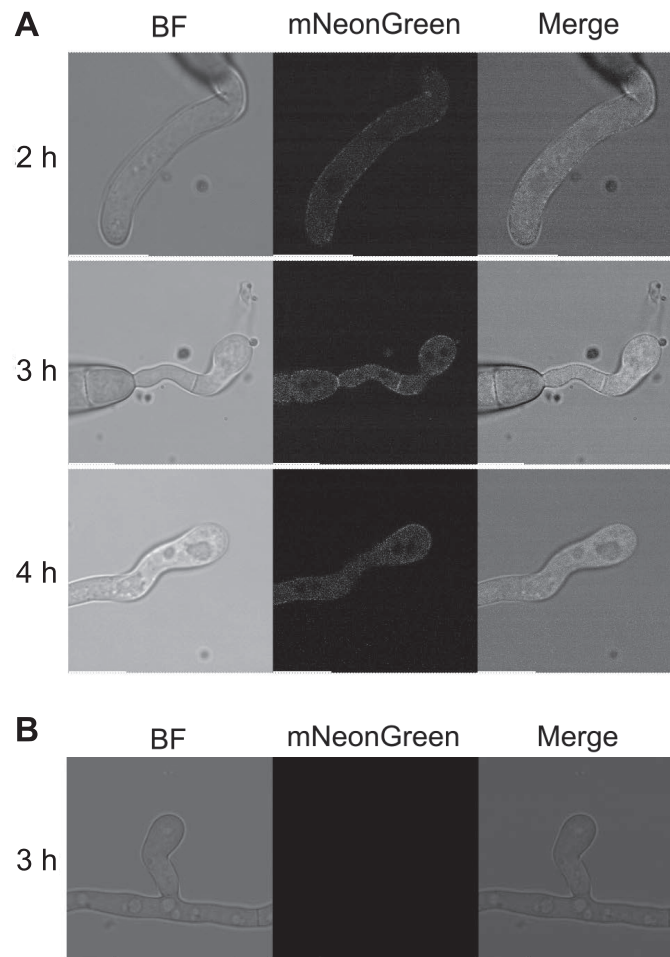
**Fig. 4** Deletion regions and growth characteristics of domain-deficient LAG1 strains dNv1, dNv2, and dNv3.

(A) Schematic representation of LAG1 showing the deleted regions (dotted lines) present in the wild-type and deletion strains. (B) Hyphal growth on plastic plate in distilled water for 6h. Scale bars indicate 50 $\mu$ m. Black arrowhead, appressorium; white arrowheads, elongated hyphae.

蛍光タンパク質融合 LAG1 を用いた LAG1 の局在解析

LAG1 の細胞内局在を明らかにするため, 蛍光タンパク質 (NeonGreen) を融合させた蛍光 LAG1 発現株による局在解析を試みた. ドメイン解析により N 末端側に機能領域が見出されなかったことから, N 末端側に NeonGreen 配列が融合した LAG1 を発現するベクターを構築し,  $\Delta lag1$  株に形質転換した. 得られた蛍光 LAG1 発現株 (NGLAG1 株) は, 分生子発芽後, 正常に付着器を形成した (data not shown). しかしながら, NGLAG1 株において, 確認された蛍光が極微弱であったため, NeonGreen 融合 LAG1 を *tef* プロモーターによって制御する高発現タイプの蛍光 LAG1 発現株を作成した (NGLAG1<sup>OE</sup> 株). NGLAG1<sup>OE</sup> 株も NGLAG1 株と同様に,

正常に分生子発芽し, 付着器を形成した (Fig. 5A). これにより, 蛍光標識された LAG1 は高発現タイプかどうかに関わらず正常に機能すると考えられた. 撥水処理したカバーガラス上で発芽させた分生子を継時的に観察したところ, 培養 2 時間, 3 時間, 4 時間時点のいずれにおいても蛍光が観察され, それらの蛍光は顆粒状となって分生子, 菌糸, 付着器に局在していた (Fig. 5A). 特に細胞膜や隔壁に多く局在している様子が観察された. さらにペクチン添加によって局在パターンに変化が生じるか否かを検証するため, 撥水処理したカバーガラス上のペクチン溶液中で蛍光を観察した. しかしながら, ペクチンを添加したことによる局在パターンに変化は認められなかった (Fig. 5B).

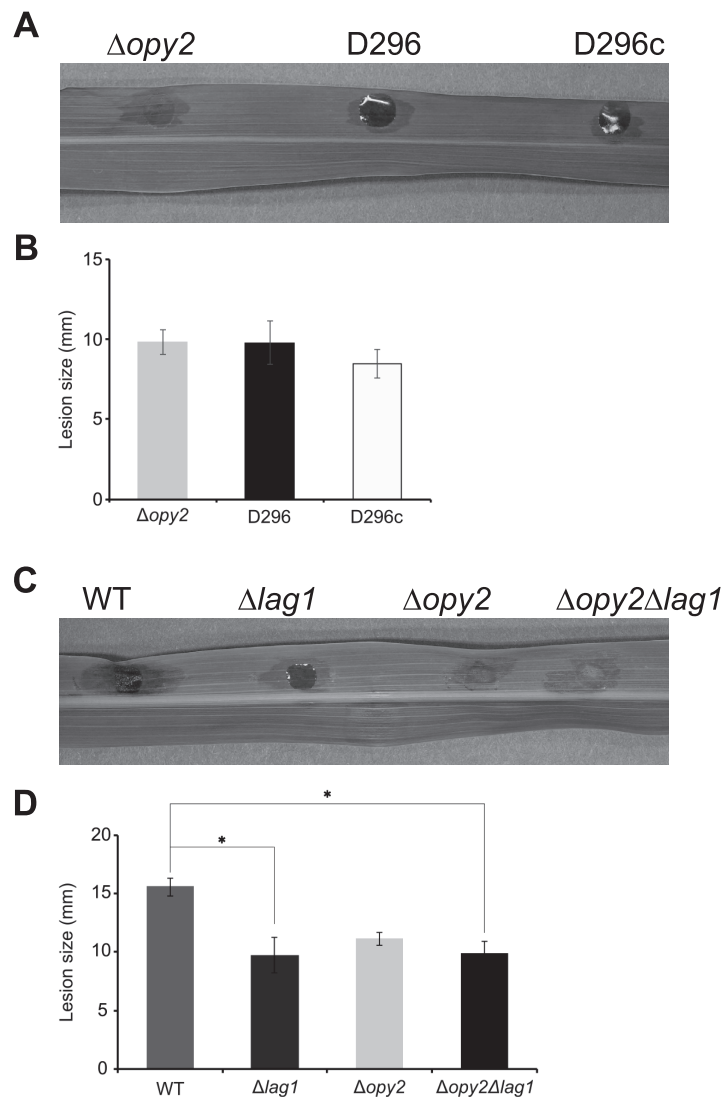


**Fig. 5** Localization of fluorescent protein-fused LAG1. (A) The NGLAG1<sup>OE</sup> strain (LAG1 under control of the *Tef* promoter). The strain was cultured in sterile water on a Petri dish, and hyphae and fluorescence were examined at the indicated time points. BF, bright field. Scale bar, 10 μm. (B) Fluorescence imaging of the NGLAG1 strain after pectin addition. Conidia were incubated in distilled water containing pectin on a glass slide. Scale bars, 10 μm. BF, bright field.

## 病原性評価

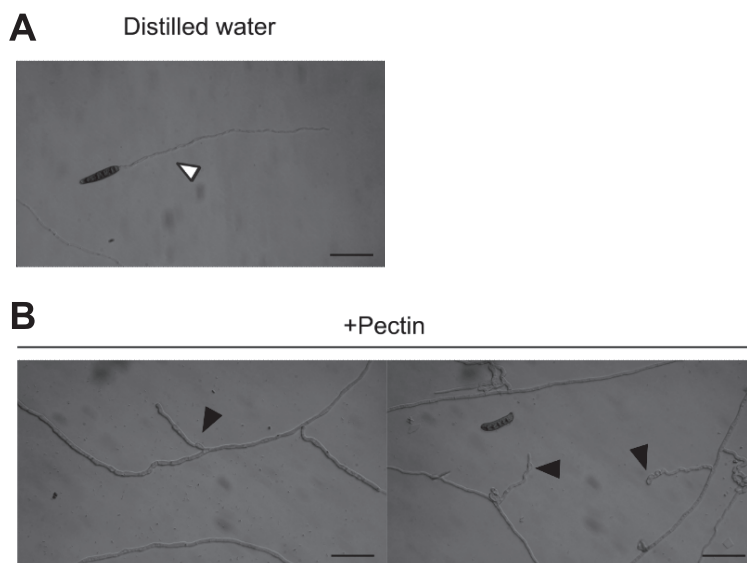
作出した突然変異株、相補株および各種遺伝子破壊株において宿主に対する病原性を評価した。切り取ったトウモロコシ葉に対して分生子懸濁液を接種し、3日後に形成された病斑の長径を測定した。まず、突然変異株 D296 株では、親株である  $\Delta\text{opy2}$  株と比較して病原性の低下は認められなかった (Fig. 6A & B)。また、 $\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株も  $\Delta\text{opy2}$  株と比較して病原性の低下は認められなかった (Fig. 6C & D)、 $\Delta\text{lag1}$  株は野生株と比較して病原性の低下が認められたが、 $\Delta\text{opy2}$  株および

$\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株と同等の病原性を示した (Fig. 6C & D)。D296 株や  $\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株では、疎水面上でほとんど付着器の形成が観察されなかったにも関わらず、いずれの株も  $\Delta\text{opy2}$  株と同等の病原性を示したことから、D296 株の付着器形成について時間軸を伸ばして観察した。その結果、D296 株は疎水面上において 18 時間時点まで付着器形成は見られなかったが (Fig. 7A)、ペクチンを外部添加すると 18 時間時点で付着器が形成されることが確認された (Fig. 7B)。



**Fig. 6** Pathogenicity test. (A and C) Lesions formed on intact corn leaves 3 days after inoculation with the indicated strains. (B and D) The major axis length of lesions formed after inoculation with the indicated strains. Data are the mean of three replicates  $\pm$  standard error. Multiple comparisons were performed using Tukey's test at a 5% significance level. WT, wild type.





**Fig. 7** Post-germination appearance of conidia of D296 strain. Conidia were incubated in distilled water with (A) or without (B) pectin for 18h. Scale bars, 50 $\mu$ m. Black arrowheads, appressoria; white arrowhead, elongated hypha.

## 考 察

付着器は、植物病原菌が宿主へ侵入する際に機能する器官として重要な役割を担っている。付着器形成は疎水表面の認識で誘導され、*B. maydis*では疎水面認識に関わる遺伝子としてOPY2, MSB2, SHO1が既に知られている (Yoshida *et al.*, 2025, Izumitsu *et al.*, unpublished).  $\Delta$ opy2株は疎水面上で付着器を形成できないが、依然として宿主葉に侵入することができる。また人工基質上でも外部からペクチンを添加することで付着器形成が誘導される。このような事例から宿主由来物質 (ペクチン) が付着器形成を誘導する経路の存在が示唆されている (Yoshida *et al.*, 2025)。一方、この現象を説明できるメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、 $\Delta$ opy2株を親株とした突然変異源処理により、外部からペクチンを添加しても付着器形成が誘導されない変異株D296株を作出し (Fig.1)、ペクチンによる付着器形成誘導に関わるメカニズムの解明を試みた。

野生株とD296株間の交配及び交配子孫株の姉妹間での比較ゲノム解析を行うことにより、D296株に「ペクチン添加による付着器形成の誘導不全」「直線的で分岐の少ない菌糸」という特徴的な表現型をもたらす責任遺伝子候補を14種に絞り込んだ。これらの候補遺伝子の変異箇所周辺のシーケンス解析を行い、SNPと交配子孫株の表現型が連鎖していたProtein ID: 1166414をコードする遺伝子に原因変異を見出した。本遺伝子の野生型

配列をD296株に異所的に導入したところ、D296株の表現型が相補されたことから、本遺伝子を責任遺伝子LAG1として同定した (Fig.2)。LAG1の機能解析のために $\Delta$ lag1株および $\Delta$ opy2 $\Delta$ lag1株を作出し、 $\Delta$ opy2 $\Delta$ lag1株はD296株 ( $\Delta$ opy2, lag1) と同等の形質を示すことを明らかにした (Fig.3)。一方、 $\Delta$ lag1株はOPY2を保持しているにも関わらず、疎水面上での付着器形成率の低下が認められた (Fig.3B)。このことは、LAG1が付着器形成そのものに関与していることを示唆している。また、 $\Delta$ lag1株において、ペクチンの外部添加による有意な付着器形成率の上昇は認められなかったが (Fig.3B)、ペクチン添加により菌糸側面からの付着器が分化するという特徴的な形質が観察され (Fig.3A)、ペクチンへの応答性は依然として保持していることも明らかになった。

D296株と $\Delta$ opy2 $\Delta$ lag1株間で表現型に大きな違いが認められなかったことから、D296株に見出されたLAG1の760番目のアミノ酸残基におけるアルギニンからプロリンへの変異が、LAG1の機能をほとんど喪失させることが示された。この変異はLAG1で予測されている $\alpha$ / $\beta$ -hydrolaseドメイン (ABHD)中に存在しており、このことから、LAG1は加水分解酵素として機能し、この機能が付着器形成に関与することが推測された。しかしながら、 $\alpha$ / $\beta$ -hydrolaseファミリーは生物間で配列的な類似性に乏しく、基質特異性や立体構造も多様性に富んでいることが知られている (Nardini *et al.*, 1999)。そのため、LAG1の基質や触媒作用を明らかにするのは

困難が伴うと予想される。また、ドメイン予測ツールや近縁種間での配列比較によって、ABHD以外にも保存性のある領域が存在することが見出された (Yasumoto *et al.*, unpublished)。それらのうち、クローボタケ綱 (Dothideomycetes) の *Bipolaris* 属や *Alternaria* 属のみに保存されている配列を含む領域を欠損すると (dNv3 株)、付着器形成自体には影響しないものの、分生子発芽後から付着器を形成するまでに伸長する菌糸が長くなる傾向が観察された (Fig. 4)。この結果から、この領域は付着器形成には直接関与しないが、LAG1の完全な機能には必要であることが推測された。これらの領域には HCR super family や DUF1645 super family が予測されているが、いずれも明確な機能は定義づけられておらず、どちらがLAG1の完全な機能に必要であるかを判断するにはさらなる研究が必要である。

蛍光LAG1発現株 (NGLAG1株) および *tef* プロモーター制御による高発現型の蛍光LAG1発現株 (NGLAG1<sup>OE</sup>株) を用いてLAG1の局在解析を試みたところ、いずれの株においても菌糸や付着器、分生子において蛍光が確認でき、顆粒状に局在している様子が観察された (Fig. 5)。また、外部からのペクチン添加では、これらの局在に変化は生じなかった (Fig. 5B)。LAG1が付着器形成そのものに関与していることが示唆される一方で、付着器に特異的に局在する訳ではないこと及びペクチン添加でも局在は変化しないことから、LAG1はペクチンによる付着器形成誘導に直接的には関与しない可能性も示唆される。

疎水面上での付着器形成試験においてペクチンを添加しても付着器形成が観察されなかったことから、D296株や  $\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株は無傷葉への病原性を喪失していることが予想された。しかしながら、これらの株はいずれも親株と遜色ない病斑を形成した (Fig. 6)。単独破壊の  $\Delta\text{lag1}$  株は野生株と比較して病原性が低下したが、 $\Delta\text{opy2}$  株とは同等の病原性を示した。この結果は、OPY2とLAG1は病原性に関して同程度に寄与しており、どちらか一方が欠損するとその役割が喪失し、病原性が低下する傾向にあることを示している。また、植物体上ではD296株および  $\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株も付着器を形成できることが示唆されたため、従来の  $\Delta\text{opy2}$  株においてペクチンによる付着器形成誘導が確認できる6時間よりも時間軸を伸ばして観察を行った。その結果、D296株は培養18時間時点でも、疎水面上での付着器形成はほとんど認められなかったが、ペクチン添加後18時間の時点だと付着器が形成されることが明らかになった (Fig. 7)。この結果から、LAG1の欠損はペクチンが付着器形成を誘導するメカニズムを完全に遮断するわけではなく、その応答性を鈍化させていると考えられた。

疎水面上において、 $\Delta\text{lag1}$  株はOPY2遺伝子を保持しているにも関わらず、付着器形成率が20%程度まで低下した (Fig. 3B)。さらにOPY2遺伝子も併せて欠損した  $\Delta\text{opy2}\Delta\text{lag1}$  株はほとんど付着器を形成しなかった (Fig. 3B)。このことから、 $\Delta\text{lag1}$  株に見られる約20%への付着器形成率の低下はOPY2を介したシグナルによるものであると推察される。すなわち、 $\Delta\text{lag1}$  株はOPY2を介したシグナルが完全に遮断されている訳ではないが、付着器形成に対して何らかの律速が生じていることが示唆される。LAG1の欠損がペクチンによる付着器形成誘導の鈍化をもたらすことと合わせて考察すると、LAG1はOPY2を介したシグナルとペクチンにより誘導されたシグナルが合流した先で付着器形成に至るプロセスを制御していると考えられる。先行研究から、付着器形成はCHK1 MAPKの経路により制御されており、OPY2はMAPKの上流に位置するSTE50と相互作用することが報告されている (Yoshida *et al.*, 2025)。さらにMAPKであるCHK1とその上流因子STE11およびSTE50を欠損すると、疎水面上での付着器形成能を失うだけでなく、ペクチン添加による付着器形成誘導も喪失する (Yoshida *et al.*, 2025)。つまり、ペクチンに由来するシグナルが直接MAPK経路に伝達されるのか、あるいはその上流でOPY2を介したシグナルと合流するかは定かではないが、LAG1は疎水面シグナルとペクチン由来シグナルが入力されるMAPKカスケードの何処かに作用すると考えられる。

興味深いことに、D296株と同時に単離され、遺伝子同定が完了した変異株D493株 ( $\Delta\text{opy2}$ , *cgb1*) もD296株と同じく培養6時間の時点でペクチン添加による付着器形成誘導を示さない (Tokuoka *et al.*, unpublished)。D493株の原因突然変異はヘテロ三量体Gタンパク質の $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子中に見出されている (Tokuoka *et al.*, unpublished)。D296株とD493株を比較すると、コロニー生育は大きく異なるが、分生子発芽後の様子は類似している。すなわち、OPY2との二重変異株は疎水面上で付着器を形成せず、ペクチンを添加しても形成は誘導されない。また、その際に「直線的で分岐の少ない菌糸」を伸長する様子も観察されている (Tokuoka *et al.*, unpublished)。さらに、*cgb1* 単独変異株 (*cgb1* 株) では、OPY2遺伝子を保持しているにも関わらず疎水面上での付着器形成率が低下した。ヘテロ三量体Gタンパク質の $\alpha$ サブユニットの一つであるCGA1においても、欠失すると「直線的で分岐の少ない菌糸」が観察される。 $\Delta\text{cga1}$  株と  $\Delta\text{cgb1}$  株は幾らか共通した表現型を示すことが報告されており (Degani, 2013)、実際に  $\Delta\text{cga1}$  株を作出するとコロニー形態はD296株、D493株のいずれとも類似していなかったものの、疎水

面上での付着器形成は見られず、「直線的で分岐の少ない菌糸」を伸長するという共通した表現型を示した。一方、これらGタンパク質の下流で機能するCHK1の欠損は付着器の形成不全を引き起こすが、上記の変異株に共通して見られる「直線的で分岐の少ない菌糸」は観察されない。このことから「直線的で分岐の少ない菌糸」はGタンパク質からCHK1に至る経路とは別の経路の欠陥に由来する可能性があり、LAG1はその経路に直接あるいは間接的に関与しているという仮説が立てられる。すなわち、LAG1の欠損はペクチンやOPY2を介した付着器形成に必要なMAPK経路のシグナル伝達ではなく、Gタンパク質を介した形態形成や極性制御に影響を与え、その結果、「付着器形成の不全や遅延」、「直線的で分岐の少ない菌糸」という形質が現れていると考えることもできる。これらの仮説を検証するために、Gタンパク質の各変異株におけるLAG1の発現量、各lag1変異株におけるGタンパク質および下流因子の発現量を解析することは有効だと考えられる。さらに、ペクチンではなく、植物由来抽出物をlag1変異株に処理した場合に付着器形成は誘導されるのか、あるいはペクチンと同様に遅延するのかを検証することで、LAG1がMAPKよりも下流で機能するかどうかを推察できる可能性がある。引き続き研究が進捗し、ペクチン由来シグナルを媒介する因子が特定され、付着器形成が誘導されるメカニズムが解明されることが期待される。

## 要 約

植物病原性真菌において、植物基質へ接着した細胞はその周辺環境を認識し、侵入・分解のプロセスへと移行する。この過程において、基質表面を認識するメカニズムは病原菌の生存戦略上極めて重要な要素であると考えられる。例えば、*Bipolaris maydis*などの一部の植物病原菌は、感染初期に宿主に侵入するための特殊な器官である付着器を発達させる。このプロセスは、表面の疎水性と宿主由来化合物の認識によって引き起こされる。*B. maydis*の $\Delta\text{opy}2$ 株は病原性を維持しているが、疎水性表面の認識を欠いており、疎水面上で付着器を効率的に形成できない。一方、 $\Delta\text{opy}2$ 株でも宿主由来成分の一つであるペクチンを処理すると付着器の形成が誘導される。これまで、ペクチン添加による付着器形成の誘導メカニズムは不明であり、これに関わる因子を探索することが本研究の目的である。まず、 $\Delta\text{opy}2$ 株を親株として、ペクチンを添加しても付着器を形成しない変異株D296株を単離した。また、D296株は胞子発芽後に「直線的で分岐の少ない菌糸」を伸長させるという特徴も見出した。次に、順遺伝学的な解析により、「ペクチン添加による

付着器形成の誘導不全」と「直線的で分岐の少ない菌糸」は、単一の遺伝子変異によって制御されていることが示された。さらに、比較ゲノム解析により、 $\alpha/\beta$ -hydrolaseをコードする遺伝子におけるSNPが、D296の特徴形質とリンクしていることが判明した。この遺伝子をLAG1と命名し、遺伝子破壊株の解析、機能ドメインの推定、LAG1の局在解析を行った。特に、LAG1破壊株では、D296株に類似した「直線的で分岐の少ない菌糸」が観察され、疎水表面上での付着器形成率が減少するとともに、ペクチンによる付着器形成誘導も認められなかった。これらの結果は、LAG1がこの菌の付着器形成において重要な役割を担うことを示唆している。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表・ポスター

- 1) 吉見啓. 2021. 糸状菌環境インターフェイス研究. 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス・シンポジウム「次の時代を切り拓く糸状菌研究」(11月12日, オンライン)
- 2) 徳岡袖月, 安本駿作, 佐波雅史, 辻健也, 吉見啓, 泉津弘佑, 河内護之, 本田与一, 田中千尋. 2023. ペクチンによる付着器形成の誘導を示さない*Bipolaris maydis*突然変異株の解析. 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月21-22日, 徳島)
- 3) 安本駿作, 佐波雅史, 辻健也, 吉見啓, 泉津弘佑, 河内護之, 本田与一, 田中千尋. 2023. *Bipolaris maydis*における菌糸徒長を伴う付着器形成不全の原因遺伝子の同定. 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月21-22日, 徳島)
- 4) 吉見啓. 2024. 糸状菌の環境ストレス応答システム研究-効果的な微生物制御を目指して-. 日本動物学会第95回長崎大会シンポジウム 学祭的アプローチによるバイオセンシング技術の実用化研究～生物学・工学・化学・農学による新展開～ (9月12-14日, 長崎)
- 5) 吉見啓. 2024. 糸状菌の細胞表層研究とその応用展開. 京都先端科学大学FuBEICセミナー (9月19日, 京都)
- 6) Yasumoto S., Tsuji K., Saba M., Yoshimi A., Ruiz-Nava D.C., Kawauchi M., Honda Y. & Tanaka C. 2025. Identification of the causative gene for abnormal appressorium formation accompanied by hyphal elongation in *Bipolaris maydis*. 17<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics (March 2-5, Dublin, Ireland).
- 7) 安本駿作, 辻健也, 佐波雅史, 吉見 啓, 泉津弘佑, 河内護之, 本田与一, 田中千尋. 2025. *Bipolaris maydis*における付着器形成関連遺伝子の探索及び機能解析. 令和7年度日本植物病理学会大会 (3月26日, 高松)

### 原著論文

- 1) Yoshimi, A., Hagiwara, D., Ono, M., Fukuma, Y., Midorikawa, Y., Furukawa, K., Fujioka, T., Mizutani, O., Sato, N., Miyazawa, K., Maruyama, J.I., Marui, J., Yamagata, Y., Nakajima, T., Tanaka, C., & Abe, K. 2021. Downregulation of the *ypdA* gene encoding an intermediate of His-Asp phosphorelay signaling in *Aspergillus nidulans* induces the same cellular effects as the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Front. Fungal Biol.* 2: 67549

- 2) Yasumoto, S., Tsuji, K., Saba, M., Yoshimi, A., Kawauchi, M., Honda, Y., & Tanaka, C. Functional characterization of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase gene *LAG1* in *Bipolaris maydis*, required for hyphal morphogenesis and appressorium formation. (Unpublished).

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の学生諸氏に感謝の意を表します。さらに、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(B) (吉見啓 22H02238)の支援にも感謝致します。

## 文 献

- Carroll, A.M., Sweigard, J.A., & Valent, B. 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet. Newsl.* **41**: 135-143.
- Degani, O., 2013. G-protein alpha and beta subunit double mutant reveals shared and distinct roles in development and virulence. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **82**: 35-45.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., & Sweigard, J.A. 1999. Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell.* **11**: 2013-2030.
- Elion, E. A., Grisafi, P.L., & Fink, G.R. 1990. FUS3 encodes a *cdc2+*/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell.* **60**: 649-664.
- Izumitsu, K., Yoshimi, A., Kubo, D., Morita, A., Saitoh Y., & Tanaka, C. 2009. The MAPKK kinase ChSte11 regulates sexual/asexual development, melanization, pathogenicity, and adaptation to oxidative stress in *Cochliobolus heterostrophus*. *Curr. Genet.* **55**: 439-448.
- Kamakura, T., Yamaguchi, S., Saitoh, K., Teraoka, T., & Yamaguchi, I. 2002. A novel gene, CBP1, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 437-444.
- Kitade, Y., Sumita, T., Izumitsu, K., & Tanaka, C. 2015. MAPKK-encoding gene *Ste7* in *Bipolaris maydis* is required for development and morphogenesis. *Mycoscience* **56**: 150-158.
- Kong, L.-A., Li, G.-T., Liu, Y., Liu, M.-G., Zhang, S.-J., Yang, J., Peng, Y.-L., & Xu, J.-R. 2013. Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **56**: 33-41.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., & Horwitz, B.A. 1999. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 13542-13547.
- Li, H., & Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A. *et al.* 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**: 2078-2079.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Jour.* **17**: 10-12.
- Morita, A., Saitoh, Y., Izumitsu, K. & Tanaka, C. 2012. Molecular organization of the mating type (*Mat*) locus of *Exserohilum monoceras* (*Setosphaeria monoceras*), a bioherbicide agent for *Echinochloa* weeds. *Mycoscience* **53**: 92-101
- Nardini, M., & Dijkstra, B. W., 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 732-737.
- Park, G., Xue, C., Zhao, X., Kim, Y., Orbach, M., & Xu, J.-R. 2006. Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* **18**: 2822-2835.
- Sumita, T., Izumitsu, K., Shigeyoshi, S., Gotoh, S., Yoshida, H., Tsuji, K., Yoshida, H., Kitade, Y., & Tanaka, C. 2020. An adaptor protein BmSte50 interacts with BmSte11 MAPKKK and is involved in host infection, conidiation, melanization, and sexual development in *Bipolaris maydis*. *Mycoscience* **61**: 85-94.
- Tanaka, C., Kubo, Y. & Tsuda, M. 1991. Genetic analysis and characterization of *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol. Res.* **95**: 49-56.
- Truckses, D. M., Bloomekatz, J.E. & Thorner, J. 2006. The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **26**: 912-28.
- Yamamoto, K., Tatebayashi, K., Tanaka, K., & Saito, H. 2010. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol. Cell.* **40**: 87-98.
- Yoshida, H., Shigeyoshi, S., Goto, S. *et al.*, 2025. Dual regulation of appressorium development in the maize pathogen *Bipolaris maydis*: BmOPY2-mediated hydrophobic surface recognition and pectin recognition. *Mycoscience*. in press.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., & Xu, J.-R. 2005. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* **17**: 1317-1329.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S., & Xu, J.-R. 2000. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**: 724-732.



## 糸状菌の細胞壁イメージング及び木材分解酵素の 効率的生産に向けた高密度液体培養の達成

辻 健也, 吉見 啓, 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  
〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

### Development of the cell wall imaging technique and high-density liquid culture for efficient production of wood degrading enzyme production in the filamentous fungi

Kenya Tsuji, Akira Yoshimi, Moriyuki Kawauchi

Laboratory of Environmental Interface Technology of Filamentous Fungi  
Graduate School of Agriculture, Kyoto University  
Kitashirakawaoiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

White-rot fungi are the only organisms capable of completely decomposing wood, and their industrial use is expected to expand for the conversion of agricultural waste and unused biomass into resources. Cell walls are important structures that protect cells from the external environment, but many aspects of the cell wall structure of basidiomycetes, including white-rot fungi, remain unclear. In this study, we developed a method for labeling cell walls polysaccharides with fluorescent probes and succeeded in visualizing the cell wall polysaccharide structure of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. The results of cell wall staining in *Aspergillus oryzae*, an ascomycete fungus, with *P. ostreatus*, suggest that there may be differences between ascomycetes and basidiomycetes in terms of the localization of cell wall glucans. In addition to development of cell wall staining techniques, a strain with a disruption of the gene *pkac2*, which is predicted to be involved in the regulation of multiple cell wall synthesis-related genes, was isolated to modify the cell wall structure of *P. ostreatus*. The  $\Delta pkac2$  strain not only had a reduced amount of  $\beta$ -glucan in the cell wall, but also did not form pellets, enabling high-density culture in liquid medium. The wood-degrading enzyme production capacity of the  $\Delta pkac2$  strain was evaluated, and it was found to have high cellulase and xylanase production capacity. These results indicate that the  $\Delta pkac2$  strain can be efficiently cultured in liquid medium and will be a good candidate for the industrial production of wood-degrading enzymes.

Key words: Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*, Cell wall, Dispersibility, High density culture

### 緒 言

白色腐朽菌は担子菌門に属する、木材を完全に分解することができる唯一の生物群である (Akca *et al.*, 2023; Cohen *et al.*, 2002; Sánchez, 2010)。これらの一部は、食用キノコとして世界中で古くから栽培・利用されてきたが、近年では食用以外の用途への応用にも注目が集まっている。白色腐朽菌の最大の特徴は、木材の難分解性芳香族高分子であるリグニンを分解できる能力である。この能力により、白色腐朽菌は死んだ有機物の炭素を二酸化炭素や土壤栄養素に変換し、炭素の長期固定を抑制し

---

E-mail: kawauchi.moriyuki.8c@kyoto-u.ac.jp

共同研究者：大塚 唯 (京都大学大学院農学研究科).  
Schiphof Kim (京都大学大学院農学研究科).  
名和 義順 (京都大学大学院農学研究科).  
小島 隼星 (京都大学大学院農学研究科).  
矢野 成和 (山形大学大学院理工学研究科).  
中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科).  
田中 千尋 (京都大学大学院地球環境学堂).  
本田 与一 (京都大学大学院農学研究科).

つつ自然の炭素循環を促進する。また、白色腐朽菌が分泌する木材分解酵素（リグニン分解酵素、セルラーゼ、キシラナーゼなど）は、廃棄物や未利用バイオマスを石油代替資源へと変換する手段としても期待されている。さらに、白色腐朽菌のリグニン分解酵素は、環境中のさまざまな有害物質（工業用染料、農薬、化学汚染物質など）の分解にも効果があることから、バイオレメディエーションへの応用にも注目されている（Kumar *et al.*, 2024; Serbent *et al.*, 2024）。白色腐朽菌の中で、ヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）は、モデル生物として広く用いられている。*P. ostreatus* のゲノムデータベースはよく整備されており、さらには高効率な遺伝子改変技術が確立されていることから、木材分解に関する遺伝学・トランスクリプトーム・プロテオーム解析の研究が活発に行われている（Lee *et al.*, 2020; Nakazawa *et al.*, 2024; Salame *et al.*, 2012）。近年では、細胞壁合成に関わる酵素遺伝子や制御因子の解析も進んでいる（Kojima *et al.*, 2024, 2025; Schiphof *et al.*, 2024）。

糸状菌の酵素生産における工業的規模での培養には、液体培養と固体培養の2つの方法が用いられている。特に、培養条件の操作、スケールアップ、制御が容易である液体培養が最も一般的である（Couto & Toca-Herrera, 2007; Vandeloos *et al.*, 2021; Xv *et al.*, 2024）。白色腐朽菌の場合、液体培養と固体培養の両方を用いた実験室レベルでの酵素生産の試みが報告されている（Couto & Toca-Herrera, 2007; Elisashvili, 2012; Kachlishvili *et al.*, 2021）。またラッカーゼについては、複数の白色腐朽菌を用いたバイオリアクタースケールでの生産について検討がなされている（Couto & Toca-Herrera, 2007; Elisashvili, 2012; Kachlishvili *et al.*, 2021）。これまでの研究で、液体攪拌培養条件下でペルオキシダーゼ VP2 を過剰生産する *P. ostreatus* の組換え株を単離している（Tsukihara *et al.*, 2006）。この研究では、液体培養条件を最適化することで 21 mg/L の VP2 酵素が得られたが、工業的な酵素生産にはより高い酵素収量が望まれる。

多くの糸状菌は液体培養時に菌糸塊を形成することが知られている。そのため液体培養効率を高める方法のひとつに、菌糸の分散性を高めて高密度に培養する方法がある（Miyazawa *et al.*, 2016, 2019）。麹菌（*Aspergillus oryzae*）では、菌糸が野生株よりも分散した株を作出することで、異種発現による酵素生産能力が約5倍に向上した。通常、ペレット内部の菌糸は物質を輸送せず死滅する。一方分散株では、培地と接触する菌糸塊の表面積が増加し、より多くの菌糸塊全体で物質輸送が活発に行われるため、酵素産生の効率が高まる可能性がある（Grimm *et al.*, 2005; Sakuragawa *et al.*, 2021）。*Aspergillus nidulans* では以前、細胞壁多糖を合成する酵素である  $\alpha$ -グルカン

合成酵素の遺伝子破壊によって、菌糸塊の分散性が改善された（Miyazawa *et al.*, 2020）。従って、細胞壁構造が分散性の主要因であると推測される。

真菌の細胞壁は、菌糸の構造的強度や環境適応に必須の構造である。主に多糖から構成されており、アルカリ処理や単糖分析により、分岐構造を持つ  $\beta$ -グルカンやキチンが主要成分であることが示されている（Bartnicki-García, 1999; Fontaine *et al.*, 2000; Gow *et al.*, 2017）。近年では、固体 NMR 法を用いた細胞壁の構造解析が進められ、担子菌 *Schizophyllum commune* と子囊菌 *Aspergillus fumigatus* の構造が比較されている（Ehren *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2018）。その結果、多糖の構成には共通点がある一方で、 $\beta$ -グルカンの分布などに大きな構造的違いがあることが明らかとなった。たとえば、*S. commune* では細胞壁全体に  $\beta$ -グルカンが豊富に存在するが、*A. fumigatus* では中間層に限られており、さらにどちらかにしかない多糖（アラビナン、 $\beta$ -1,4-グルカン、フコースなど）も発見された。ただし、これらのモデルは菌糸を破碎して分析しているため、多糖の局在に関しては推測が含まれており、より精密なモデルの構築には非破壊的な細胞壁解析が求められている。

これまでの研究で、*P. ostreatus* を用いて  $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子の破壊を実施したところ、子囊菌の知見とは異なり、液体培養時の菌糸塊形成に変化は見られなかった（Kawauchi *et al.*, unpublished）。さらに、その他複数の細胞壁合成遺伝子の破壊を行っても液体培養時の菌糸塊形成には変化が見られなかった。上述のように担子菌と子囊菌においては大幅に細胞壁構造の違いがあることが推測されることから、詳細な細胞壁構造の分からない白色腐朽菌における液体高密度培養の達成のためには、細胞壁構造をダイナミックに変え得るようなシグナル伝達因子の改変が有効である可能性が考えられた。プロテインキナーゼ A (PKA) は、サイクリック AMP (cAMP) によって活性化されるキナーゼであり、触媒サブユニット PKAc と制御サブユニットから構成されている。担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* におけるこれまでの研究から、PKA は cAMP-PKA 経路において細胞壁に関連する転写因子をリン酸化することにより、細胞壁合成を制御することが示されている（O'Meara *et al.*, 2010; Kronstad *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Caza & Kronstad, 2019）。例えば、転写因子 Rim101 は PKA によってリン酸化され、プロテアーゼ Rim13 によって切断され、核に局在し、そこで細胞壁のリモデリングに関与する遺伝子の発現を制御する（Caza & Kronstad, 2019）。さらに、細胞壁完全性 (CWI) 経路遺伝子 (BCK1, MKK2, MPK1) のいずれかのキナーゼの欠失は、細胞内 cAMP レベルを低下させることによって

cAMP/PKA 経路に影響を与えることから、この菌における CWI 経路と cAMP/PKA 経路のクロストークが示唆されている (Donlin *et al.*, 2014). 多くの糸状菌は、2つのパラログな PKA 触媒サブユニット遺伝子 (例えば、*C. neoformans* の *PKA1* と *PKA2*, *Ustilago maydis* の *adr1* と *uka1*) を持っている (Choi *et al.*, 2015). PKAc オルソログ遺伝子の破壊は、様々な真菌において細胞壁合成を含む様々な生物学的活性に影響を及ぼすことが報告されている (Dürrenberger *et al.*, 1998; Fuller *et al.*, 2011; de Assis *et al.*, 2022). さらに、*U. maydis* では、PKAc オルソログ遺伝子 *adr1* の遺伝子破壊が細胞形態を変化させることが見出され、第二の PKA 触媒サブユニット遺伝子 *uka1* 欠損変異体は、形態と病原性において野生型細胞と差がないことが明らかとなっている (Dürrenberger *et al.*, 1998). 以前の研究で、*P. ostreatus* に2つの *pkac* 遺伝子、*pkac1* と *pkac2* が存在することを明らかにしている (Toyokawa *et al.*, 2016). *C. neoformans* における *PKA1* 破壊と *U. maydis* における *adr1* 破壊の結果から、これらのオルソログである *pkac2* の遺伝子破壊は、ヒラタケにおける PKA 機能不全を引き起こし、結果的に細胞壁構造にも影響を与えることが可能ではないかと推測された。

本研究では、ヒラタケの細胞壁構造における未解明な点を明らかにすることを目的とし、生きた栄養菌糸における細胞壁多糖の可視化を行った。さらに、得られた可視化技術を用いて、高密度培養を可能とする  $\Delta pkac2$  株における、細胞壁の変化と木材分解酵素生産性の評価を実施した。

## 実験方法

### 培養条件

本実験では、*P. ostreatus* 20b 株を基準株として使用した (Salame *et al.*, 2012). 培養には、酵母エキス、麦芽エキス、およびグルコース (YMG) 培地を、90mm のペトリ皿に 2% (w/v) の寒天で固化したものを使用し、28℃ の暗所で培養した (Rao & Niederpruem, 1969). 液体培養の場合は、YMG 寒天培地上で培養した菌糸体から、コルクボーラー (Φ9mm) を使用して作成した 8 個の菌糸プラグを 40mL の YMG 液体培地に植菌し、28℃、120rpm で 5 日間振とう培養した後、Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG, Malters, Switzerland) でホモジナイズし、その溶液 200 $\mu$ L を新たなオートクレーブ処理済みの YMG 液体培地 40mL に植菌した。28℃ で 120rpm の 2 日間振盪培養した。

### *P. ostreatus* 20b 株の形質転換

*P. ostreatus* の *pkac2* を相同組換えによって *hph* (ハイグロマイシン耐性遺伝子) に置換する破壊カセットを設計した。なお、破壊カセットの作製には、フュージョン PCR 法を用いた (Szewczyk *et al.*, 2006). 形質転換は、20b 株を親株として使用した (Salame *et al.*, 2012). 20b 株は YMG 液体培地で 4 日間振盪培養後、*Aspergillus niger* 由来のセルラーゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Yatalase-Plus (TaKaRa bio, Shiga, Japan), および *Trichoderma longibrachiatum* 由来の  $\beta$ -グルカナターゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてプロトプラストを調製した。その後、ポリエチレングリコール/カルシウムクロライド (PEG/CaCl<sub>2</sub>) 法を用いてプロトプラストに破壊カセットを導入した (Nakazawa *et al.*, 2016; Salame *et al.*, 2012).

### *pkac2* 遺伝子の破壊確認

20b 株および遺伝子破壊株から抽出された DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行った (Izumitsu *et al.*, 2012). 破壊カセットの組み込みは、増幅長の変化により確認し、標的遺伝子の欠如は PCR 増幅の有無により確認した。

### 細胞壁多糖の蛍光標識

100mL フラスコに YMG 培地 40mL を分注し、オートクレーブ処理し、コルクボーラー (Φ8mm) を使用して作成した菌糸プラグ 10 個を植菌した。28℃、120rpm で 5 日間振とう培養した後、Polytron ホモジナイザー (Kinematica AG, Malters, Switzerland) でホモジナイズし、その溶液 200 $\mu$ L を新たなオートクレーブ処理済みの YMG 液体培地 40mL に植菌した。28℃ で 120rpm の 2 日間振とう培養した後、菌糸体は培養液を遠心分離して回収し、10mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄した。主要な多糖の染色には、 $\alpha$ -1,3-グルカン結合ドメイン融合型 RFP (AGBD-RFP, 最終濃度 100pmol/mL) (Otsuka *et al.*, 2022a),  $\beta$ -1,3-グルカン結合ドメイン融合型 GFP (BGBD-GFP, 最終濃度 100pmol/mL) (Otsuka *et al.*, 2022b) を加え、サンプルを氷上で 2 時間放置した後、10mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡 STELLARIS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用し、対物レンズは HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 を用いた。顕微鏡画像は 10 $\mu$ m 厚の 36 枚のスライス画像をスタックして形成した。励起光は、GFP, RFP に対してそれぞれ 475nm, 554nm を設定し、蛍光検出は 505, 591nm とした。菌糸の自己蛍光は極めて弱く、無視できる程度であった。



### 電子顕微鏡観察

20b株および遺伝子破壊株を、28℃で10日間、20mLのYMG寒天培地で培養した。その後、菌糸体を、スカルペルを使用して1×3mmに切り出した。菌糸体は、0.1Mリン酸緩衝液（PB）（pH 7.4）中に4%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドを添加した溶液を用いて、4℃で一晩固定した。その後、0.1M PB中に1%オスミウム四酸化物を添加した溶液で2時間固定した。透過型電子顕微鏡（TEM）の観察では、固定した菌糸体は、エタノールの段階的な濃度系列で脱水処理した後、エポキシ樹脂（LUVEAK-812）で包埋した。超薄切片は、超微切片機（EM UC7; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）を使用して作成した。切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し、JEM-1400Flash透過型電子顕微鏡（JEOL, Tokyo, Japan）で観察した。走査型電子顕微鏡（SEM）観察では、固定した菌糸体を段階的な濃度のエタノールで脱水し、*t*-ブタノールに浸した後、-20℃で凍結した。その後、*t*-ブタノールを昇華させた。その後、イオンコーター（JEC-3000FC; JEOL, Tokyo, Japan）を用いて白金パラジウム合金でコーティングし、SEM（JSM-7900F; JEOL, Tokyo, Japan）で観察した。

### 液体培養時の菌糸塊と栄養菌糸の形態観察

菌糸の形態と成長率の観察のため、オートクレーブ処理したYMG寒天培地20mLをペトリ皿（Φ90mm）に注ぎ、コルクボーラー（Φ8mm）で作成した菌糸プラグを各プレート中央に植菌した。28℃の暗所で10日間の静置培養後、スキャナーを使用して菌糸の画像を撮影し、ノギスで菌糸コロニーの直径を測定した。

気中菌糸観察のため、10mLのYMG寒天培地を試験管（Φ16mm）に分注し、オートクレーブ処理し、コルクボーラー（Φ12mm）で作成した菌糸プラグを各培地の中心に植菌した。28℃の暗所で10日間静置培養した後、気中菌糸を観察した。

続いて、液体培地上での菌糸体の乾燥重量を測定するため、コルクボーラー（Φ8mm）を使用して作成した菌糸プラグをオートクレーブ処理したYMG液体培地40mLに植菌した。28℃の暗所で14日間静置培養した後、菌糸体を洗浄し、凍結乾燥した。凍結乾燥した菌糸の重量は電子天秤で測定した。

液体培養におけるペレット形成の顕微鏡観察には、YMG寒天培地上で培養した菌糸体から、コルクボーラー（Φ9mm）を使用して作成した8個の菌糸プラグを40mLのYMG液体培地に植菌し、28℃、120rpmで5日間振とう培養した後、Polytronホモジナイザー（Kinematica AG, Malters, Switzerland）でホモジナイズし、その溶液200μLを新たなオートクレーブ処理済み

のYMG液体培地40mLに植菌した。28℃で120rpmの3日間振とう培養した。培養時菌糸の一部を回収し、光学顕微鏡による菌糸塊の観察を実施した。

菌糸体重量測定のために、液体培養におけるペレット形成の顕微鏡観察と同様の方法で、培養を実施し、48、72、96、120時間培養したフラスコからそれぞれ菌糸体を回収した。得られた菌糸体は、蒸留水で洗浄後、ペーパードライした後に凍結乾燥し、重量を測定した。

菌糸塊ペレットの平均粒径は、レーザー回折式粒度分布（PSD; particle size distribution）測定装置（PARTICA LA-960V2; Horiba, Kyoto, Japan）を用い、連続攪拌下で、測定範囲10nm～3000μmで測定した。PSD分析のために、YMG寒天培地上で培養した菌糸体から、コルクボーラー（Φ9mm）を使用して作成した8個の菌糸プラグを40mLのYMG液体培地に植菌し、28℃、120rpmで5日間振とう培養した後、Polytronホモジナイザー（Kinematica AG, Malters, Switzerland）でホモジナイズし、その溶液200μLを新たなオートクレーブ処理済みのYMG液体培地40mLに植菌した。28℃で120rpmの2日間振とう培養した後、菌糸体を回収した。得られた菌糸体を10mlの蒸留水に分散させ、5分間超音波処理した。

### 主要細胞壁多糖成分の含有割合測定

YMG寒天培地上で培養した菌糸体から、コルクボーラー（Φ9mm）を使用して作成した8個の菌糸プラグを40mLのYMG液体培地に植菌し、28℃、120rpmで5日間振とう培養した後、Polytronホモジナイザー（Kinematica AG, Malters, Switzerland）でホモジナイズし、その溶液200μLを新たなオートクレーブ処理済みのYMG液体培地40mLに植菌した。28℃で120rpmの3日間振とう培養した。培養後、菌糸体を回収し、液体窒素で凍結させながら乳棒・乳鉢を用いて菌糸を粉砕し、凍結乾燥した。

α-およびβ-グルカンの含有割合は、β-Glucan Assay Kit（Yeast and Mushroom）（Megazyme, Bray, Ireland）を用いて測定した。なお、測定には規定の半分量の試薬と乾燥菌糸体を用いた。0.01gの乾燥菌糸体に4N HCl 400μLを加え、96℃で16時間加熱した後、オートクレーブ処理した水400μLを加えて冷却し、粉末活性炭を加えた。1時間静置した後、サンプルを遠心分離し、上清300μLをオートクレーブ処理した蒸留水2.63mlと8N NaOH 70μLで10倍希釈し、中和した。その後、D-Glucosamine Assay Kit（Megazyme, Bray, Ireland）を用いてキチンの含有割合を測定した。

qRT-PCRによる細胞壁多糖合成酵素遺伝子の発現変動解析

YMG寒天培地上で培養した菌糸体から、コルクボーラー(Φ9mm)を使用して作成した8個の菌糸プラグを40mLのYMG液体培地に植菌し、28℃、120rpmで5日間振とう培養した後、Polytronホモジナイザー(Kinematica AG, Malters, Switzerland)でホモジナイズし、その溶液200μLを新たなオートクレーブ処理済みのYMG液体培地40mLに植菌した。28℃で120rpmの2日間振とう培養した。培養後、菌糸体を回収し、液体窒素で凍結させながら乳棒・乳鉢を用いて菌糸を粉碎し、凍結乾燥した。この粉末菌体からFastGene RNA Premium Kit(NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用いてRNAを抽出した。得られたRNAサンプルは、PrimeScript RT Master Mix(TaKaRa bio, Shiga, Japan)を使用して逆転写を行った。qRT-PCRにはPowerTrack SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)とQuantStudio 5(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用し、Pfaffl法に従って定量化した(Pfaffl, 2001)。

#### 親水性試験

各株をYMG寒天培地で10日間培養し、コルクボーラーでΦ10mmのプラグを切り出した。菌糸表面に蒸留水10μLを滴下し、60秒後の水滴の様子を観察した。

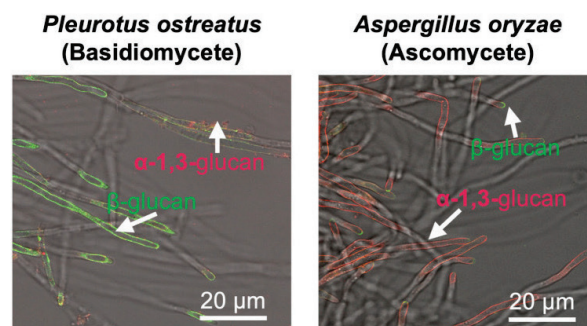
#### 細胞壁ストレスへの耐性試験

細胞膜および酸化ストレス耐性を評価するため、オートクレーブ処理したYMG寒天培地に、0.02%のナトリウムドデシルスルホン酸(SDS)と5mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した。さらに、細胞壁合成阻害剤に対する耐性を調査するため、500μg/mLのCalcofluor White(CFW)と100μg/mLのMicafungin(MF)を用いた。薬剤を添加しないYMG寒天培地をコントロールとした。コルクボーラー(Φ8mm)で作成した菌糸体プラグを各プレートの中央に植菌し、28℃の暗所で10日間培養後、スキャナーで画像を撮影した。さらに、薬剤プレート(D1)とコントロールプレート(D2)上で生育した菌糸体のコロニー直径を、ノギスを用いて測定し、阻害率を算出した：阻害率(%)=(D2-D1)/D2×100。

## 結 果

#### *P. ostreatus* と *A. oryzae* の細胞壁表層多糖の比較

β-グルカンとα-1,3-グルカンを、それぞれBGBD-GFP及びAGBD-RFPを用いて標識し、*P. ostreatus*と*A. oryzae*の細胞壁表層多糖を比較した(Fig.1)。菌糸の染色パターンは両種間で顕著な違いを示し、*P. ostreatus*の



**Fig. 1** Comparison of cell wall surface glucans localization between the basidiomycete *P. ostreatus* and the ascomycete *A. oryzae*.

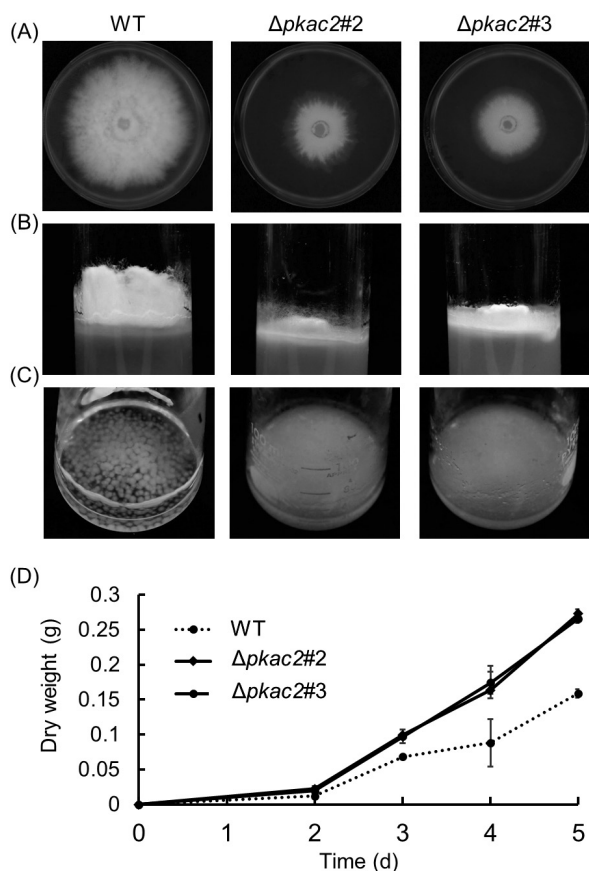
For this comparison, *P. ostreatus* 20b (Salame *et al.*, 2012) and *A. oryzae* NS4  $\Delta$ ligD (Mizutani *et al.*, 2008) strains were cultivated in liquid culture. The obtained mycelia were stained with DCD-tetraRFP ( $\alpha$ -1,3-glucan binding red fluorescent protein) and BGBD-GFP ( $\beta$ -glucan binding green fluorescent protein) and then observed under a confocal microscope. In this figure,  $\beta$ -glucan and  $\alpha$ -1,3-glucan are depicted as green and red, respectively. Scale bar: 20μm

細胞壁表面層は主にβ-グルカンで構成されているのに対し、*A. oryzae*はα-1,3-グルカンで構成されており、これらの2つの糸状菌の細胞壁の外層多糖が明確に異なることが示された。一方、Calcofluor Whiteを用いた菌糸染色結果から先端でキチンが露出していることは、両種で一致して観察された(Otsuka *et al.*, unpublished)。以上の解析から、担子菌*P. ostreatus*と子嚢菌*A. oryzae*の細胞壁表層多糖の可視化に成功し、細胞壁表層のグルカンの配置が大きく異なることを明らかとした。

#### *pkac2*の破壊は液体培養における菌糸の形態を変化させる

タンパク質キナーゼPKAの触媒サブユニット遺伝子*pkac2*を、*P. ostreatus* 20b株(*ku80*破壊株)を宿主とした相同組換え法を用いて破壊し、 $\Delta$ *pkac2*株を単離した。PCRによって、それぞれの形質転換体の遺伝子破壊カセットの組込みと標的遺伝子の欠損を確認した。遺伝子破壊が確認された、 $\Delta$ *pkac2*#2および#3株を以降の実験に使用した。なお、親株の20b株を野生株(WT)として使用した。

$\Delta$ *pkac2*株のYMG寒天培地での成長は非常に遅く(Fig.2A)、気中菌糸は野生株と比較し顕著に短かった(Fig.2B)。しかし、液体培地では $\Delta$ *pkac2*株は野生株よりも速く成長し、目視でも分かるほどの非常に高い菌糸分散性が確認された(Fig.2C)。 $\Delta$ *pkac2*株の菌糸体乾燥重量は、培養2日目から増加しており、5日目には野



**Fig. 2** Phenotypes of the wild-type (WT) and  $\Delta pkac2$  strains in yeast and malt extract in glucose (YMG) liquid culture and YMG agar.

(A) Growth morphology on YMG agar medium 10 d.  
 (B) Aerial hyphae formation on YMG agar at 10 d.  
 (C) Mycelial pellet formation in liquid culture at 3 d.  
 (D) Mycelial dry weight of the WT and  $\Delta pkac2$  in 40mL of YMG. The bars indicate the standard deviations of three biological replicates ( $n = 3$ ).

生株の2倍の菌体乾燥重量を示した (Fig. 2D).

液体培養における菌糸塊形成のより詳細な解析を行うため、光学顕微鏡による菌糸塊の観察をおこなった。野生株は時間経過とともに大きな菌糸塊を形成したのに対し、 $\Delta pkac2$ 株の菌糸塊は小さく分散しているような様子が観察された (Fig. 3A)。そこでレーザー回折による粒子分布測定 (PSD 解析) を行った結果、野生株の菌糸塊粒子径は主に 1mm 程度に分布する一方で、 $\Delta pkac2$ 株は主に 10 $\mu$ m 程度に分布し菌糸塊が 1/100 程度に小さくなっていることが明らかとなった (Fig. 3B)。以上の結果から、*P. ostreatus*では *pkac2*の破壊により、野生株で液体培養時に形成される菌糸塊が分散し、液体高密度培養が可能になることが明らかとなった。

### *pkac2*の破壊は細胞壁の構造を変化させる

TEM 画像から、野生株の細胞壁の平均厚さは約 100nmであったのに対し、 $\Delta pkac2$ の細胞壁は非常に薄く、約 45nmであった (Fig. 4B)。SEM 画像により、 $\Delta pkac2$ 株の菌糸の直径が野生株よりも小さいことがさらに確認された (Fig. 4C)。

キチンと  $\alpha$ -グルカンの量は有意な変化は観察されなかったが、 $\Delta pkac2$ 株では野生株と比較して  $\beta$ -グルカンの量が有意に減少していた (Fig. 5A-C)。さらに、本研究で開発した細胞壁多糖染色法を用いて細胞表面多糖の標識を行った。その結果野生株の細胞壁表面は  $\beta$ -グルカンで覆われていることが確認された一方、 $\Delta pkac2$ 株では  $\beta$ -グルカンに由来する緑色蛍光の強度が低下していた (Fig. 5D)。これらの結果は、 $\Delta pkac2$ 株における  $\beta$ -グルカンの減少と細胞壁の薄化を反映している可能性がある。

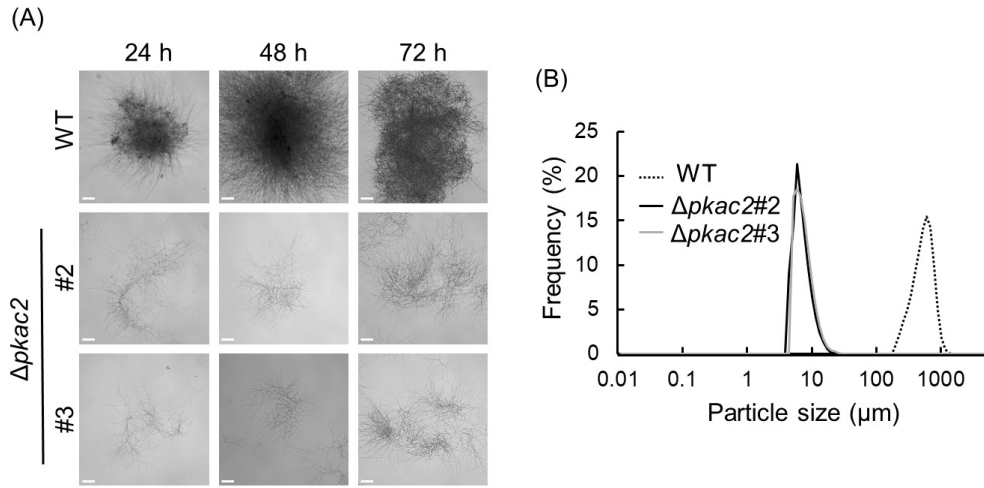
細胞壁合成関連遺伝子の遺伝子発現を解析したところ  $\Delta pkac2$ 株において、複数の遺伝子の発現変化が見られた。そのうち、 $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *ags1*の発現は野生株と比較して約 50%減少したほか、 $\beta$ -グルカン合成酵素 *fsk1*と *fsk2*の発現は qRT-PCR 解析で約 250% WTより増加した (Fig. 5E)。さらに、9つのキチン合成酵素遺伝子の中で、*chs5*のみが  $\Delta pkac2$ 株で有意に発現が上昇していた。これらの細胞壁合成酵素遺伝子の転写変化は、 $\Delta pkac2$ 株の細胞壁成分の変化とは一致しないことが明らかとなった (Fig. 5A-C)。

### $\Delta pkac2$ 株における菌糸の疎水性低下

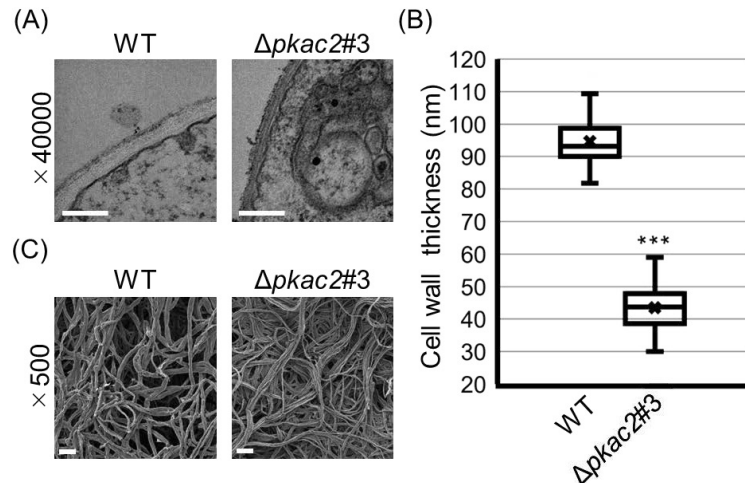
$\Delta pkac2$ 株は約 1分で水滴が吸収されたが、野生型株の表面に滴下した水滴は変化していなかった (Fig. 6A)。したがって  $\Delta pkac2$ 株では、菌糸の表面疎水性が低下していることが明らかとなった。以前の研究で *P. ostreatus*では、ハイドロフォビンが、菌糸体表面の疎水性維持において必須の役割を担うことが示されている (Han et al. 2023)。 *P. ostreatus*で発現する主要なハイドロフォビン遺伝子 *vmh2*, *vmh3*, および *hydph16*の qRT-PCR 解析を行った結果、これらの遺伝子の発現レベルは  $\Delta pkac2$ 株ではほぼゼロに近かった (Fig. 6B)。したがって、 $\Delta pkac2$ 株の菌糸の表面疎水性の低下の一因としてハイドロフォビン遺伝子の発現量低下が考えられた。

### $\Delta pkac2$ 株におけるストレス耐性の低下

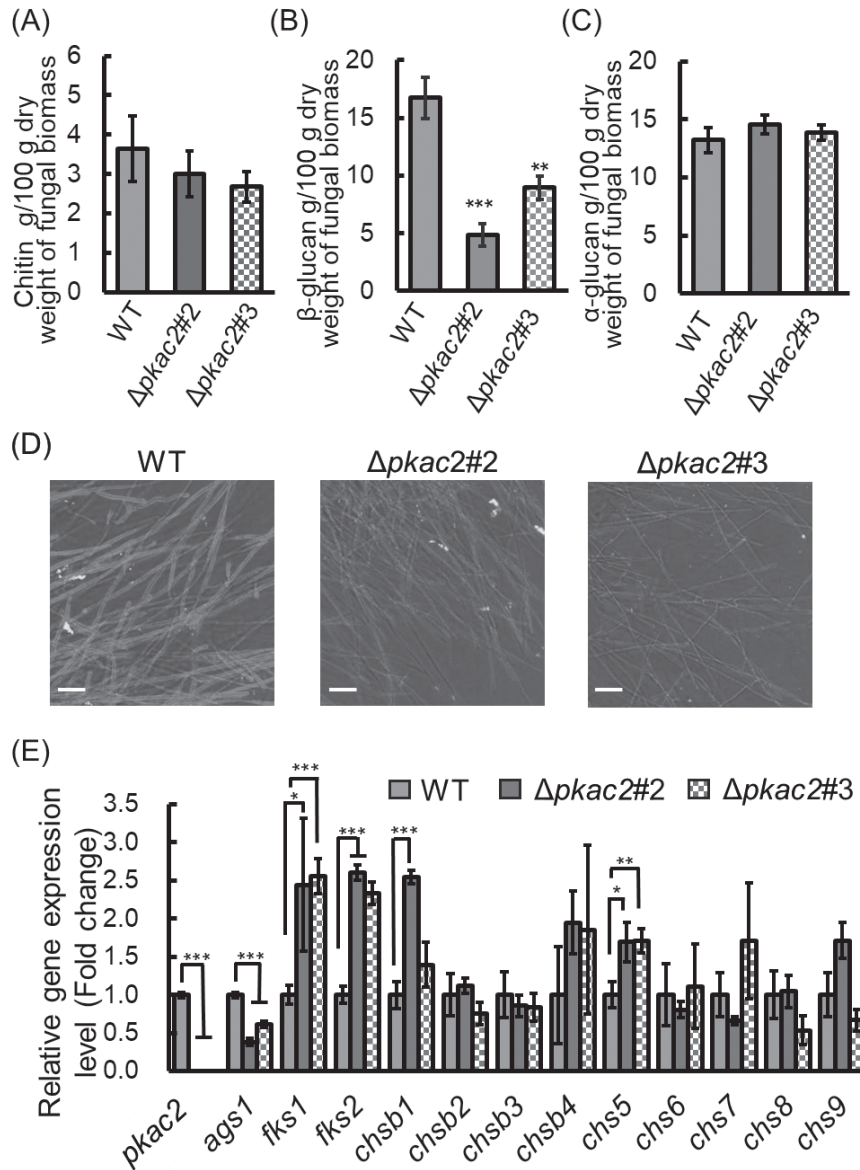
*pkac2*の破壊は、細胞壁阻害剤 (Calcofluor White および Micafungin)、細胞膜ストレス (SDS)、そして特に酸化ストレス ( $H_2O_2$ )に対するストレス耐性の全般的な低下を引き起こした (Fig. 7)。これらの結果は、*pkac2*の破壊が気中菌糸形成異常と成長遅延を引き起こ



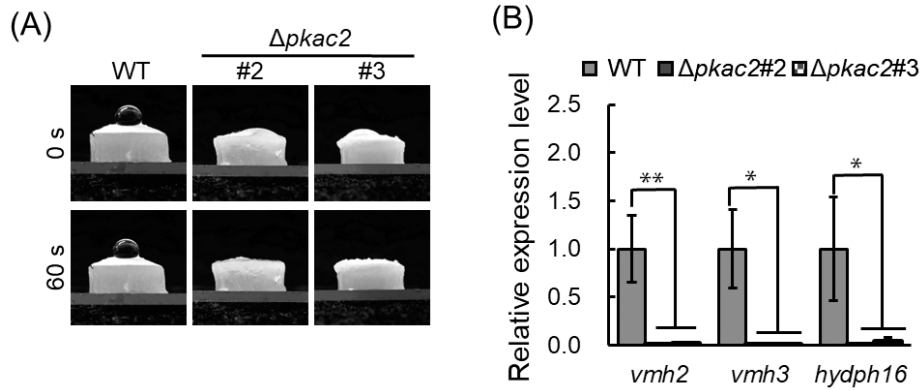
**Fig. 3** Observation of mycelial pellet formation. (A) Microscopic observation of pellet formation of the wild-type (WT) and  $\Delta pkac2$  strains after culturing in YMG liquid at 28°C with shaking. Scale bar: 100 $\mu\text{m}$ . (B) Average particle size of the pellets measured by a laser diffraction particle size distribution (PSD) analyzer. The vertical axis indicates the percentage of a particular mycelial pellet size in the water.



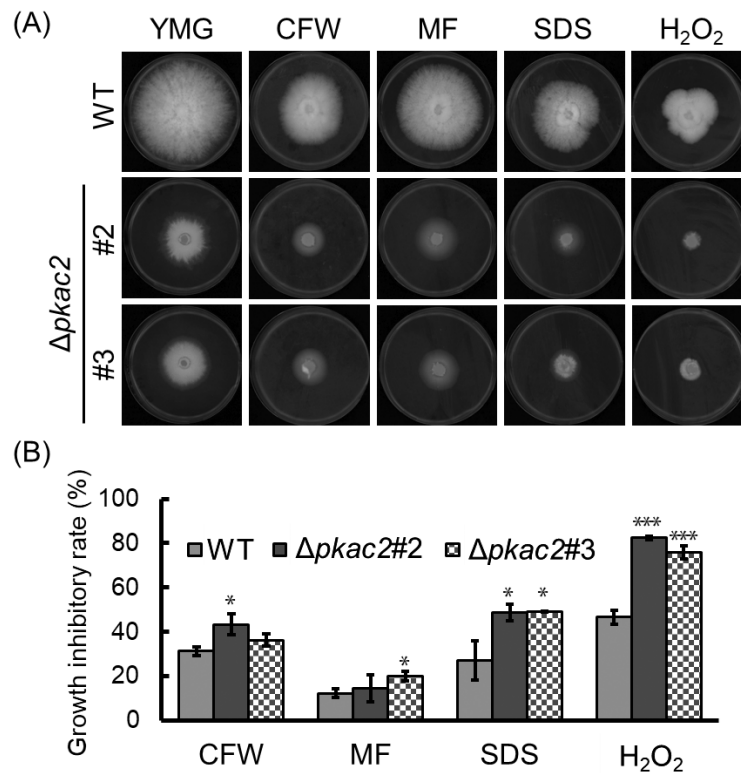
**Fig. 4** Observation of mycelia and cell wall. (A) Transmission electron microscopy (TEM) images. Scale bar: 200nm. (B) Cell wall thickness measured during TEM observation ( $n = 50$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance  $t$ -test (\*\*\*)  $P < 0.001$ . (C) Scanning electron microscopy (SEM) images. Scale bar: 10 $\mu\text{m}$



**Fig. 5** Cell wall content, structure, and relative gene expression levels of the wild-type (WT) and  $\Delta pkac2$  strains. The relative percentage of (A) chitin, (B)  $\beta$ -glucan, and (C)  $\alpha$ -glucan. The bars indicate the standard deviations of three biological replicates ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance  $t$ -test (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). (D)  $\alpha$ -1,3-glucan and  $\beta$ -1,3-glucan probing of *P. ostreatus* mycelia. Mycelia were stained by BGBD-GFP and AGBD-RFP. Scale bar: 20  $\mu$ m. (E) The relative gene expression levels of genes encoding cell wall synthases. RNA was extracted from liquid culture after 48h, and quantitative reverse-transcription real-time PCR was performed. *pkac2*: protein kinase A catalytic subunit, *ags1*:  $\alpha$ -glucan synthase, *fks1*–*fks2*:  $\beta$ -glucan synthase, *chs1*–*chs4*: basidiomycete-specific chitin synthase, *chs5*–*chs9*: chitin synthase. The bars indicate the standard deviations of three biological replicates ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance  $t$ -test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Fig. 6** Cell surface hydrophobicity of the wild-type (WT) and  $\Delta pkac2$  strains. (A) Disappearance of water droplets after 60s. (B) Relative gene expression levels of primary hydrophobin genes using RNA extracted from liquid culture after 48h, and quantitative reverse-transcription PCR was performed. The bars indicate the standard deviations of three biological replicates ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance  $t$ -test ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ).



**Fig. 7** Drug sensitivity of the wild-type (WT) and  $\Delta pkac2$  strains. (A) The phenotypes of all strains grown on yeast and malt extract with glucose (YMG) agar medium supplemented with 5mM  $H_2O_2$ , 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 $\mu$ g/mL micafungin (MF), and 500 $\mu$ g/mL Calcofluor White (CFW) for 10 d. (B) The growth inhibition rates of all the strains in (A). The bars indicate the standard deviations. Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance  $t$ -test ( $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ ).

すだけでなく、正常なストレス応答に必須であることが明らかとなった。さらに、 $\Delta pkac2$ は $H_2O_2$ に対して特に感受性が高く、阻害率が約80%に達し、PKAc2が正常な酸化ストレス耐性を維持するために重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### $\Delta pkac2$ 株を用いた木材分解酵素生産

液体振盪培養における $\Delta pkac2$ 株の培養液中のセルラーゼ活性とキシラナーゼ活性は、菌糸乾燥重量の増加以上に野生株よりも高くなっていた (Otsuka *et al.*, 2025)。RNA-seq解析の結果からは、推定セルラーゼ遺伝子および推定キシラナーゼ遺伝子が $\Delta pkac2$ 株で発現上昇していることが示唆された一方、ラッカーゼをコードする遺伝子の遺伝子発現量は減少しており、PKAc2がそれらの遺伝子の転写調節に関与していることが示唆された (Otsuka *et al.*, 2025)。現在メカニズムを含めた詳細な解析を実施中であるものの、 $\Delta pkac2$ 株セルラーゼおよびキシラナーゼを生産する高い潜在能力を有していることが明らかとなった。

## 考 察

多糖標識蛍光プローブを用いた顕微鏡観察により、担子菌 *P. ostreatus* と子囊菌 *A. oryzae* の間で、細胞壁表層多糖に顕著な違いが認められた (Fig.1)。最大の違いは、*P. ostreatus* の全体的な菌糸が $\beta$ -グルカンで覆われているのに対し、*A. oryzae* では $\alpha$ -1,3-グルカンで覆われている点である。加えてこれまでの研究で、*P. ostreatus* の細胞壁中の $\alpha$ -1,3-グルカン量は *A. oryzae* の半分以下であった (data not shown)。これらの結果は、担子菌と子囊菌に分類される糸状菌の細胞壁構造の大きな違いを示唆するものであり、過去の固体NMRの結果とも一致する (Ehren *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2018)。本研究で開発した細胞壁多糖の蛍光イメージング法は、これまでの抗体を用いた染色法と比較して、細胞固定が不要であり且つ短時間でのイメージングが可能である。そのため、これまで技術的に難しかった糸状菌生細胞を用いた細胞壁多糖イメージングが本手法により可能となる。今後、本手法と細胞壁溶解酵素を組み合わせた細胞壁多糖の層構造解析を幅広い子囊菌・担子菌で実施していくことで細胞壁多糖構造の門レベルでの特徴が明らかになるものと考えている。

本研究では、*pkac2*破壊株が、液体培養において高い菌糸分散性を示すことを明らかとした。顕微鏡観察により、 $\Delta pkac2$ 株は非常に小さなペレットのみを形成することが確認された。加えて、PSD測定により、 $\Delta pkac2$ 株ペレットのサイズは親株ペレットの約1/100であるこ

とが確認された (Fig.3B)。液体培養における $\Delta pkac2$ 株のバイオマスは野生株の約2倍であった。そのため、*P. ostreatus*において*pkac2*破壊により高密度培養が可能であると考えられた (Fig.2D)。

$\Delta pkac2$ 株の細胞壁の厚さは、野生型株の約1/2であることが判明した (Fig.4B)。細胞壁多糖の測定と染色解析では、主要な細胞壁多糖である $\beta$ -グルカンが減少していることが示された (Fig.5B, D)。これらの結果は、*pkac2*が $\beta$ -グルカン層の正常な形成に不可欠であることを示している。細胞壁合成酵素遺伝子の相対的転写レベルを調査したところ、 $\Delta pkac2$ では $\beta$ -グルカン合成酵素の転写レベルが増加した一方で、 $\alpha$ -グルカン合成酵素の転写レベルは減少した (Fig.5E)。 $\Delta pkac2$ 株における $\beta$ -グルカンの含有割合の減少と $\beta$ -グルカン合成酵素の発現増加は、一見矛盾する結果である。 $\alpha$ -グルカン含有割合が変化しなかったこと (Fig.5C) から、 $\beta$ -グルカン含有割合の変動がグルカン合成の原料であるUDP-グルコースの供給と関連している可能性は低いと考えられる (Gow *et al.*, 2017)。真菌の細胞壁における $\beta$ -グルカンの合成は、線状グルカン鎖の合成、加水分解、分枝、伸長からなる複雑なプロセスである (Gow *et al.*, 2017)。その後、成熟した $\beta$ -グルカン鎖は細胞壁のキチンと架橋される (Gow *et al.*, 2017)。子囊菌では、 $\beta$ -1,3-グルカノシルトランスフェラーゼ遺伝子 *gel1* および *gel2* の破壊は、*Aspergillus fumigatus* の細胞壁 $\beta$ -グルカン含量の減少を引き起こした (Zhao *et al.*, 2013)。また、キチンと $\beta$ -グルカンを架橋するグリコヒドロラーゼファミリー16型 (GH16) 酵素である *Crh1* と *Crh2* の破壊は、子囊菌酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁グルカン含量の減少を引き起こした (Blanco *et al.*, 2015)。したがって、*pkac2*の破壊は、線状グルカン鎖の合成後における $\beta$ -グルカン層の形成プロセスに影響を及ぼし、細胞壁中の $\beta$ -グルカン含有割合の減少を引き起こした可能性がある。

細胞壁合成酵素遺伝子発現と細胞壁成分プロファイルの乖離は、キチンと $\alpha$ -グルカンの測定でも観察された (Fig.5)。キチンの場合、 $\Delta pkac2$ 株では *chs5* の発現が1.7倍に増加した。これまでの研究におけるRNA-seq解析では、*P. ostreatus* の9つの *chs* 遺伝子の中で *chs5* の絶対発現量は相対的に低かった (Kawauchi *et al.*, unpublished)。したがって、この過剰発現は $\Delta pkac2$ 株の細胞壁中のキチン量を増加させるには不十分である可能性がある。 $\alpha$ -グルカンの場合、*ags1* の発現は約50%減少したが、 $\Delta pkac2$ 株における $\alpha$ -グルカン量には変化がなかった。よって、*ags1* の発現レベルは菌糸体中の $\alpha$ -グルカン含量と対応していないと考えられる。*P. ostreatus* のキチン合成酵素欠損株においても、*ags1* の遺伝子発現と $\alpha$ -グルカン相対割合の矛盾が観察されている。すなわち、

$\Delta chsb2$ および $\Delta chsb3$ 株では $ags1$ の転写量は増加したが、 $\alpha$ -グルカンの生成量に有意な変化はなかった (Schiphof *et al.*, 2024). これらの矛盾は、 $\alpha$ -グルカンの合成と分解のバランスによる可能性があり、細胞壁におけるグルカン形成メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

*P. ostreatus*の細胞壁形成の複雑なメカニズムを解明するには、 $\Delta pkac2$ 株における細胞壁成分・合成・修飾・分解のさらなる解析が必要である。細胞壁表面の $\beta$ -グルカン減少に加え、 $pkac2$ 遺伝子の破壊は他の影響を及ぼす可能性がある。細胞壁染色時の $\beta$ -グルカン蛍光強度低下は、 $\beta$ -グルカンの減少に加えて、細胞壁表面層を覆う他の多糖類および/またはタンパク質に起因する可能性がある。

本研究では、TEM画像において $\Delta pkac2$ の暗色化した菌糸表面層が観察され (Fig. 4A)、 $pkac2$ の破壊が細胞壁表面層に与える影響を示唆している。TEM画像で観察された菌糸塊表面の変化は、 $\Delta pkac2$ における細胞壁表面タンパク質の発現増加にも起因する可能性がある。タンパク質は多糖類よりも電子密度が高いため、より暗く見えるためである (Chung *et al.*, 2003; Gow *et al.*, 2017)。 $\Delta pkac2$ において細胞壁表面タンパク質の発現が増加していると考えられる一方で、主要な表面構造タンパク質であるヒドロフォビン遺伝子の発現レベルは低下していた (Fig. 6B)。以前の研究で作成したヒドロフォビン遺伝子破壊株 $\Delta vmh2$ および $\Delta vmh3$ 株を用いた液体培養では、野生株と同様のペレットを形成した (data not shown)。ヒドロフォビン遺伝子発現の低下と親水性の低下は $\Delta pkac2$ の重要な表現型であるが、これらの遺伝子の発現低下のみでは菌糸の分散を引き起こすことはないと考えられる。

PKAはcAMP/PKA経路の上流に位置する重要な酵素であり、リン酸化を介して複数のタンパク質の活性を調節する。そのため $pkac2$ の破壊は、菌糸塊の分散以外にも複数の重要な生態機能に影響を与える可能性がある。実際 $\Delta pkac2$ 株では、寒天培地上での成長不良とストレス耐性の低さが見られており、この株の取り扱いを難しくしている。安定した液体高密度培養のためには今後、PKAc2によってリン酸化されるタンパク質を同定・解析することにより、ペレット形成のメカニズムをより深く解明する必要がある。また、下流のタンパク質の遺伝子破壊は $pkac2$ の破壊よりも細胞への影響が小さく、より取り扱いやすい*P. ostreatus*の菌糸塊分散株の単離につながる可能性があり、今後行っていくべき課題と考えている。

結論として、本研究は糸状担子菌である*P. ostreatus*において $pkac2$ 遺伝子の破壊が細胞壁構造を変化させ、これが菌糸の分散を引き起こす可能性を初めて示した。

菌糸分散のメカニズムと細胞壁合成の全体的なシステムについては今後更なる調査を行う必要がある。現在、分散した菌糸株を用いた高密度培養による木材分解酵素の生産に関するさらなる研究を進めている。 $\Delta pkac2$ 株はセルラーゼとキシラナーゼの転写量が増加しており、これらの酵素活性も野生株より高くなっていった (Otsuka *et al.*, 2025)。今後、 $\Delta pkac2$ 株を用いた有用酵素生産についても更なる検討を行う必要がある。

## 要 約

白色腐朽菌は、木材を完全に分解する能力を持つ唯一の生物であり、農産廃棄物や未利用バイオマスの資生化に向けて産業利用の拡大が期待されている。細胞壁は細胞を外界から保護する重要な構造体であるが、白色腐朽菌を含む担子菌の細胞壁構造は未解明の部分が多い。本研究では、細胞壁の主成分である多糖を蛍光プローブで標識する方法を開発し、白色腐朽菌ヒラタケ (*P. ostreatus*)の細胞壁多糖構造の可視化に成功した。さらに子囊菌である麹菌 (*A. oryzae*)の細胞壁染色結果や多糖組成の比較から、子囊菌と担子菌の細胞壁には特に細胞壁多糖のグルカンの量や局在に差がある可能性が見出された。また細胞壁多糖の染色技術の開発に加えて、*P. ostreatus*の細胞壁構造の改変を目的に、複数の細胞壁合成関連遺伝子の発現制御に関わると予測される $pkac2$ の遺伝子破壊株 ( $\Delta pkac2$ )を作製した。 $\Delta pkac2$ 株は細胞壁の $\beta$ -グルカン量が減少していただけでなく、ペレットが形成されず液体培地での高密度培養が可能であった。加えて、 $\Delta pkac2$ 株の木材分解酵素生産能力を評価したところ、高いセルラーゼ及びキシラナーゼ生産能力を持つことを明らかになった。これらの結果は、 $\Delta pkac2$ 株が液体培養下で効率的に培養できることを示しており、木材分解酵素の工業的生産に適した菌株となり得る可能性を示している。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) 名和義順, 河内護之, 中沢威人, 坂本正弘, 阿部敬悦, 田中千尋, 吉見啓, 本田与一. 2022. ヒラタケ*Pleurotus ostreatus*の $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子の同定と機能解析. 2022年度日本農芸化学会大会 (3月15-18日, 京都 (オンライン))
- 2) Kawauchi, M. 2023. Genome editing and cell wall structure synthesis of *Pleurotus ostreatus*. The 1st International Conference on Mycological Science and Engineering (Feb. 19, Changchun, China (Online))
- 3) Schiphof, K., Nawa, Y., Kawauchi, M., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023. Evolutionary and functional analysis of chitin synthesis



- genes in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. 10th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. (ICMBMP) (March 15–16, Malaysia (Online))
- 4) 河内護之, 名和義順, 大塚唯, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 阿部啓悦, 代田修, 矢野成和, 中沢威人, 本田与一. 2023. ヒラタケ細胞壁中に存在する $\alpha$ -1,3-グルカンの解析を中心とした担子菌に特徴的細胞壁構造の解明. 第73会日本木材学会大会 (3月14–16, 福岡)
  - 5) 名和義順, 大塚唯, 河内護之, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 矢野成和, 中沢威人, 本田与一. 2023. 担子菌ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* における $\beta$ グルカン合成酵素遺伝子の同定と機能解析. 第73会日本木材学会大会 (3月14–16, 福岡)
  - 6) 河内護之, 名和義順, 大塚唯, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 阿部啓悦, 矢野成和, 中沢威人, 本田与一. 2023. 木材腐朽菌の細胞壁合成機構の理解を目的としたグルカン合成酵素の解析. 日本応用糖質科学会2023年度 (第72回) 大会 (9月13–15, 沖縄)
  - 7) 大塚唯, 河内護之, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 矢野成和, 本田与一. 2023. 細胞壁多糖三重染色法の開発により見えてきた木材腐朽菌にユニークな細胞壁構造. 日本応用糖質科学会2023年度 (第72回) 大会 (9月13–15, 沖縄)
  - 8) Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Yoichi Honda. Investigating the impacts of basidiomycete chitin synthases on hyphal and cell wall morphology in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Science Virtual 2023 (October 18–19, Malaysia (Online))
  - 9) Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Kojima, H., Yano, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023. Cell wall engineering of the mushroom for the eco-friendly material development. Asian Mycological Congress 2023 (October 10–13, Busan, Republic of Korea)
  - 10) Kawauchi, M. 2024. Mycelial cell wall: breeding targets for the future mushroom materials. 20th ISMS Congress (February 26–29 Las Vegas, USA)
  - 11) 河内護之, 名和義順, 大塚唯, Schiphof Kim, 万雨昕, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 矢野成和, 本田与一. 2024. 白色腐朽菌の細胞壁構造解明を目指した, ヒラタケのグルカン合成酵素遺伝子の機能解析. 第74回日本木材学会大会 (3月13–15日, 京都)
  - 12) 大塚唯, 河内護之, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 矢野成和, 入江俊一, 中沢威人, 本田与一. 2024. 白色腐朽菌ヒラタケを用いた高密度液体培養株の作出. 第74回日本木材学会大会 (3月13–15日, 京都)
  - 13) 河内護之, 大塚唯, Schiphof Kim, 名和義順, 辻健也, 吉見啓, 中沢威人, 田中千尋, 本田与一. 2024. 木材腐朽菌の細胞壁構造及びその合成機構を目指した $\beta$ グルカン合成酵素の機能解析. 日本農芸化学会2024年度東京大会 (3月24–27日, 東京)
  - 14) Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Kojima, H., Yano, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Visualization and engineering of basidiomycete cell wall: for future mycelial materials. 12th International Mycological Congress (August 11–15, Maastricht, Netherland)
  - 15) Kawauchi, M., Otsuka, Y., Endo, S., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2025. Development of a mycelial dispersal strain of white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* for efficient production of wood-degrading enzymes. International Symposium on Wood Science and Technology 2025 (March 17–19, Sendai, Japan).
  - 16) 河内護之, 大塚唯, 遠藤早緒里, Schiphof Kim, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 矢野成和, Elisashvili Vladimir, 中沢威人, 入江俊一, 本田与一. 2025. 白色腐朽菌ヒラタケ $pkac2$ 破壊による高密度液体培養達成及び多糖分解酵素の高生産, 第75会日本木材学会大会 (3月19–21日, 仙台)
- 原著論文
- 1) Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Functional analysis of basidiomycete specific chitin synthase genes in the agaricomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. Fungal Genet. Biol. **172**: 103893
  - 2) Otsuka, Y., Kawauchi, M., Yoshizawa, K., Endo, S., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Elisashvili, V., Nakazawa, T., Irie, T. & Honda, Y. 2024. Disruption of the *pkac2* gene in *Pleurotus ostreatus* alters cell wall structures and enables mycelial dispersion in liquid culture. FEMS Microbiol. Lett. **371**: fnae101
  - 3) Otsuka, Y., Kawauchi, M., Elisashvili, V., Endo, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T., Irie, T. & Honda, Y. 2025. High productivity of cellulase and xylanase enzymes in the mycelial-dispersed *Pleurotus ostreatus*  $\Delta pkac2$  strain. J. Biosci. Bioeng. **140**: 277–283
- その他 (総説・書籍・特許など)
- 1) Nakazawa, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Han, J., Koshi, D., Schiphof, K., Pissabaro, A.G., Ramirez, L. & Honda, Y. 2024. *Pleurotus ostreatus* as a model mushroom in genetics, cell biology, and material sciences. Appl. Microbiol. Biotechnol., **108**: 217
  - 2) 大塚唯, 河内護之, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 中沢威人, 矢野成和, 本田与一. 2024. 細胞壁多糖三重染色法の開発により見えてきた木材腐朽菌にユニークな細胞壁構造. 応用糖質科学 **15**: 55
- 謝 辞
- 本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます. 本研究の遂行にご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の学生諸氏に感謝の意を表します. さらに, 文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(B) (吉見啓 22H02238), 基盤研究(C) (河内護之 22K05763), 海外連携研究 (河内護之 24KK0119), 二国間交流事業 (河内護之 JPJSBP 120238807), 特別研究員奨励費 (大塚唯 23KJ1191) の支援にも感謝致します.
- 文 献
- Акчай, С., Селан, F. & Арслан, R. 2023. Production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) from some waste lignocellulosic

- materials and FTIR characterization of structural changes. *Sci. Rep.* **13**: 12897.
- Bartnicki-Garcia, S. 1999. Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet. Biol.* **27**: 119-127.
- Blanco, N., Sanz, A.B., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Farkaš, V., Hurtado-Guerrero, R. & Arroyo, J. 2015. Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases. *FEBS J.* **282**: 715-731.
- Caza, M. & Kronstad, J.W. 2019. The cAMP/protein kinase A pathway regulates virulence and adaptation to host conditions in *Cryptococcus neoformans*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**: 212.
- Chung, Y.S., Kim J.M., Han D.M., Chae, K.H. & Jahug, K.Y. 2003. Ultrastructure of the cell wall of a null pigmentation mutant, *npgA1*, in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* **41**: 224-231.
- Choi, J., Jung, W.H. & Kronstad, J.W. 2015. The cAMP/protein kinase A signaling pathway in pathogenic basidiomycete fungi: Connections with iron homeostasis. *J. Microbiol.* **53**: 579.
- Cohen, R., Persky, L. & Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 582-594.
- Couto, S.R. & Toca-Herrera, J.L. 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.* **25**: 558-569.
- de Assis LJ, Bain JM, Liddle C *et al.* 2022. Nature of  $\beta$ -1,3-glucan-exposing features on *Candida albicans* cell wall and their modulation. *mBio* **13**: e0260522.
- Donlin, M.J., Upadhyaya, R., Gerik, K.J., Lam, W., VanArendonk, L.G., Specht, C.A., Sharma, N.K. & Lodge, J.K. 2014. Cross talk between the cell wall integrity and cyclic AMP/protein kinase A pathways in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **5**: e01573-14.
- Dürrenberger, F., Wong, K. & Kronstad, J.W. 1998. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5684-5689.
- Ehren, H.L., Appels, F.V.W., Houben, K., Renault, M.A.M., Wösten, H.A.B. & Baldus, M. 2020. Characterization of the cell wall of a mushroom forming fungus at atomic resolution using solid-state NMR spectroscopy. *Cell Surf.* **6**: 100046
- Elisashvili, V. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocesses and products (Review). *Int. J. Med. Mushrooms* **14**: 211-239.
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M. & Latge, J.P. 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* **275**: 27594-27607.
- Fuller, K.K., Richie, D.L., Feng, X., Krishnan, K., Stephens, T.J., Wikenheiser-Brokamp, K.A., Askew, D.S. & Rhodes, J.C. 2011. Divergent Protein Kinase A isoforms co-ordinately regulate conidial germination, carbohydrate metabolism and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **79**: 1045-1062.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P. & Munro, C.A. 2017. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* **5**: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016.
- Grimm, L.H., Kelly, S., Krull, R. & Hempel, D.C. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 375-384.
- Han, J., Kawauchi, M., Schiphof, K., Terauchi, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023a. Features of disruption mutants of genes encoding for hydrophobin Vmh2 and Vmh3 in mycelial formation and resistance to environmental stress in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **370**: fnad036.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T. *et al.* 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* **53**: 396-401.
- Kachlishvili, E., Jokharidze, T., Kobakhidze, A. & Elisashvili, V. 2021. Enhancement of laccase production by *Cerrena unicolor* through fungal interspecies interaction and optimum conditions determination. *Arch. Microbiol.* **203**: 3905-3917.
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M.C.D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F. & Wang, T. 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* **9**: 2747.
- Kojima, H., Izumi, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2025. Role of putative APSES family transcription factor Swi6 in cell wall synthesis regulation in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Biol.* **129**: 101526.
- Kojima, H., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Putative APSES family transcription factor mbp1 plays an essential role in regulating cell wall synthesis in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **175**: 103936.
- Kumar, V., Pallavi, P., Sen, S. K., & Raut, S. 2024. Harnessing the potential of white rot fungi and ligninolytic enzymes for efficient textile dye degradation: A comprehensive review. *Water Environment Res.* **96**: e10959.
- Kronstad, J. W., Hu, G., & Jung, W.H. 2013. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* **21**: 457-465.
- Lee, Y.Y., de Ulzurrun, G.V.D., Schwarz, E.M., Stajich, J.E., Hsueh, Y.P., 2020. Genome sequence of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* strain PC9. *G3*. **11**: jkaa008.
- Nakazawa, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Han, J., Koshi, D., Schiphof, K., Ramirez, L., Pisabarro, A.G. & Honda, Y. 2024. *Pleurotus ostreatus* as a model mushroom in genetics, cell biology, and material sciences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **108**: 217.
- Nakazawa, T., Tsuzuki, M., Irie, T., Sakamoto, M. & Honda, Y. 2016. Marker recycling via 5-fluoroorotic acid and 5-fluorocytosine counter-selection in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Biol.* **120**: 1146-1155.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A. & Abe, K. 2020. The mechanisms of hyphal pellet formation mediated by polysaccharides,  $\alpha$ -1,3-glucan and galactosaminogalactan, in *Aspergillus* species. *Fungal Biol. Biotechnol.* **7**: 10.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Sano, M., Tabata, F., Sugahara, A., Kasahara, S., Koizumi, A., Yano, S., Nakajima, T. & Abe, K. 2019. Both Galactosaminogalactan and  $\alpha$ -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Front. Microbiol.* **10**: 2090.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Zhang, S., Sano, M., Nakayama, M.,

- Gomi, K. & Abe, K. 2016. Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1853–1863.
- Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K. & Gomi, K. 2008. A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 878–889.
- O'Meara, T. R., Norton, D., Price, M. S., Hay, C., Clements, M. F., Nichols, C. B. & Alspaugh, J. A. 2010. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. *PLoS Pathog.* **6**: 1000776.
- Otsuka, Y., Kawauchi, M., Elisashvili, V., Endo, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T., Irie, T. & Honda, Y. 2025. High productivity of cellulase and xylanase enzymes in the mycelial-dispersed *Pleurotus ostreatus*  $\Delta$ *pkac2* strain. *J. Biosci. Bioeng.* in press.
- Otsuka, Y., Sasaki, K., Suyotha, W., Furusawa, H., Miyazawa, K., Konno, H. & Yano, S. 2022a. Construction of a fusion protein consisting of  $\alpha$ -1,3-glucan-binding domains and tetrameric red fluorescent protein, which is involved in the aggregation of  $\alpha$ -1,3-glucan and inhibition of fungal biofilm formation. *J. Biosci. Bioeng.* **133**: 524–532.
- Otsuka, Y., Sato, K., Yano, S., Kanno, H., Suyotha, W., Konno, H., Makabe, K. & Taira, T. 2022b. GH-16 type  $\beta$ -1,3-glucanase from *Lysobacter* sp. MK9-1 enhances antifungal activity of GH-19 type chitinase, and its glucan-binding domain binds to fungal cell-wall. *J. Appl. Glycosci.* **69**: 49–56.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Rao, P.S. & Niederpruem, D.J. 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (*sensu* Buller). *J. Bacteriol.* **100**: 1222–1228.
- Sakuragawa, T., Wakai, S., Zhang, S., Kawaguchi, H., Ogino, C. & Kondo, A. 2021. Accelerated glucose metabolism in hyphae-dispersed *Aspergillus oryzae* is suitable for biological production. *J. Biosci. Bioeng.* **132**: 140–147.
- Salame, T.M., Knop, D., Tal, D., Levinson, D., Yarden, O. & Hadar, Y. 2012. Predominance of a versatile-peroxidase-encoding gene, *mnp4*, as demonstrated by gene replacement via a gene targeting system for *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5341.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1321–1337.
- Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Functional analysis of basidiomycete specific chitin synthase genes in the agaricomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **172**: 103893.
- Serbert, M.P., Magario, I. & Saux, C. 2024. Immobilizing white-rot fungi laccase: Toward bio-derived supports as a circular economy approach in organochlorine removal. *Biotechnol. Bioeng.* **121**: 434–455.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. 2006. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**: 3111–3120.
- Toyokawa, C., Shobu, M., Tsukamoto, R., Okamura, S., Honda, Y., Kamitsuji, H., Izumitsu, K., Suzuki, K., & Irie, T. 2016. Effects of overexpression of *PKAc* genes on expressions of lignin-modifying enzymes by *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1759–1767.
- Tsukihara, T., Honda, Y., Sakai, R., Watanabe, T. & Watanabe, T. 2006. Exclusive overproduction of recombinant versatile peroxidase MnP2 by genetically modified white rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *J. Biotechnol.* **126**: 431–439.
- Vandelook, S., Elsacker, E., Van Wylick, A., De Laet, L. & Peeters, E. 2021. Current state and future prospects of pure mycelium materials. *Fungal Biol Biotechnol.* **8**: 20.
- Xv, W., Zheng, Q., Ye, Z. W., Wei, T., Guo, L. Q., Lin, J. F. & Zou, Y. 2024. Submerged culture of edible and medicinal mushroom mycelia and their applications in food products: A review. *Int. J. Med. Mushrooms.* **26**: 1–13.
- Zhao, W., Lü, Y., Ouyang, H., Zhou, H., Yan, J., Du, T. & Jin, C. 2013. N-glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall  $\beta$ -glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiol.* **23**: 955–968.

# 白色腐朽菌における細胞壁合成制御系の解明及び その操作によるマッシュルームマテリアルの物性改変

辻 健也, 吉見 啓, 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  
〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

## Evaluation of the regulatory mechanism of cell wall synthesis in white-rot fungi for efficient improvement of mycelial physical properties

Kenya Tsuji, Akira Yoshimi, Moriyuki Kawauchi

Laboratory of Environmental Interface Technology of Filamentous Fungi  
Graduate School of Agriculture, Kyoto University  
Kitashirakawaoiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Mycelia of white-rot fungi are recently applied to eco-friendly alternative materials, such as mushroom leather. As a novel approach to modify the physical properties of mushroom materials, molecular breeding targeting the cell wall—which significantly contributes to mycelial strength and water repellency—is gaining more attentions. Efficient modification of the cell wall through molecular breeding requires a understanding of its biosynthetic regulatory systems. Therefore, in this study, we conducted functional analyses of the APSES-family transcription factors Mbp1 and Swi6, which regulate cell wall synthesis, using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Furthermore, we evaluated the impact of *mbp1* disruption on the physical properties of mushroom materials.  $\Delta mbp1$  and  $\Delta swi6$  strains exhibited reduced growth rates and impaired aerial hypha formation compared to the Wild type (WT), indicating that these transcription factors are essential for normal mycelial growth. In  $\Delta mbp1$  strains, the cell wall thickness, the relative percentage of  $\beta$ -glucan, and expression levels of  $\beta$ -glucan synthase genes were decreased. *mbp1* disruption altered the expression levels of several chitin synthase genes despite almost no differences in the relative percentage of chitin between the WT and  $\Delta mbp1$  strains. These results suggest that Mbp1 is required for the normal regulation of  $\beta$ -glucan and chitin synthesis. On the other hand,  $\Delta swi6$  strains showed abnormal distribution of cell wall thickness, slightly increased relative percentage of chitin, and altered expression of chitin synthase genes, whereas no significant differences in the relative percentage of  $\beta$ -glucan and the expression of  $\beta$ -glucan synthase genes were observed. Thus, Swi6 does not contribute to  $\beta$ -glucan synthesis regulation but is responsible for regulating chitin synthesis. Moreover, *mbp1* disruption led to increased Young's modulus and tensile strength of the mycelial mats, indicating a shift toward stiffer and less deformable material properties. Mycelium-based composites from *mbp1* disruption strains exhibited smoother surfaces and higher compressive strength than those from the WT. This study is the first to elucidate the functional overlap and differences between Mbp1 and Swi6 in the regulation of cell wall synthesis in white-rot fungi, and it highlights the potential of cell wall as a target for the improvement of mushroom materials.

Key words: Mushroom materials, Cell wall engineering, Cell wall integrity, APSES family transcription factor

E-mail: kawauchi.moriyuki.8c@kyoto-u.ac.jp

共同研究者：小島 隼星（京都大学大学院農学研究科）  
和泉 貴哉（京都大学大学院農学研究科）  
大塚 唯（京都大学大学院農学研究科）  
Schiphof Kim（京都大学大学院農学研究科）  
矢野 成和（山形大学大学院理工学研究科）  
中沢 威人（京都大学大学院農学研究科）  
Shin Hyun-Jae（Chosun University）  
田中 千尋（京都大学大学院地球環境学堂）  
本田 与一（京都大学大学院農学研究科）

### 緒 言

白色腐朽菌は、農業・林業廃棄物を培地として生育可能であるため、サステナブルな資源として注目されており、近年マッシュルームレザーなどの代替材料の開発に利用され始めている。この素材を既存の用途に留めることなく、航空機等での利用に耐える強固なレザーや生分

解性プラスチック等, 多用途且つ付加価値の高い材料へと発展させるためには, 菌糸体の有する物性を大規模かつ効率的に改変できる新たなアプローチが必要である。そのような中で, 先行研究によって細胞壁が菌糸体の強度や撥水性などの物性に強く寄与することが示唆されたことから, 細胞壁を標的とした分子育種に期待が集まっている (Haneef *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2025)。分子育種による効率的な細胞壁の改変には, 白色腐朽菌の細胞壁構造やその合成経路を解明することが必要不可欠である。

真菌類の細胞壁は, 細胞の最外層に位置し, 細胞の形状維持, 環境ストレスからの保護などの役割を担う生存に必須の構造体であり, 主に $\alpha$ -グルカン,  $\beta$ -グルカン, キチンなどの多糖類やタンパク質で構成されている (Gow *et al.*, 2017)。近年, 白色腐朽菌の多くが属する担子菌の細胞壁構造や多糖組成は, 糸状菌のモデル生物として広く使用されている子囊菌 *Aspergillus* 属とは大きく異なることが示唆されている (Nakazawa *et al.*, 2024)。その差異の根底にある細胞壁合成制御機構にも担子菌にユニークな点が存在すると考えられるが, その理解は未だ不十分である。

子囊菌や担子菌酵母において細胞壁の物理的な損傷や環境ストレスに応答して細胞壁合成を制御する経路として, Cell Wall Integrity signaling pathway (CWI 経路) が知られている (Dichtl *et al.*, 2016; Levin, 2011)。この経路は, 白色腐朽菌においても保存され, 正常な細胞壁合成制御において必須の役割を担うと考えられる。実際に, 白色腐朽菌 *Grifola frondosa* における Rho1 は, MAPK 経路の活性化を調節する細胞壁の完全性に必須の制御因子であると考えられており (Zan *et al.*, 2020), 加えて, 白色腐朽菌 *Ganoderma lucidum* における Slt2 (Mpk1) はラバマイシンによるストレスに応答した細胞壁多糖合成に関与することが示唆されている (Chen *et al.*, 2019)。白色腐朽菌ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) においては, *S. cerevisiae* の CWI 経路構成因子の多くのホモログが確認されており CWI 経路の基本経路は保存されている可能性が示唆されている (河内, 2025)。一方で, *S. cerevisiae* の CWI 経路との差異も確認され, センサータンパク質, GTPアーゼ, MAP2K 及び転写因子にそれぞれタンパク質の欠損がみられ, Rom2 や Rho1, Mpk1 及び Crz1 には重複が生じていることが分かった。この Mpk1 及び Crz1 の重複に関しては, それぞれ担子菌 *Cryptococcus neoformans* 及び白色腐朽菌 *G. lucidum* において同様に観察されている (Jang *et al.*, 2024; Li & Zhong, 2020)。加えて, *P. ostreatus* における Rlm1 は, 成長率に甚大な影響を及ぼし, 主に $\beta$ -グルカン合成を制御することが示唆されているが (Kojima *et*

*al.*, unpublished), *Aspergillus* 属における Rlm1 (RlmA) は, 成長率に与える影響は軽微で, 主に $\alpha$ -グルカンの合成制御を担うことが示されており, 転写因子 Rlm1 の機能に大きな違いが見られることが分かった (Damveld *et al.*, 2005; Fujioka *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2016)。したがって, CWI 経路の基本経路は保存されている可能性が示唆されているものの, 個々のタンパク質の機能には子囊菌とは異なる白色腐朽菌にユニークな点が存在すると考えられる。

CWI 経路の下流で働くと考えられる転写因子として, Mbp1, Swi4, 及び Swi6 が *S. cerevisiae* において同定されている。この3つの転写因子は, 高度に保存された DNA 結合ドメイン (APSES ドメイン) を有する APSES ファミリー転写因子である (Longo *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015)。APSES ファミリーに属する転写因子は, A, B, C, 及び D の4つのクレードに分けられ, 先の3つの転写因子は, このうちクレード A に属する (Longo *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015)。様々な子囊菌では, Mbp1 と Swi6 が MBF (MluI cell cycle box-binding factor) 複合体, Swi4 と Swi6 が SBF (Swi4, 6-dependent cell cycle box-binding factor) 複合体と呼ばれるヘテロダイマーをそれぞれ形成し, 協働して働く (Ding *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2024; Koch *et al.*, 1993)。クレード A APSES ファミリー転写因子は, 様々な真菌において細胞壁合成制御への関与が報告されているため (Chen *et al.*, 2021; Cong *et al.*, 2024; Dichtl *et al.*, 2016; Levin, 2011; Lu *et al.*, 2023), 白色腐朽菌においても正常な細胞壁合成制御に不可欠な役割を担うと考えられる。先行研究によって, 白色腐朽菌 *G. lucidum* における Swi6 ホモログ (Swi6B) は,  $\beta$ -グルカン及びキチン合成を制御することが示されている (Lian *et al.*, 2021)。しかしながら, 白色腐朽菌においては, クレード A APSES ファミリー転写因子の細胞壁合成制御の機能的な重複及び差異は不明である。

本研究の目的は, 白色腐朽菌の細胞壁合成制御機構を解明すること, 分子育種技術を用いた細胞壁の操作によってマッシュルームマテリアルの物性を改良することである。そのために, 高効率な遺伝子組換え技術や遺伝子編集ツールが確立されているヒラタケ *P. ostreatus* を白色腐朽菌のモデルとして, 細胞壁合成の制御に重大な役割を担うことが予想されたクレード A に属する APSES ファミリー転写因子の機能解析を行った。加えて, クレード A APSES ファミリー転写因子の遺伝的な欠損がマッシュルームマテリアルの物性に与える影響を調査した。

## 実験方法

### *P. ostreatus* の培養

培養には、酵母エキス、麦芽エキス、およびグルコース (YMG) 培地を、90mm のペトリ皿に2% (w/v) の寒天で固化したものを使用した (Rao & Niederpruem, 1969). 培養は28°Cの暗所で行った.

### *P. ostreatus* におけるクレード A に属する APSES ファミリー転写因子の探索

はじめに、*Saccharomyces* Genome Database (SGD: <https://www.yeastgenome.org/>) より、*S. cerevisiae* のクレード A の APSES ファミリー転写因子 Mbp1, Swi4 及び Swi6 のアミノ酸配列を取得した. このアミノ酸配列を参照配列として BLASTP サーチを行い、ヒラタケ *P. ostreatus* を含む 64 種の様々な子嚢菌・担子菌におけるホモログの候補を探索した. この際、期待値 (E-value) が、 $1.0 \times E^{-09}$  よりも低いものは、候補から除外した. 発見された 147 個の推定クレード A APSES ファミリー転写因子を用いて、JTT matrix-based model を用いた最尤法 (ML 法) にて系統樹を作製した (Jones *et al.*, 1992). なお、系統樹の作製には、MEGA X ソフトウェアを使用した (Kumar *et al.*, 2018).

続いて、*S. cerevisiae* の Mbp1, Swi4 及び Swi6 並びに、*P. ostreatus* の推定クレード A APSES ファミリー転写因子 protein ID 83192 及び 134090 のドメイン構造を InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いて予測した.

さらに、protein ID 134090 に関しては、選択的スプライシングの有無を確認するために、ヒラタケ *P. ostreatus* PC9 株のデータベース ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC9\\_1/PleosPC9\\_1.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html)) 上の推定エキソン・イントロン領域をもとに、イントロン領域を挟む形でプライマーセットを設計し、20b の cDNA をテンプレートに KOD FX NEO (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて PCR を行った.

### *P. ostreatus* 20b 株の形質転換

*P. ostreatus* の *mbp1* 及び *swi6* を相同組換えによって *hph* (ハイグロマイシン耐性遺伝子) に置換する破壊カセットを設計した. なお、破壊カセットの作製には、フュージョン PCR を用いた (Szewczyk *et al.*, 2006). 形質転換は、20b 株を親株として使用した (Salame *et al.*, 2012). 20b 株は YMG 液体培地で4日間振盪培養後、*Aspergillus niger* 由来のセルラーゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Yatalase-Plus (TaKaRa bio, Shiga, Japan), および *Trichoderma longibrachiatum* 由来の

$\beta$ -グルカナーゼ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてプロトプラストを調製した. その後、ポリエチレングリコール/カルシウムクロライド (PEG/CaCl<sub>2</sub>) 法を用いてプロトプラストに破壊カセットを導入した (Nakazawa *et al.*, 2016; Salame *et al.*, 2012).

### *mbp1* 及び *swi6* 遺伝子の破壊確認

20b 株および遺伝子破壊株から抽出された DNA をテンプレートとしてゲノム PCR を行った (Izumitsu *et al.*, 2012). 破壊カセットの組み込みは、増幅長の変化により確認し、標的遺伝子の欠損は PCR 増幅の有無により検証した.

### 栄養菌糸の形態観察および成長率

菌糸の形態と成長率の観察のため、オートクレーブ処理した YMG 寒天培地 20mL をペトリ皿 (Φ90mm) に注ぎ、コルクボーラー (Φ8mm) で作成した菌糸プラグを各プレートの中央に植菌した. 28°C の暗所で10日間の静置培養後、スキャナーを使用して菌糸の画像を撮影し、ノギスで菌糸コロニーの直径を測定した.

続いて、液体培地上での菌糸体の乾燥重量を測定するため、コルクボーラー (Φ8mm) を使用して作成した菌糸プラグをオートクレーブ処理した YMG 液体培地 40mL に植菌した. 28°C の暗所で14日間静置培養した後、菌糸体を洗浄し、凍結乾燥した. 凍結乾燥した菌糸の重量は電子天秤で測定した.

気中菌糸観察のため、10mL の YMG 寒天・液体培地を試験管 (Φ16mm) に分注し、オートクレーブ処理し、コルクボーラー (Φ12mm) で作成した菌糸プラグを各培地の中心に植菌した. 28°C の暗所で10日間静置培養した後、気中菌糸を観察した.

### 電子顕微鏡観察

20b 株および遺伝子破壊株を、28°C で10日間、20mL の YMG 寒天培地で培養した. その後、菌糸体を、スカルペルを使用して1×3mm に切り出した. 菌糸体は、0.1M リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.4) 中に4%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドを添加した溶液を用いて、4°C で一晩固定した. その後、0.1M PB 中に1%オスミウム四酸化物を添加した溶液で2時間固定した. TEM の観察では、固定した菌糸体は、エタノールの段階的な濃度系列で脱水処理した後、エポキシ樹脂 (LUVEAK-812) で包埋した. 超薄切片は、超微切片機 (EM UC7; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用して作成された. 切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し、JEM-1400Flash 透過型電子顕微鏡 (JEOL, Tokyo, Japan) で観察した.

### 主要細胞壁多糖成分の含有割合測定

オートクレーブ処理済みのYMG寒天培地20mLを加えた直径90mmのプレートを覆うようにオートクレーブ処理済みのセロファンを被せた。コルクボーラー(Φ9mm)を使用して作成した菌糸プラグを各プレートを中心に植菌した。28℃の暗所条件下で14日間の静置培養後、菌糸体を切り離し、液体窒素で凍結させながら乳棒・乳鉢を用いて菌糸を粉砕し、凍結乾燥した。

α-およびβ-グルカンの含有割合は、β-Glucan Assay Kit (Yeast and Mushroom) (Megazyme, Bray, Ireland)を用いて測定した。なお、測定には規定の半分量の試薬と乾燥菌糸体を用いた。0.01gの乾燥菌糸体に4N HCl 400μLを加え、96℃で16時間加熱した後、オートクレーブ処理した水400μLを加えて冷却し、粉末活性炭を加えた。1時間静置した後、サンプルを遠心分離し、上清300μLをオートクレーブ処理した蒸留水2.63mlと8N NaOH 70μLで10倍希釈し、中和した。その後、D-Glucosamine Assay Kit (Megazyme, Bray, Ireland)を用いてキチンの含有割合を測定した。

### qRT-PCRによる細胞壁多糖合成酵素遺伝子の発現変動解析

オートクレーブ処理済みのYMG寒天培地20mLを加えた直径90mmのプレートを覆うようにオートクレーブ処理済みのセロファンを被せた。コルクボーラー(Φ9mm)を使用して作成した菌糸プラグを各プレートを中心に植菌した。28℃の暗所条件下で14日間の静置培養後、菌糸体を切り離し、液体窒素で凍結させながら乳棒・乳鉢を用いて菌糸を粉砕した。この粉末菌体から、FastGene RNA Premium Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan)を用いてRNAを抽出した。得られたRNAサンプルは、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa bio, Shiga, Japan)を使用して逆転写を行った。qRT-PCRにはPowerTrack SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)とQuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用し、Pfaffl法に従って定量化した (Pfaffl, 2001)。

### 菌糸表層のキチンの蛍光標識

100mLフラスコにYMG液体培地40mLを分注し、オートクレーブ処理し、コルクボーラー(Φ8mm)を使用して作成した菌糸プラグ10個を植菌した。28℃、120rpmで5日間振とう培養した後、Polytronホモジナイザー (Kinematica AG, Malters, Switzerland)でホモジナイズし、その溶液200μLを新たなオートクレーブ処理済みのYMG液体培地40mLに植菌した。28℃で120rpmの2日間振とう培養した後、菌糸体は培養液を遠心分離

して回収し、10mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄した。10nmol/mLのキチン特異的蛍光プローブChBD-GFP (Yano *et al.*, 2011)を3μLを加え、サンプルを氷上で2時間放置した後、10mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡STELLARIS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を使用し、対物レンズはHC PLAPO 63x/1.40 OIL CS2を用いた。顕微鏡画像は10μm厚の36枚のスライス画像をスタックして形成した。励起光は、GFP, RFPに対してそれぞれ475nm, 554nmを設定し、蛍光検出は505, 591nmとした。菌糸の自己蛍光は極めて弱く、無視できる程度であった。

### 細胞壁ストレスへの耐性試験

細胞膜および酸化ストレス耐性を評価するため、オートクレーブ処理したYMG寒天培地に、0.02%のナトリウムドデシルスルホン酸 (SDS) と5mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した。さらに、細胞壁合成阻害剤に対する耐性を調査するため、500μg/mLのCalcofluor White (CFW) と100μg/mL Micafungin (MF)を用いた。薬剤を添加しないYMG寒天培地をコントロールとした。コルクボーラー(Φ8mm)で作成した菌糸体プラグを各プレートの中央に植菌し、28℃の暗所で10日間培養後、スキャナーで画像を撮影した。さらに、薬剤プレート(D1)とコントロールプレート(D2)上で生育した菌糸体のコロニー直径を、ノギスを用いて測定し、阻害率を算出した: 阻害率(%) = (D2 - D1) / D2 × 100。

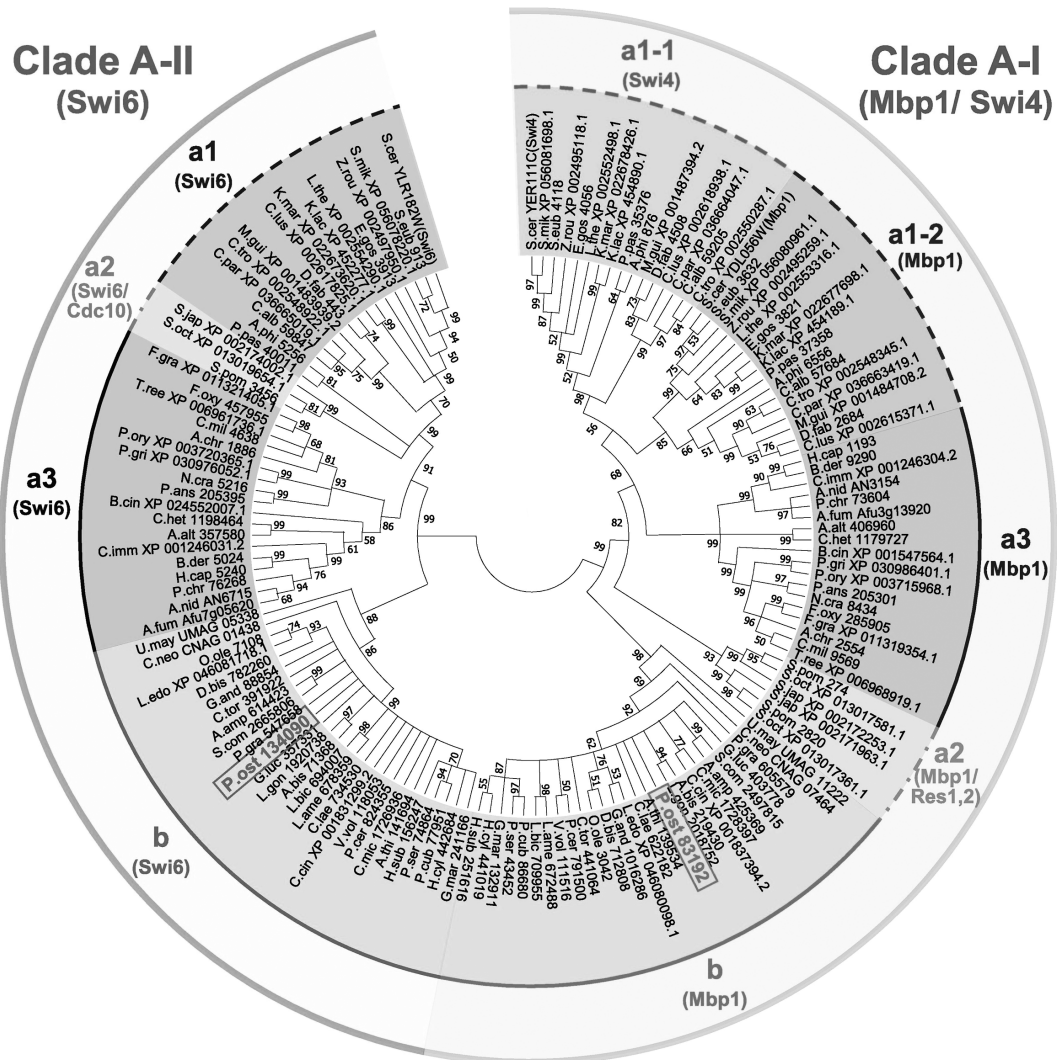
### 菌糸体マットの定性的な物性評価

コルクボーラー(Φ8mm)で切り出した菌糸体プラグを、100mLのYMG液体培地が入った300mLフラスコに8個植菌し、28℃で14日静置培養を行った。培養された菌糸体マットを回収し、RO水で洗浄後、キムタオルで軽く圧着した。菌糸体マットを手で折り曲げることで、物性の差を定性的に評価した。

## 結 果

### *P. ostreatus*におけるクレードAに属するAPSESファミリー転写因子の同定

様々な子嚢菌と担子菌においてクレードAに属するAPSESファミリー転写因子のホモログサーチを行い、系統樹を作製した (Fig.1)。先行研究と同様、クレードA APSESファミリー転写因子は、Mbp1とSwi4が属するクレードA-IとSwi6が属するA-IIに分けられた (Longo *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2015)。それぞれのクレードでは、子嚢菌グループaと担子菌グループbで示した通り子嚢菌と担子菌で系統的な違いが見られた。さら



**Fig. 1** Phylogenetic tree of the predicted clade A APSES family transcription factors based on 147 amino acid sequences from 64 fungal species analyzed with the maximum likelihood method and a JTT matrix-based model with bootstrap values inferred from 1000 replicates. Branches corresponding to partitions reproduced in < 50% bootstrap replicates are collapsed. Numbers above branches represent the percentage of replicate trees in which associated taxa clustered together in the bootstrap replicates. The labels surrounding the phylogenetic tree indicate classification groups. a1: Saccharomycotina, a2: Taphrinomycotina, a3: Pezizomycotina, b: Basidiomycota.

に、子囊菌グループ a では、亜門に基づいた 3 つのサブクレード (a1: Saccharomycotina, a2: Taphrinomycotina, a3: Pezizomycotina) に分けられた。加えて、a1 は、a1-1 と a1-2 の 2 グループにさらに区分された。a1-1 の転写因子は Swi4 と非常に類似しており、高い相同性を有していたことから、Swi4 として同定された。一方で、a1-2 に属する転写因子やクレード A-I のサブクレード a2, a3, b に分類される転写因子は Swi4 よりも Mbp1

との相同性が高かったことから、Mbp1 として同定した。

*P. ostreatus* においては、クレード A に属する APSES ファミリー転写因子が 2 つ同定された。Protein ID 83192 及び 134090 は、それぞれ Mbp1 グループと Swi6 グループに分類されたため、83192 は Mbp1, 134090 は Swi6 と同定した。両タンパクのドメイン構造を解析した結果、83192 と 134090 は、*S. cerevisiae* の Mbp1, Swi4, Swi6 と同様に、N 末端に APSES 型の DNA 結合ドメイ



ンを有し, さらに, 2~3個のアンキリンリピートを持つことが推定された (Fig.2).

*P. ostreatus* の形質転換体における遺伝子破壊確認

Swi6 に関しては担子菌 *G. lucidum* において, スプライシングアイソフォームが確認されていることから, *P. ostreatus* においても選択的スプライシングが起こるか調

査した (Fig.3). 推定イントロン領域のPCR増幅において1つのバンドのみが検出され, *P. ostreatus* においては *swi6* のスプライシングアイソフォームは観察されなかった (Fig.3C). したがって, *P. ostreatus* の *swi6* 遺伝子の全体領域をノックアウトするように *swi6* 遺伝子破壊カセットを設計した. *mbp1* 遺伝子破壊カセットについても同様に設計し, 20b を親株とした相同組換えに

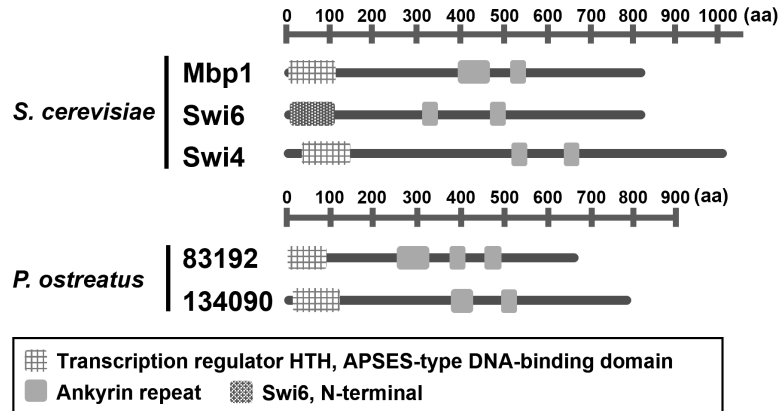


Fig. 2 Domain structures of Mbp1, Swi4, and Swi6 in *Saccharomyces cerevisiae* and protein ID 83192 and 134090 in *Pleurotus ostreatus*. Domain analysis was conducted using InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). aa: amino acids.

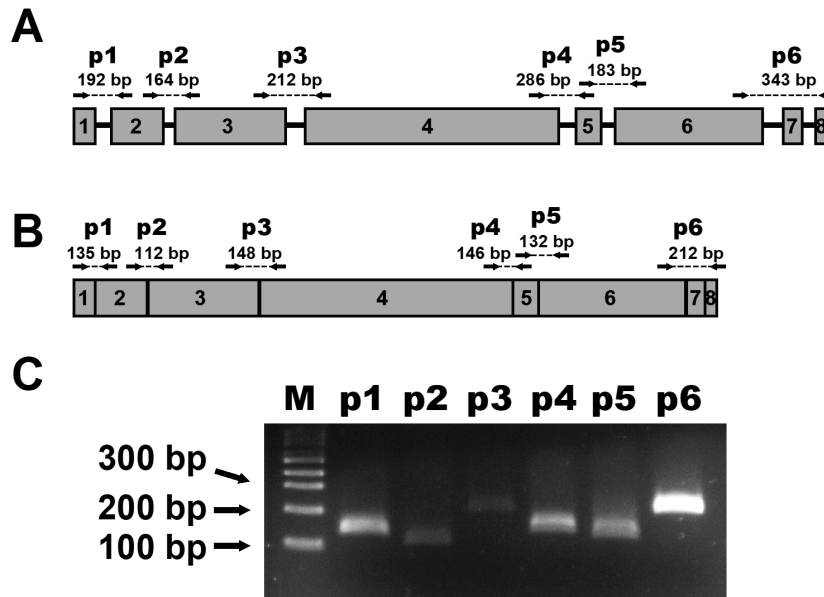


Fig. 3 Confirmation of the absence of *swi6* splicing isoforms. Schematic diagrams of (A) *swi6* gene and (B) *swi6* mRNA predicted by the Joint Genome Institute database ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC9\\_1/PleosPC9\\_1.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html)). (C) Electrophoresis results of amplified PCR fragments. Rectangles indicate exons, and black lines show introns. Primers used are indicated by arrows. Primer names and length of PCR products are also indicated.

よって *mbp1* 及び *swi6* の単独破壊株を作出した。

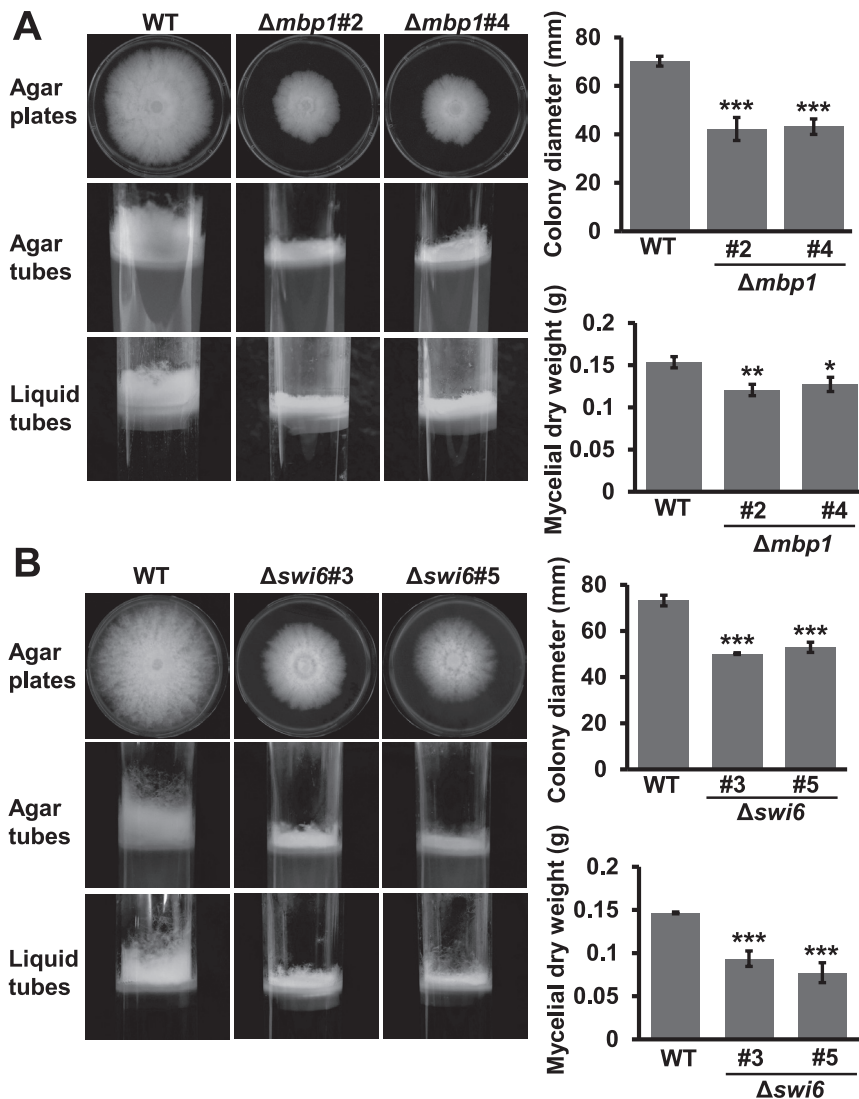
PCRによって、それぞれの形質転換体の遺伝子破壊カセットの組み込みと標的遺伝子の欠損を確認した。その結果、8株の *mbp1* 破壊株 ( $\Delta mbp1$  株) 及び5株の *swi6* 破壊株 ( $\Delta swi6$  株) を得た。このうち、 $\Delta mbp1$ #2と#4及び  $\Delta swi6$ #3及び#5をランダムに選択し、以降の実験に使用した。なお、親株の20b株を野生株 (WT) として使用した。

#### 栄養菌系成長時の形態的特徴

野生株,  $\Delta mbp1$  株及び  $\Delta swi6$  株を YMG 寒天培地上で

10日間培養した菌糸体のコロニー形態並びに成長率を調査した (Fig.4)。その結果、両株とも菌糸体のコロニーサイズが小さくなっていることが観察され、それぞれ菌体直径が約40%と約30%減少した。さらに、YMG液体培地で14日間静置培養した菌糸体の乾燥重量を測定した結果、 $\Delta mbp1$  株で約20%、 $\Delta swi6$  株で約30%乾燥菌体重量が減少していた。したがって、寒天培地及び液体培地の両方で、成長速度の低下が観察された。

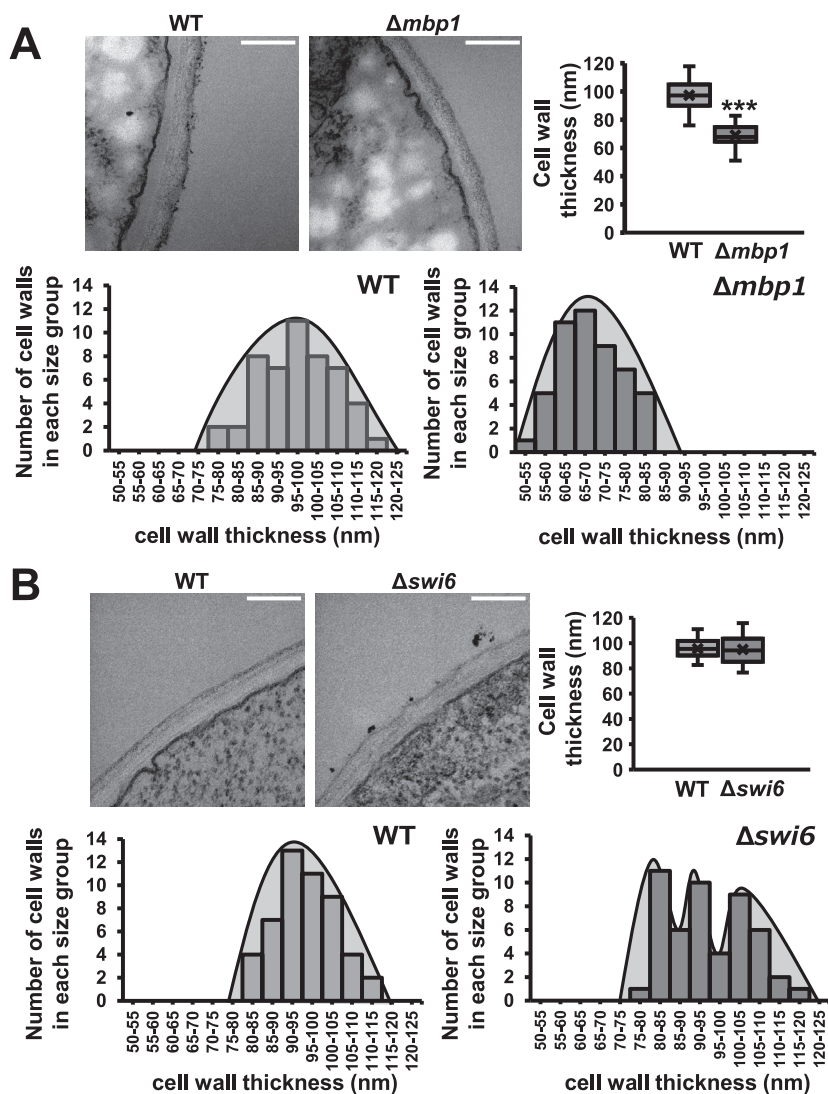
続いて、YMG寒天培地及び液体培地上で培養した気中菌糸を観察した結果、 $\Delta mbp1$  株と  $\Delta swi6$  株共に、両条件で野生株よりも短い気中菌糸が確認された。



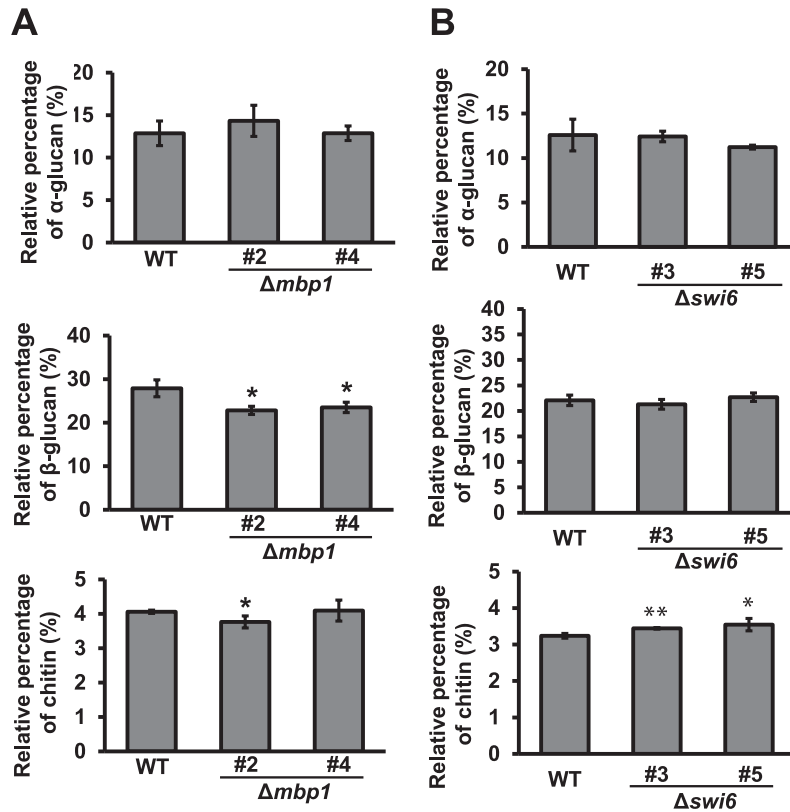
**Fig. 4** Mycelial morphologies, aerial hyphae, and growth speeds in (A) *mbp1* and (B) *swi6* disruption strains. Bars indicate standard deviations of three biological replicates ( $n=3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance t-test (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ).

透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた細胞壁構造の観察  
 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて, 野生株,  $\Delta mbp1$  株及び  $\Delta swi6$  株の細胞壁構造を観察した (Fig.5). その結果,  $\Delta mbp1$  株では野生株より有意に薄い細胞壁が観察され, その厚さの平均値は約 30% 減少していた. 一方,  $\Delta swi6$  株では細胞壁の厚さに有意な差は見られなかった. さらに, 細胞壁の厚さの分布を調べ

たところ, 野生株と  $\Delta mbp1$  株では単一のピークを有する単峰性分布を示したが,  $\Delta swi6$  株では, 複数のピークを有する多峰性分布を示し, 細胞壁の厚さのばらつきに異常が生じていた (Fig.5). 以上の結果から, Mbp1 及び Swi6 は, 正常な細胞壁合成制御に必須であることが分かった.



**Fig. 5** The effects of (A) *mbp1* and (B) *swi6* disruption on cell wall thickness. Cell wall transmission electron microscopy (TEM) was conducted at  $\times 40,000$  magnification (scale bar = 200 nm). Measurements of cell wall thickness under TEM observations; the bars indicate the standard deviations ( $n = 50$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance t-test (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 6** Relative percentages of  $\alpha$ -glucan,  $\beta$ -glucan, and chitin in mycelial dry weight in (A)  $\Delta mbp1$  and (B)  $\Delta swi6$  strains. The bars indicate standard deviations of three biological replicates ( $n=3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance t-test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

#### 主要細胞壁多糖成分の解析

凍結乾燥菌体中の $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン及びキチンの含有割合を測定した (Fig.6).  $\Delta mbp1$  株では、 $\alpha$ -グルカンやキチンの含有割合には、ほとんど差が見られなかったが、 $\beta$ -グルカンの含有割合は、野生株より約17%低下していた。一方、 $\Delta swi6$  株では、 $\alpha$ -グルカンと $\beta$ -グルカンの含有割合に有意な差が見られなかったが、キチンの含有割合はわずかに増加していた。これらの結果より、Mbp1は $\beta$ -グルカン合成制御、Swi6はキチン合成制御に寄与する可能性が考えられた。

#### qRT-PCRによる細胞壁多糖合成酵素遺伝子の発現変動解析

はじめに、 $\Delta mbp1$  株及び $\Delta swi6$  株においてそれぞれ *mbp1* 及び *swi6* の相対発現量を調査した結果、各々の株

でそれぞれ *mbp1* と *swi6* はほとんど検出されず、正常に遺伝子破壊が行われていることが確認された (Fig.7)。続いて、細胞壁合成酵素遺伝子が Mbp1 及び Swi6 によって制御されているかどうかを明らかにするために、 $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン及びキチンの合成酵素遺伝子の相対発現レベルを調査した (Fig.7)。 $\Delta mbp1$  株においては、 $\alpha$ -グルカン合成酵素遺伝子 *ags1* の発現量に変化は見られなかったが、2つの $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子 *fks1* 及び *fks2* の発現量がそれぞれ約50%及び約20%減少した。また、6つのキチン合成酵素遺伝子 (*chs1*, *chs4*, *chs5*, *chs6*, *chs8*, *chs9*) の相対発現レベルは低下していたが、*chs3* の発現レベルは4倍以上増加した。一方、 $\Delta swi6$  株では、*ags1* 及び *fks1*, *fks2* の相対発現量に有意な差は見られなかった。対して、3つのキチン合成酵素遺伝子 *chs1*, *chs4*, *chs9* の相対発現量はそれぞれ約55%

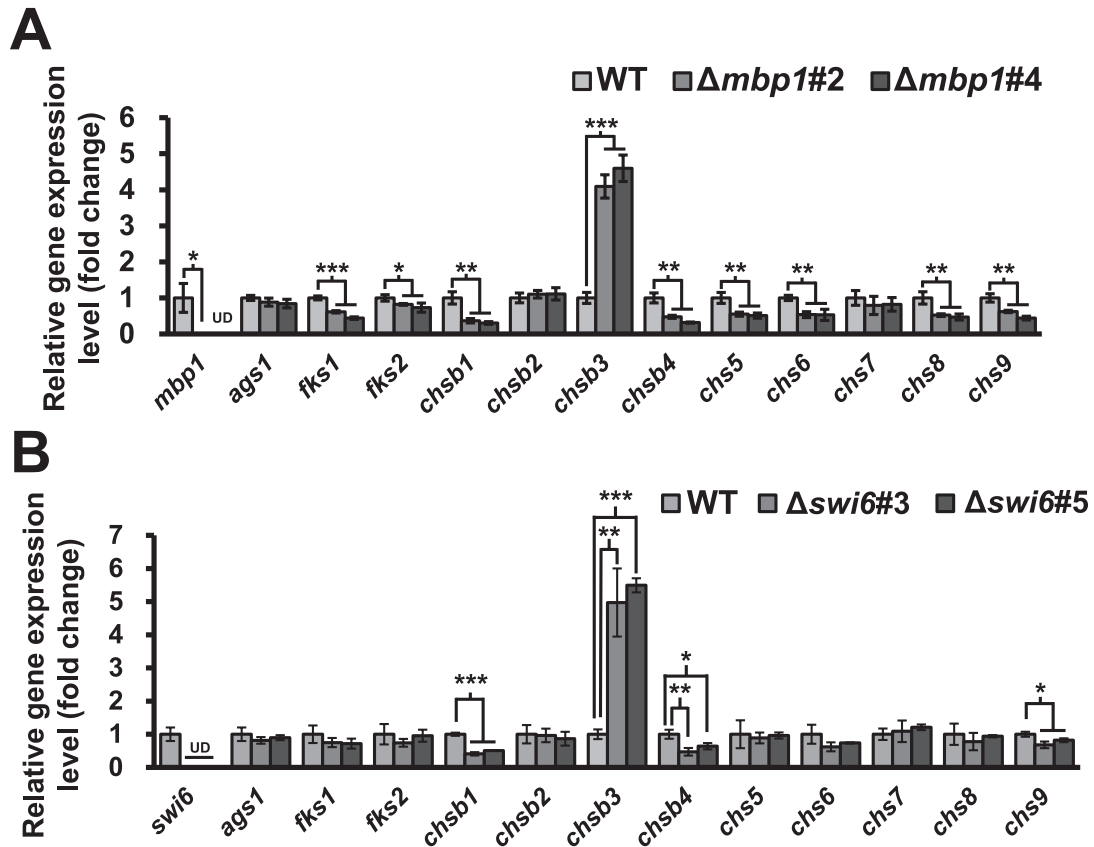


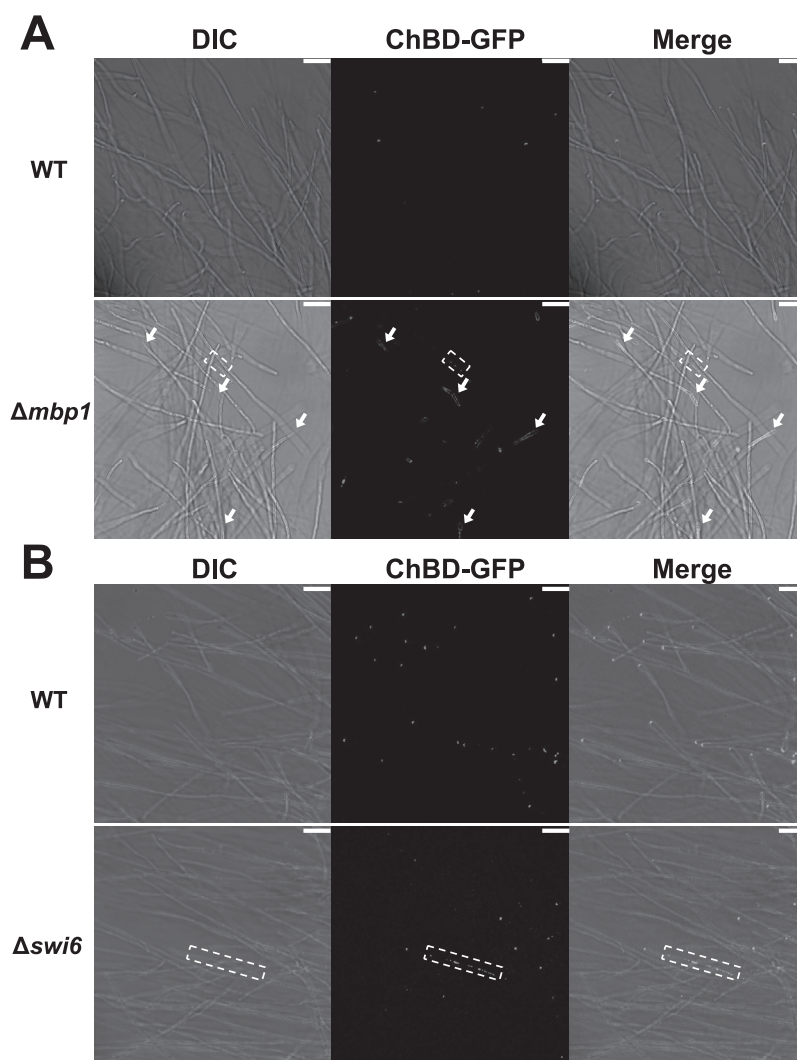
Fig. 7 Relative gene expression levels of cell wall synthase genes (*ags*:  $\alpha$ -glucan synthase, *fks*:  $\beta$ -glucan synthase, *chs*: chitin synthase) in (A)  $\Delta mbp1$  and (B)  $\Delta swi6$  strains. The bars indicate standard deviations of three biological replicates ( $n = 3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance t-test ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). UD: undetermined.

45%, 25%, 有意に低下しており, さらに *chs3* の発現量は約5倍増加していた. 以上の結果より, Mbp1は, 正常な $\beta$ -グルカン及びキチン合成制御に, Swi6は正常なキチン合成制御に必要なことが示唆された.

#### 菌糸表層のキチン染色

$\Delta mbp1$  株及び  $\Delta swi6$  株ではキチン合成に異常が生じていることが示唆されたため, キチン特異的蛍光プローブ

ChBD-GFPを用いて, 細胞表層のキチンを単独染色した (Fig.8). 野生株においては, 菌糸先端のみにキチン蛍光シグナルが検出された. 一方で,  $\Delta mbp1$  株では, 菌糸先端部位における蛍光シグナルの領域が野生株よりも増加しており, さらに菌糸先端以外の領域において点状の蛍光シグナルが検出された.  $\Delta swi6$  株では,  $\Delta mbp1$  株と同様に菌糸先端以外の領域で点状の蛍光シグナルが観察された.

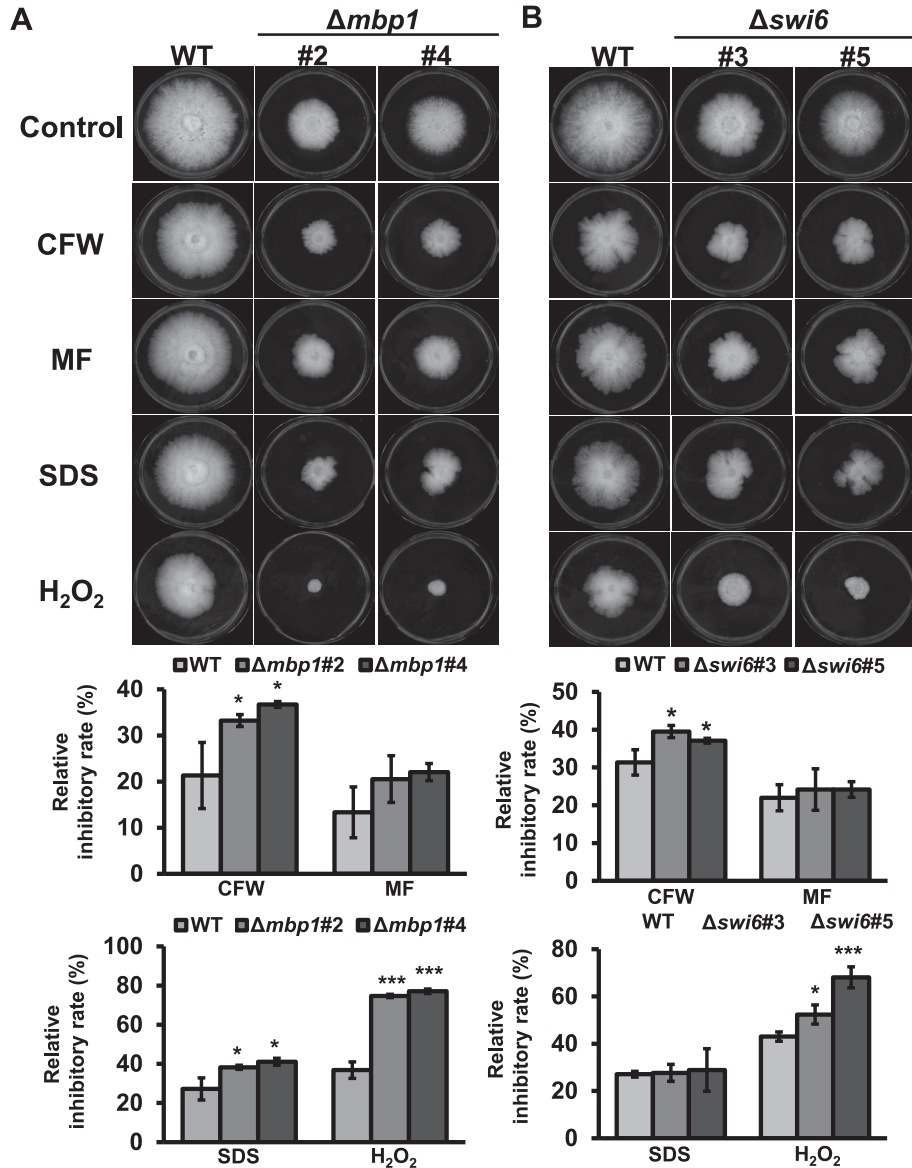


**Fig. 8** Chitin staining using a chitin-specific fluorescent probe (ChBD-GFP) under a confocal microscope (scale bar = 20 $\mu\text{m}$ ). White arrows indicate increased ChBD-GFP fluorescence at hyphal tips. White dotted rectangles indicate punctate ChBD-GFP fluorescence in regions other than the hyphal tips. DIC: differential interference contrast.

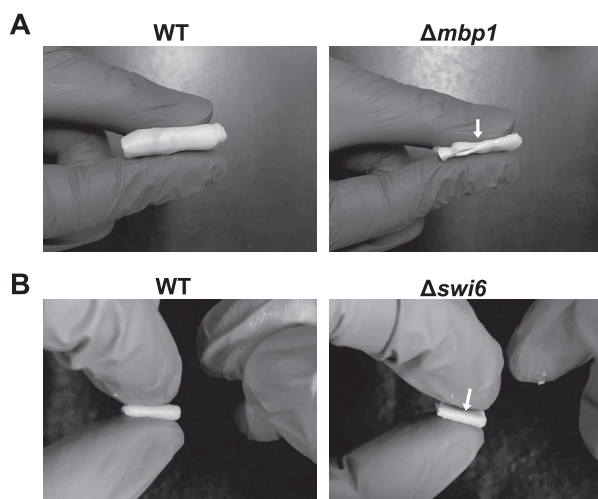
細胞壁ストレスへの耐性試験

キチン合成阻害剤 CFW,  $\beta$ -グルカン合成阻害剤 MF, 細胞膜ストレス剤 SDS 及び酸化ストレス剤  $H_2O_2$  を用いて,  $\Delta mbp1$  株及び  $\Delta swi6$  株のストレス耐性を調べた (Fig.9). その結果,  $\Delta mbp1$  株では, MF への感受性に有意な差は見られなかったが, CFW に対する感受性は

有意に増加した. 加えて, SDS や  $H_2O_2$  への感受性も増加した. 特に,  $H_2O_2$  の阻害率は大幅に増加し, 野生株と比べて約2倍であった.  $\Delta swi6$  株では, MF 及び SDS への感受性は変化しなかったが, CFW 及び  $H_2O_2$  に対する感受性は有意に増加した.



**Fig.9** Sensitivity to various stressors in (A)  $\Delta mbp1$  and (B)  $\Delta swi6$  strains. Mycelial morphology grown on YMG agar media supplemented with 500 $\mu$ g/mL calcofluor white (CFW), 100 $\mu$ g/mL micafungin (MF), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 5mM  $H_2O_2$  after 10 days. The relative growth inhibitory rates are also shown. The bars indicate standard deviations of three biological replicates ( $n=3$ ). Statistical significance was determined using a two-tailed equal variance t-test (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ).



**Fig. 10** Mechanical strength changes in (A)  $\Delta mbp1$  and (B)  $\Delta swi6$  strains. White arrows indicate torn area of mycelial mats.

#### マッシュルームマテリアルの物性評価

野生株、 $\Delta mbp1$ 株、 $\Delta swi6$ 株を液体静置条件で培養した菌糸体マットを折り曲げ、物性を定性的に評価した (Fig. 10)。その結果、野生株では柔軟性があり、簡単に裂けなかった一方で、 $\Delta mbp1$ 株及び $\Delta swi6$ 株では柔軟性が低く、簡単に裂けてしまい、菌糸体の物性が変化している可能性が示唆された。さらに、ダイカリオンの $mbp1$ 破壊株と野生株で菌糸体マットを作成し引張試験による菌糸体マットの定量的な評価を行った。その結果、ダイカリオンの $mbp1$ 破壊株で作成したマットは、野生株に比べてより高いヤング率・引張強度を示した (Kojima *et al.*, unpublished)。これは、 $mbp1$ の破壊が菌糸体マットをより硬く、変形しにくい物性に変化させたことを意味する。さらに、ダイカリオンの $mbp1$ 破壊株と野生株を用いて菌糸体コンポジットを作製し、圧縮試験を行った結果、 $mbp1$ 破壊株の菌糸体コンポジットは、野生株よりも高い圧縮強度を示した (Kojima *et al.*, unpublished)。このように $mbp1$ の欠損によって、菌糸体コンポジットの特性を向上させることに成功した。

#### 考 察

本研究では、クレードA APSESファミリー転写因子の系統解析を実施した (Fig. 1)。本研究で作製した系統樹においては、全ての担子菌及び子囊菌においてMbp1及びSwi6が見られたため、両転写因子は真菌類で広く保存されていることが示唆された。一方で、Swi4はSaccharomycotina亜門にのみ見られたため、

Saccharomycotina亜門に特有の転写因子であると考えられた。この結果は、多くの子囊菌にSwi4のオルソログが見られないことを示す以前の系統解析の結果と一致している (Longo *et al.*, 2018)。この結果より、Swi4は、Mbp1の重複によって進化的にSaccharomycotina亜門が獲得した転写因子であると推定される。したがって、Swi4を有する子囊菌酵母 (Saccharomycotina亜門) とSwi4を持たない糸状菌や担子菌酵母とは進化的な分化によってMbp1及びSwi6の機能に差がある可能性が考えられる。

$mbp1$ の破壊は、細胞壁を薄く、 $\beta$ -グルカンの含有割合及び $\beta$ -グルカン合成酵素遺伝子 $fks1 \cdot fks2$ の発現量を減少させた (Figs. 7, 8, 9)。したがって、Mbp1は細胞壁合成制御に関与し、特に $\beta$ -グルカン合成を制御することが示唆された。また、 $\Delta mbp1$ 株では、6つのキチン合成酵素遺伝子の発現レベルが減少し、 $chs3$ の発現量は4倍以上増加した (Fig. 7)。一方で、キチン含有割合にはほとんど差が見られなかった (Fig. 6)。これらの結果から、6つのキチン合成酵素遺伝子の発現レベルの低下が $chs3$ の発現レベルの上昇によって相補されることが示唆された。それぞれのキチン合成酵素は完全に同じ役割を有しているのではなく、キチンの分子量、分岐、配置などの制御において別々の役割を有していることが示唆されているため (Nakazawa *et al.*, 2024)、 $mbp1$ の破壊によってキチン含有割合が変化しなかったとしても、キチンの分子構造や配置に影響を与える可能性は考えられる。 $\Delta mbp1$ 株におけるキチン蛍光シグナルの増加は (Fig. 8)、菌糸表層を覆う $\beta$ -グルカンの減少による下層のキチンの露出増加の可能性に加えて、異常なキチン分岐・配置の可能性を示唆している。加えて、 $\Delta mbp1$ 株は、CFW及びSDSに対する感受性が増加していた (Fig. 9)。先行研究によって、*P. ostreatus*では、 $chs2$ 、 $chs3$ 、および $chs4$ の単独破壊によってキチン合成に異常が生じると、CFWおよびSDSに対する感受性が増加することから (Schiphof *et al.*, 2024)、この感受性増加は、 $\Delta mbp1$ 株における異常なキチン合成を示唆している。以上の結果より、Mbp1は正常な $\beta$ -グルカン及びキチンの合成制御に必須であることが示された。本研究はMbp1の細胞壁合成制御における詳細な機能を真菌類で初めて示した研究である。

$\Delta swi6$ 株では、細胞壁の厚さ分布に異常が見られたが、これは菌糸に沿って細胞壁多糖合成が不均一に起こり、特定の領域では野生株よりも多くまたは少なく合成されていることが示唆された。したがって、Swi6は正常な細胞壁合成制御に不可欠であることが示された。 $\alpha$ -グルカン及び $\beta$ -グルカンの含有割合と、それぞれの合成酵素遺伝子の発現量は野生株と比べて変化しなかったため



(Figs. 8, 9), Swi6は $\alpha$ -グルカン及び $\beta$ -グルカンの合成制御には関与しないことが示唆された。一方で,  $\Delta swi6$ 株では, キチン含有割合は微増し, *chs1*, *chs4*及び*chs9*の発現レベルは低下し, *chs3*の発現は増加していた (Figs. 6, 7)。したがって, 3つのキチン合成酵素遺伝子の発現低下に起因して*chs3*の発現上昇が引き起こされ, キチン合成が促進された可能性が考えられた。さらに,  $\Delta swi6$ 株では野生株と異なり, 菌糸中間部に散在するキチンシグナルが観察された (Fig. 8)。この結果は,  $\Delta swi6$ 株でのキチン合成酵素遺伝子の発現プロファイルの変化によるキチンの分岐や配置の異常に起因する可能性が考えられる。加えて,  $\Delta swi6$ 株のCFWに対する感受性の増加は, キチン合成の異常を裏付けている (Fig. 9)。以上の結果より, Swi6は $\alpha$ -グルカン及び $\beta$ -グルカン合成の制御には寄与しないものの, 正常なキチン合成制御に必須の役割を有することがわかった。

白色腐朽菌 *G. lucidum* における *swi6* には, *Glswi6A* と *Glswi6B* という2つのスプライシングアイソフォームが存在する (Lian *et al.*, 2021)。一方, *P. ostreatus* においては, PCRの結果より *swi6* の選択的スプライシングが起こらないと考えられた (Fig. 3)。したがって, 両菌種で *swi6* 遺伝子の発現制御に大きな違いがあることが示唆された。*G. lucidum* では, *swi6* のサイレンシングにより, 細胞壁の厚さが減少し,  $\beta$ -グルカン及びキチンの含有量が低下し, いくつかの推定グルカン合成酵素遺伝子の発現が低下する (Lian *et al.*, 2021)。加えて, *Glswi6B* の過剰発現は,  $\beta$ -グルカン及びキチンの合成を促進させる (Lian *et al.*, 2021)。したがって, *Glswi6* は $\beta$ -グルカン及びキチンの合成制御を担うと考えられている (Lian *et al.*, 2021)。そのため, *G. lucidum* と *P. ostreatus* の間で $\beta$ -グルカン合成制御への関与という点でSwi6の機能に違いがあることがわかった。以上の考察より, *P. ostreatus* が属する Agaricales 目と *G. lucidum* が属する Polyporales 目の間でSwi6に進化的な分化が生じている可能性が考えられた。しかしながら, 観察された実験結果の差は, Swi6の機能差ではなく, 遺伝子ノックアウトと遺伝子サイレンシング・過剰発現という方法論的な差異に起因する可能性は否定できない。

これまでの結果より, *Mbp1* はSwi6と独立して $\beta$ -グルカン合成を制御すること, そして*Mbp1* はSwi6と協働してキチン合成制御を担う可能性が示唆された。加えて, *Mbp1* 及びSwi6の機能的な欠損は, 共に寒天・液体培地上での成長速度及び気中菌糸形成能を低下させた (Fig. 4)。このことから, 両転写因子は, 固体・液体条件の両方で正常な菌糸成長に必須であることが分かった。加えて, 両破壊株では酸化ストレス剤  $H_2O_2$  への感

受性が増加しており, *Mbp1* 及びSwi6は共に酸化ストレス応答に関与する可能性が示唆された (Fig. 9)。このように本研究では, ヒラタケにおいて*Mbp1* 及びSwi6の細胞壁合成制御における機能を解析し, その機能的重複や差異を白色腐朽菌で初めて明らかにした。さらに本研究では, *mbp1* の破壊によって, 菌糸体マットの物性変化と菌糸体コンポジットの改良を実現させた。本研究は, マッシュルームマテリアル改良に向けた細胞壁の標的としての可能性を示し, 将来の「細胞壁工学」確立に向けてその基盤を固める第一歩となるものである。

## 要 約

白色腐朽菌の菌糸体は, マッシュルームレザーに代表される環境にやさしい代替マテリアルに応用され始めている。このマッシュルームマテリアルの物性を大規模かつ自在に改変できる新たなアプローチとして, 菌糸体の強度や撥水性などの物性に強く寄与する細胞壁を標的とした分子育種に期待が集まっている。分子育種による効率的な細胞壁改変には, その合成統御系への理解が必要不可欠であるため, 本研究では, ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* を用いて, 細胞壁合成制御を担う APSES ファミリー転写因子 *Mbp1* 及びSwi6の機能解析を行った。加えて, *mbp1* の破壊がマッシュルームマテリアルの物性に与える影響を評価した。 $\Delta mbp1$  株及び $\Delta swi6$  株では共に, 野生株と比べて成長率及び気中菌糸形成能が低下し, 両転写因子が正常な菌糸成長に必須であることが示された。 $\Delta mbp1$  株では, 細胞壁の厚さや $\beta$ -グルカンの含有割合・合成酵素遺伝子の発現量が減少した。また, キチン含有割合には変化がない一方で, いくつかのキチン合成酵素遺伝子の発現量に変化が見られた。これらの結果より, *Mbp1* は正常な $\beta$ -グルカン及びキチンの合成制御に必須であることが示された。一方,  $\Delta swi6$  株では, 細胞壁中の $\beta$ -グルカンの含有割合や合成酵素遺伝子の発現量は変化しなかったが, 細胞壁の厚さのばらつき, キチンの含有割合及び合成酵素遺伝子の発現プロファイルが変化した。したがって, Swi6は $\beta$ -グルカン合成には関与しないが, キチン合成制御に寄与することが示唆された。さらに, *mbp1* の破壊によって, 菌糸体マットのヤング率と引張強度が増加し, より硬く変形しにくい物性に変化することが分かった。また, *mbp1* 破壊株を用いて作製された菌糸体コンポジットは, 野生株よりも高い圧縮強度を示した。本研究は*Mbp1* 及びSwi6の細胞壁合成制御における機能的重複・差異を白色腐朽菌で初めて明らかにし, マッシュルームマテリアル改良に向けた細胞壁の標的としての可能性を示すものである。

## 本助成で得られた研究成果の報告

### 口頭発表

- 1) Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Kojima, H., Yano, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023. Cell wall engineering of the mushroom for the eco-friendly material development. Asian Mycological Congress 2023 (October 10-13, Busan, Republic of Korea)
- 2) Kojima, H., Otsuka, Y., Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2023. Transcription factor Mbp1 regulates  $\beta$ -glucan synthesis and mycelium properties in *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Science Virtual 2023 (October 18-19, Malaysia (Online))
- 3) 小島隼星, Schiphof Kim, 河内護之, 辻健也, 田中千尋, Jong Yong-Hyeon, Shin Hyun-Jae, 中沢威人, 本田与一. 2024. 白色腐朽菌ヒラタケを用いた菌糸体マテリアル作成法の検討. 第74回日本木材学会大会 (3月13-15日, 京都)
- 4) Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Kojima, H., Yano, S., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Visualization and engineering of basidiomycete cell wall: for future mycelial materials. 12th International Mycological Congress (August 11-15, Maastricht, Netherland)
- 5) 河内護之, 大塚唯, 名和義順, 小島隼星, Schiphof Kim, 万雨昕, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 矢野成和, 中沢威人, 本田与一. 2024. マッシュルームマテリアル改良に向けた担子菌細胞壁工学の開拓, 日本応用糖質科学会2024年度(第73回)大会 (9月24-27日, 京都)
- 6) Kawauchi M., Kojima H., Izumi T., Otsuka Y., Schiphof K., Tsuji K., Yoshimi A., Tanaka C., Yano D., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2025. Distinct functions of the cell wall synthesis regulators in *Pleurotus ostreatus*: a prelude to cell wall engineering for future mushroom material improvements. 17th European Conference on Fungal Genetics (ECFG17) (March 2-5, Dublin, Ireland)
- 7) 小島隼星, 和泉貴哉, 河内護之, 大塚唯, Schiphof Kim, 辻健也, 吉見啓, 田中千尋, 矢野成和, 中沢威人, 本田与一. 2025. 白色腐朽菌ヒラタケにおける細胞壁合成制御因子Mbp1及びSwi6の遺伝子破壊による菌糸体の物性改変について. 第75回日本木材学会大会 (3月19-21日, 仙台)

### 原著論文

- 1) Kojima, H., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Schiphof, K., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Putative APSES family transcription factor *mbp1* plays an essential role in regulating cell wall synthesis in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*, Fungal Genet. Biol., **175**: 103936.
- 2) Kojima, H., Izumi, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Yano, S., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2025. Role of putative APSES family transcription factor Swi6 in cell wall synthesis regulation in the agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. Fungal Biol., **129**: 101526.

### その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Yoshimi A., Miyazawa K., Kawauchi M. & Abe K. 2022. Cell wall integrity and its industrial application in filamentous fungi, J. Fungi, **8**: 435

- 2) 河内護之. 2024. マッシュルームマテリアルの現状と可能性. 生物工学会誌 **102**: 472.
- 3) 河内護之. 2025. マッシュルームマテリアル改良に向けて: 分子育種による白色腐朽菌細胞壁構造の改変. 応用糖質科学 **15**: 120-124.
- 4) Shin, H.J., Ro, H.S., Kawauchi, M. & Honda, Y. 2025. Review on mushroom mycelium-based products and their production process: from upstream to downstream. Bioresour. Bioprocess. **12**: 3.

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の学生諸氏に感謝の意を表します。さらに、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(B)(吉見啓 22H02238)、基盤研究(C)(河内護之 22K05763)、海外連携研究(河内護之 24KK0119)、二国間交流事業(河内護之 JPJSBP 120238807)の支援にも感謝致します。

## 文 献

- Chen, D.D., Shi, L., Yue, S.N., Zhang, T.J., Wang, S.L., Liu, Y.N., Ren, A., Zhu, J., Yu, H.S. & Zhao, M.W. 2019. The Slr2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*. Fungal. Genet. Biol. **123**: 70-77.
- Chen, X., Lu, Z., Chen, Y., Wu, R., Luo, Z., Lu, Q., Guan, N. & Chen, D. 2021. Deletion of the *MBP1* gene, involved in the cell cycle, affects respiration and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Spectr. **9**: e0008821.
- Cong, H., Sun, Y., Li, C., Zhang, Y., Wang, Y., Ma, D., Jiang, J. & Li, L. 2024. The APSES transcription factor CfSwi6 is required for growth, cell wall integrity, and pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata*. Microbiol. Res. **281**: 127624.
- Damveld, R.A., Arentshorst, M., Franken, A., VanKuyk, P.A., Klis, F.M., Hondel, C.A.M. van den & Ram, A.F.J. 2005. The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. Mol. Microbiol. **58**: 305-319.
- Dichtl, K., Samantaray, S. & Wagoner, J. 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. Cell Microbiol. **18**: 1228-1238.
- Ding, J.L., Lin, H.Y., Feng, M.G., & Ying, S.H. 2020. Mbp1, a component of the MluI cell cycle box-binding complex, contributes to morphological transition and virulence in the filamentous entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Environ. Microbiol. **22**: 584-597.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T. & Abe, K. 2007. MpkA-dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell **6**: 1497-1510.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P. & Munro, C.A. 2017. The fungal cell

- wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* **5**: 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016.
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I.S., Heredia-Guerrero, J.A. & Athanassiou, A. 2017. Advanced materials from fungal mycelium: Fabrication and tuning of physical properties. *Sci. Rep.* **7**: 41292.
- Huang, Y., Chen, J., Xia, H., Gao, Z., Gu, Q., Liu, W. & Tang, G. 2024. FvMbp1-Swi6 complex regulates vegetative growth, stress tolerance, and virulence in *Fusarium verticillioides*. *J. Hazard. Mater.* **473**: 134576.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T. *et al.* 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* **53**: 396-401.
- Jang, Y.B., Kim, J.Y. & Bahn, Y.S. 2024. Unraveling the cryptic functions of mitogen-activated protein kinases Cpk2 and Mpk2 in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* **15**: e0115624.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. & Thornton, J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 275-282.
- Koch, C., Moll, T., Neuberger, M., Ahorn, H. & Nasmyth, K. 1993. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* **261**: 1551-1557.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 1547-1549.
- Levin, D.E. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145-1175.
- Li, H. & Zhong, J.-J. 2020. Role of calcineurin-responsive transcription factor CRZ1 in ganoderic acid biosynthesis by *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* **95**: 166-173.
- Lian, L., Zhang, G., Zhu, J., Wang, Y., Wang, L., Liu, R., Shi, L., Ren, A. & Zhao, M. 2021. Swi6B, an alternative splicing isoform of Swi6, mediates the cell wall integrity of *Ganoderma lucidum*. *Environ. Microbiol.* **23**: 4405-4417.
- Longo, L.V.G., Ray, S.C., Puccia, R. & Rappleye, C.A. 2018. Characterization of the APSES-family transcriptional regulators of *Histoplasma capsulatum*. *FEMS Yeast Res.* **18**: foy087.
- Lu, K., Chen, R., Yang, Y., Xu, H., Jiang, J. & Li, L. 2023. Involvement of the cell wall-integrity pathway in signal recognition, cell-wall biosynthesis, and virulence in *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **36**: 608-622.
- Nakazawa, T., Kawauchi, M., Otsuka, Y., Han, J., Koshi, D., Schiphof, K., Ramirez, L., Pisabarro, A.G. & Honda, Y. 2024. *Pleurotus ostreatus* as a model mushroom in genetics, cell biology, and material sciences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **108**: 217.
- Nakazawa, T., Tsuzuki, M., Irie, T., Sakamoto, M. & Honda, Y. 2016. Marker recycling via 5-fluoroorotic acid and 5-fluorocytosine counter-selection in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal. Biol.* **120**: 1146-1155.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Rao, P.S. & Niederpruem, D.J. 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (*sensu* Buller). *J. Bacteriol.* **100**: 1222-1228.
- Rocha, M.C., Fabri, J.H., Franco de Godoy, K. *et al.* 2016. *Aspergillus fumigatus* MADS-Box transcription factor *rlmA* is required for regulation of the cell wall integrity and virulence. *G3*. **6**: 2983-3002.
- Salame, T.M., Knop, D., Tal, D., Levinson, D., Yarden, O. & Hadar, Y. 2012. Predominance of a versatile-peroxidase-encoding gene, *mnp4*, as demonstrated by gene replacement via a gene targeting system for *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5341-5352.
- Schiphof, K., Kawauchi, M., Tsuji, K., Yoshimi, A., Tanaka, C., Nakazawa, T. & Honda, Y. 2024. Functional analysis of basidiomycete specific chitin synthase genes in the agaricomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet. Biol.* **172**: 103893.
- Shin, H.J., Ro, H.S., Kawauchi, M. & Honda, Y. 2025. Review on mushroom mycelium-based products and their production process: from upstream to downstream. *Bioresour Bioprocess* **12**: 3.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A. & Oakley, B.R. 2006. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**: 3111-3120.
- Yano, S., Suyotha, W., Honda, A., Takagi, K., Rattanakit-Chandet, N., Wakayama, M. & Tachiki, T. 2011. N-terminal region of chitinase I of *Bacillus circulans* KA-304 contained new chitin-binding domain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 299-304.
- Zan, X.Y., Zhu, H.A., Jiang, L.H., Liang, Y.Y., Sun, W.J., Tao, T.L. & Cui, F.J. 2020. The role of *Rho1* gene in the cell wall integrity and polysaccharides biosynthesis of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **165**: 1593-1603.
- Zhao, Y., Su, H., Zhou, J., Feng, H., Zhang, K.Q. & Yang, J. 2015. The APSES family proteins in fungi: Characterizations, evolution and functions. *Fungal Genet. Biol.* **81**: 271-280.
- 河内護之. 2025. マッシュルームマテリアル改良に向けて: 分子育種による白色腐朽菌細胞壁構造の改変. *応用糖質科学* **15**: 120-124.

## 2023 年度一般研究助成の研究報告

助成期間：2023 年 4 月～2025 年 3 月

## 母乳に分泌される乳酸菌の菌株ライブラリーの作製

錫谷 達夫

【目的】 ヒト乳の次世代シーケンス解析で、乳中に乳酸菌が存在すると報告されている。そこでヒトの乳と新生児の便から乳酸菌株を分離培養し、

- ①実際に乳に乳酸菌が分泌され、新生児の腸内細菌叢形成に寄与しているか否かを明らかにし、
- ②乳中や新生児の腸内細菌叢中の乳酸菌株のライブラリーを作製して
- ③得られた乳酸菌株の免疫賦活化能を調べることを目的に研究を行った。

【方法】 インフォームドコンセントを得た母親から出産後3日目と1か月目の乳と新生児の便をセットで提供していただいた。乳は搾乳後、冷凍庫で凍結保存したものを、便は細菌輸送用の培地に接種したものを提供していただき、当日に分離培養を行った。

検体は生理食塩水で10倍階段希釈後、乳酸菌培養用の培地・MRS培地で好氣的条件ならびに嫌氣的条件で35℃、2～3日間培養した。形態が異なる孤立コロニーを可能な限り釣菌し、グラム染色性とカタラーゼ試験によって混入した表皮の常在菌であるブドウ球菌属を同定し、除外した。ブドウ球菌以外の菌と考えられる菌を分離と同じ条件でコロニー精製を行い、16S rDNAシーケンスとMALDI-TOF MSを組み合わせて菌種を決定した。

得られた *Bifidobacterium* 菌6種のうち4種の株 (*B. catenulatum* 4B3株, *B. longum* 7B3株, *B. breve* 8B2株, *B. bifidum* 21B1株) を選び、加熱殺菌後、ヒトの末梢血から得た樹状細胞の培養系に添加して1日培養し、培地に分泌されたインターフェロン $\alpha$ 並びに $\gamma$ 量をELISAによって求め、免疫賦活化能を調べた。対象としてインターフェロン分泌量が多いと報告されている *Lactococcus lactis* JCM5805株を用いた。

【結果・考察】 11セットの生後3日目の、6セットの生後1か月目の乳と新生児の便を培養した。その結果、ブドウ球菌以外の菌として174個コロニーを得た。このうちコロニー精製できた菌株は *Streptococcus* 属, *Enterococcus* 属, *Bifidobacterium* 属の63株 (乳由来21株, 新生児便由来42株) で、その他の菌株は複数の菌種が混在している培地上では発育したが、コロニー精製を繰り返して1種の菌にする過程で増殖できず、分離できない菌であった。

菌種同定を行った結果、乳から得られた菌種は全て

*Streptococcus* 属だった。この結果は既報のメタゲノム解析でも *Staphylococcus* 属やアクネ菌, *Streptococcus* 属しか検出できないという結果と一致していた。一方、生後3日目の新生児の便からは母乳中と同じ *Streptococcus* 属が主に検出されたが、*Enterococcus faecalis* や *Bifidobacterium* 属の菌も分離できた。生後1か月になると新生児の便から得られる菌株のほとんどが *Enterococcus* 属と *Bifidobacterium* 属となり、乳児特有の腸内細菌叢が形成されていることが確認できた。

得られた *Bifidobacterium* 4菌種について、ヒト樹状細胞の活性化能を検討した。いずれの株も樹状細胞からインターフェロン- $\alpha$ を高度に、 $\gamma$ をわずかに分泌させ、対象菌株よりも強い免疫賦活化能があることが示された。

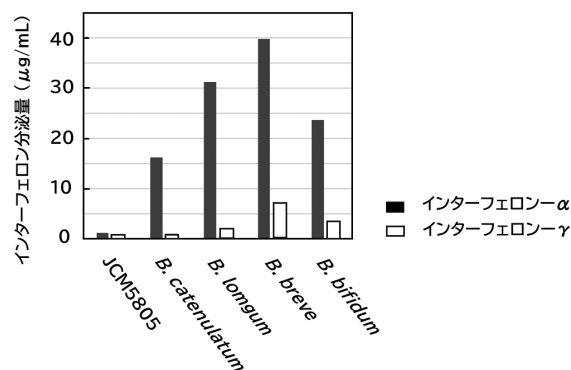


図1 24時間の菌処理によるヒト樹状細胞のインターフェロン分泌量

乳から乳酸菌が分離できないという結果は凍結保存したことや空気に触れた影響によることも考えられるが、実際に乳に生きた乳酸菌が分泌されているか否かは明らかにできなかった。一方、生後1か月目の新生児の腸内細菌叢は乳酸菌有意な菌叢となっており、乳中のオリゴ糖が乳酸菌有意な菌叢の形成に役立っていることが確認できた。しかし、本研究の目的である、乳酸菌自体を母から子へと乳で受け渡しているという事実は残念ながら確認できなかった。新生児から得られた乳酸菌の免疫賦活可能は高く、新生児の免疫能の発達に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

## 電気化学活性菌の市民参加型大規模スクリーニング

渡 邊 一 哉

【目的】電気化学活性菌（electrochemically active bacteria, EAB）とは、細胞外電子伝達系をもち、電極との間で電子のやり取りができる細菌である。バイオマス廃棄物などを用いて発電する微生物燃料電池や、電極からの電子でCO<sub>2</sub>から有機物をつくる微生物電気合成などに利用でき、産業的に注目されている。しかしその研究の歴史は浅く、環境中のEABの多様性は未だ十分に把握されていない。新奇の高活性EABが発見されれば、新たな産業応用につながる可能性がある。そこで本研究では、日本各地の土壌などから新奇EABを単離することを目的に、市民参加型一次スクリーニングとして「スーパー発電菌をみんなで探そうプロジェクト」を行い、選抜された泥からEABを単離した。また、泥以外の環境サンプルを用いた微生物燃料電池からもEABの単離を試みた。

【方法】統一規格で泥の発電能力を評価できる泥電池キット（図1）を考案し、日本科学未来館の協力の基行われた「スーパー発電菌をみんなで探そうプロジェクト」の参加者に配布した。参加者は泥電池キットに各地の泥を入れて発電実験を行い、定常的に電圧を測定するとともに、週1回程度の分極解析により最大出力（ $P_{max}$ ）を把握した。各泥電池の $P_{max}$ を比較することで、発電に適した泥を見つけ出すことができる。高い $P_{max}$ を示した泥電池を大学の研究室に送付していただき、単離源とした。これ以外にも、同時期に運転した消化汚泥などを植種源とした微生物燃料電池からの単離も試みた。単離においては、アノードに付着した微生物の懸濁液をDSM826培地（電子供与体は酢酸、電子受容体はフマル酸）プレートに塗布して出現したコロニーを、プレート培養と液体培養を繰り返すことで純化した。得られた単離株については、16S rRNA 遺伝子断片の配列解析、純粋培養の電気化学

セルを用いた電流生成試験、ゲノム解析に用いた。

【結果・考察】本助成の2年間の研究において、30株以上を単離し凍結保存した。その中には、新種と考えられるEABが6株含まれる（表1）。このうちの4株（60473, ADMFC1, ADMFC2, ADMFC3）については、新奇性の高さや発電能力の高さから特許出願し、寄託センターに寄託した。60473株は諏訪湖沿岸の泥から単離されたもので、既知のEABと比べて非常に高い電気化学活性をもつ（例えば既知のEABである *Shewanella oneidensis* は、同条件で0.2mA/cm<sup>2</sup>程度の電流を生成する）。また、この株を運転中の微生物燃料電池に投入すると発電量が顕著に向上することが確かめられ、60473株は産業上極めて有用なEABと考えられた。

ADMFC1からADMFC3は消化汚泥微生物燃料電池から単離されたEABであるが、16S rRNAやゲノム配列からいずれも新種と考えられる。また、それぞれの分類群において同定された最初のEABであり、本成果はEABの多様性に関する新たな知見を提供している。これらの株の電子伝達機構の解明が望まれる。

YSD1とYA1はそれぞれの属で初めてのEABである。*Neobacillus* に近縁の *Bacillus* 属においては数株のEABが知られているが、それらの電気化学活性は低い（いずれも0.05mA/cm<sup>2</sup>以下）。よって、YA1株の比較的高い電気化学活性には興味を持たれる。

以上のように、本研究において学術的にも産業的にも興味深いEABを複数単離することができた。今後の研究では、これらを公的保存期間に寄託して新種記載を行う予定である。またいくつかの株については、バイオオーグメンテーションにおける利用の検討を行い、バイオマス廃棄物などからエネルギーを回収する微生物燃料電池の実用化に貢献していきたい。



図1 泥電池キットの構成

表1 新種と考えられる単離株

株名	電気化学活性 <sup>1</sup>	推定される分類 <sup>2</sup>
60473	1.5	<i>Geobacter</i> 属
ADMFC1	0.6	<i>Eubacteriales</i> 目
ADMFC2	0.2	<i>Sulfurospirillaceae</i> 科
ADMFC3	0.4	<i>Geovibrio</i> 属
YSD1	0.3	<i>Fundidesulfovibrio</i> 属
YA1	0.4	<i>Neobacillus</i> 属

<sup>1</sup> 電気化学セルにおける電極面積当たりの電流値 (mA/cm<sup>2</sup>)

<sup>2</sup> 16S rRNA 遺伝子配列を基にした推定

# 全国の醤油醸造蔵から分離される耐塩性乳酸菌のゲノム多様性と菌株保全

和田 崇之

【目的】耐塩性乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*) は、醤油製造における高塩条件下の発酵過程において、pHの低下を促進するとともに、複雑な風味の形成に寄与する各種低分子化合物を産生する重要な微生物である。とりわけ、日本の伝統的な醤油製法では、麹菌や酵母とは異なり、乳酸菌がスターターとして意図的に事前投入されることは少なく、自然環境由来の菌叢から発酵過程で選択的に定着・増殖してきた経緯があると考えられる。そこで本研究では、伝統的製法と地域性を維持・継承する全国の醤油蔵由来株を分離し、そのゲノム多様性を明らかにし、各株における発酵環境への適応(家畜化現象)の可能性を検証した。

【方法】全国の醤油蔵(54蔵)から未滅菌試料(計106検体)の分与を受け、MRS培地(30℃, 嫌気培養)を用いて菌株分離を試みた。寒天培地上にて集落を形成した431株から特異的PCRによる菌種鑑別を行い、2株以上の単離が得られた43蔵(図1)由来の計86株を選抜し、ショートリードシーケンスを実施した。得られた配列をアセンブリし、ドラフトゲノムを構築後、コアゲノム解析に基づく分子系統樹を作成した。さらに、パンゲノム解析によって株特異的な機能遺伝子を検索し、発酵環境への適応に関連する遺伝的变化を検証した。加えて、ヒスタミン合成遺伝子(*hdc*)保有株を対象として、ロングリードシーケンスを併用し、完全長ゲノムおよびプラスミド構造の決定を試みた。



図1 *T. halophilus* 分離蔵(43株)の分布

【結果・考察】選抜した*T. halophilus*のゲノム解析によって構築された分子系統樹(図2)では、種内系統が複数確認された。構築された系統樹では、これまでに報

告されていない新規の分岐群が複数認められ、醤油製造に参与する*T. halophilus*の遺伝的多様性が従来想定されていたよりも高いことが示唆された。一方で、分離地域間に明確な地理的分化は見られず、特定地域に特異的な系統の形成は限定的であった。このことから、地理的な隔たりにかかわらず蔵間での菌株移動が広範に生じている可能性が考えられ、発酵環境に適応した菌株が各地で共有されてきた歴史的背景も示唆された。

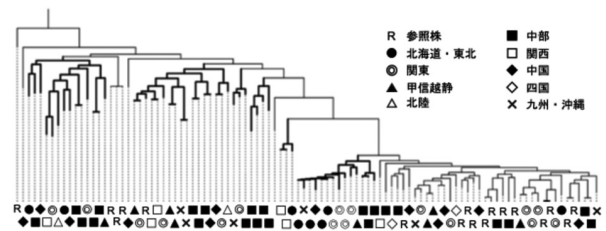


図2 *T. halophilus* コアゲノム分子系統樹

パンゲノム解析により、アクセサリ遺伝子には糖代謝に関連する機能遺伝子が顕著に存在していることが明らかとなった。アクセサリ遺伝子は、各系統において発酵環境への適応圧がはたらいて機能的拡張が進んだ結果と考えられる。

ヒスタミン合成に参与する*hdc*オペロンを保有する株については完全長ゲノム配列を決定し、すべての株においてプラスミド上に*hdc*オペロンが存在していることが確認された。また、未報告の新規プラスミド構造が複数同定され、さらに性線毛遺伝子群を併存するプラスミドが、同一蔵内の異なる系統株間で共有されている事例も認められた。この結果は、ヒスタミン合成能がプラスミドを介して蔵内で水平方向に伝播してきた可能性を示唆している。また、*hdc*オペロン自体にも構造的バリエーションが存在し、発酵環境におけるプラスミド進化の多様性が示された。

完全長ゲノムの比較により、本菌におけるシntenニー構造は保存性が高く、ゲノム内組換えの発生頻度は低いことが示唆された。強い選択圧のもとでは機能的に最適化されたゲノム構造が保持される傾向があることが先行的に示唆されており、本研究で観察された*T. halophilus*のゲノム保存性は、発酵環境という特殊な条件下での適応過程を反映している可能性が考えられる。

## 発酵食品に棲息する海洋細菌の多様性と系統分類学的研究

石川 森 夫

【目的】 海洋環境には、そこを棲家とする多様な細菌が存在する。その中で、プロテオバクテリアに属する海洋細菌は好塩性、好アルカリ性、好・耐冷性の性状をもつことで特徴づけられる。一方で、食品中からの海洋細菌の分離報告例は限られている。しかし、近年盛んに行われているメタゲノムの手法を適用した培養非依存の細菌叢解析により、ソフトタイプのナチュラルチーズに *Psychrobacter* 属、*Pseudoalteromonas* 属、*Halomonas* 属などの海洋細菌が主要な細菌叢を構成していることが明らかになってきている。このように、海洋細菌は海洋環境に限らず種々の環境に存在し、未知の菌種を含む多様な分類群を構成している可能性が考えられる。そこで本研究では種々の発酵食品からプロテオバクテリアに属する海洋細菌の分離を行い、その分離源の多様性、系統分類学的性質を明らかにすることを目的としている。

【方法】 プロテオバクテリアに属する海洋細菌は一般に好塩性の性状を有するため、食塩を含有する発酵食品に着目し、ソフトタイプのナチュラルチーズ（ウォッシュチーズ）、くさや浸漬液、このわた、めふん等の魚介類の塩蔵発酵食品を分離試料とした。分離培地には Marine agar, NaCl (2-5%) を含有する TSB agar, Plate Count Agar, Funke medium, および人工海水培地を用い、15℃または30℃の条件で、直接平板培養により分離を行った。純化後の分離株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、近縁種の検索を行った。うち、系統的に独立していることが認められた株について、電子顕微鏡観察による形態学的性状、NaCl, pH, 温度に対する挙動等、生理学的性状を明らかにした。また、これら分離株のゲノム DNA を抽出後、*de novo* シークエンスによってドラフトゲノムを決定し、近縁既知種および分離株間の ANI 値の算出、ならびにゲノムオルソログ遺伝子に基づく分子進化系統樹を作成した。これにより、分離株の系統分類学的位置付けを確定した。

【結果・考察】 種々の塩蔵発酵食品から海洋細菌の分離を行った結果、ウォッシュチーズから18株、くさや浸漬液から16株、このわたから5株、計39株のグラム陰性細菌を単離した。これら分離株について16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った結果、分離株は *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Psychrobacter* のいずれかの属内に位置した (図1)。このうち、近縁既知種との相同値が99.1%未満で独立した9つの clade (Taxon A-I) を構成した17株の形態学的、生理学的性状を調査した結果、分離株はいずれも桿菌で、NaCl 2-10%を至適域

にもつ好塩性、pH 7-9.5に至適域をもつ好アルカリ性の性状を有していた。一方、生育至適温度は28-37℃、4℃での生育は見られず中温性で、好/耐冷性の性状はもたなかった。アッセンブル後のドラフトゲノムシーケンスについて ANI 解析に供した結果、Taxon A が *Marinobacter* 属内で、Taxon B, C が *Halomonas* 属内で、Taxon E, F, G が *Psychrobacter* 属内で近縁既知種との ANI 値が95%未満であり、6種の新規分類群を構成し、保存機関への寄託準備中である (表1)。また、ゲノムオルソログ遺伝子に基づく系統において Taxon D は *Halomonas* 属と *Marinobacter* 属の中間的位置で独立した系統枝を構成したことから、新属を構成することが示唆された。

以上、海洋細菌は海洋環境に限らず、塩の存在を共通の環境条件とする種々の環境に存在し、未知の菌種を含む多様な分類群を構成することが示唆された。

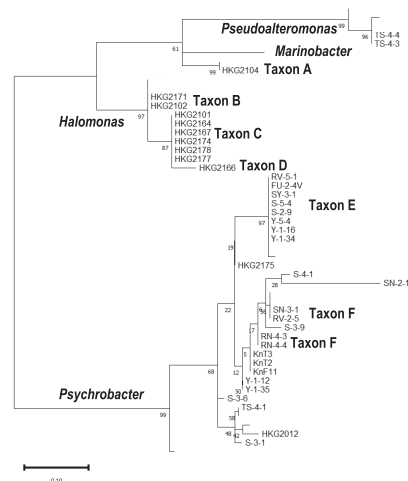


図1 分離株の16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹

表1 分離株のゲノム配列に基づく ANI 値 (%)

Taxon	株数	Taxon 内 ANI (%)	最近縁種との ANI (%)
A	1	—	83.8
B	2	99.9	<90.7
C	6	>97.8	<88.7
D	1	—	<86.7
E	2	97.1	<89.8
F	1	—	79.1
G	2	99.9	<83.0
H	1	—	97.0
I	1	—	97.7



## 日本ワインの自然発酵に関する酵母の多様性解明とバイオリソース基盤整備

乙 黒 美 彩

【目的】「ワインの自然発酵を担う微生物のバイオリソース化」を目指し、ブドウ畑におけるワイン用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および Non-*Saccharomyces* 属酵母の探索と多様性の解明を目的とした。

ワイン醸造においては産地の気候や風土など個性を重視するテロワールという概念が存在する。海外の研究結果から、テロワールの構成要素に微生物の存在も重要であると考えられるようになってきた。一方、国税庁が令和6年12月に発表した最新の調査によると、令和6年1月時点で日本国内に493場のワイナリーがあり、1年間でおよそ30のワイナリーが新設されたことになる。そのため、近年では他の産地との差別化を図るため、産地の個性を重視し土着の微生物を利用した自然発酵を用いてワイン醸造を行うワイナリーが増加している。地球温暖化の影響でブドウの栽培範囲が東北地方や北海道、高地に移動してきているが、土着の微生物も温暖化の影響を受けることが予想され、自然発酵を担う土着の微生物のバイオリソース化は喫緊の課題である。

【方法】山梨県内5カ所のワイナリー（韮崎市、甲州市）を含む、北海道、長野県、山口県にあるワイナリーから日本で栽培されている代表的醸造用ブドウ品種の提供を受けた。ブドウの収穫時期は各圃場での収穫適期とし、9月上旬から10月中旬ごろであった。これらのサンプルを対象に自然発酵させたマストから発酵前期、中期、後期に酵母を分離した。分離した酵母はMALDI-TOF MSおよびLSU rRNA 遺伝子のD1/D2領域塩基配列を用いて同定した。分離株はワイン醸造用微生物として、ワイン科学研究センターにて保存した。分離された *S. cerevisiae* 分離株についてはInter-delta PCR法を用いて遺伝子型を解析し、一部の分離株については果汁発酵試験によりワイン醸造特性を調査した。

【結果・考察】ブドウの自然発酵のマストから酵母3,066株を分離した。これらは17属26種に配属され、非 *Saccharomyces* 属酵母が大半を占めた。地域間や品種間の種構成の差異を評価するために、酵母の分離頻度を比較すると、北海道浦臼町のツバイゲルトから最も多く分離された菌種は *Metschnikowia shanxiensis* (69.4%) であり、次いで *Torulaspora delburueckii* (30.6%) が続いた。ピノ・ブランでは *Rhodotorula nothofagi* (99.4%) が優占種となった。長野県上田市では、シャルドネ、メ

ルロー、カベルネ・ソーヴィニオンから最も多く分離された菌種は *Hanseniaspora uvarum* (それぞれ87.5%, 63.7%, 62.5%) であった。シャルドネでは *R. nothofagi* (9.9%)、メルローでは *H. valbyensis* (25.8%)、カベルネ・ソーヴィニオンでは *S. cerevisiae* (26.9%) と次いで多く分離された(図1)。山梨県勝沼町のメルロー、カベルネ・ソーヴィニオンにおいても *H. uvarum* の分離頻度が最も高く、それぞれ56.9%, 46.9%となった。次いでメルローでは *Zygosaccharomyces bailii* (20.1%)、カベルネ・ソーヴィニオンでは *Starmerella bacillaris* (41.6%) であった。山口県周防大島のヤマソーヴィニオンでは *Meyerozyma caribbica* が優占種となり、ヤマブランでは *H. guilliermondii* であった。その他の16種については1試料のみから検出されただけであった。長野県と山梨県のメルローとカベルネ・ソーヴィニオンからは *H. uvarum* が共通して優占種として検出された。特に山梨県のサンプルには *Hanseniaspora* 属 (*H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *H. vinea* 等) が高頻度で分布していた。*S. cerevisiae* は長野県、山梨県以外のサンプルからは分離することはできず、果実に付着する *S. cerevisiae* の国内分布は極めて少ないことが示唆された。

長野県と山梨県のサンプルから分離された *S. cerevisiae* 分離株は両県で異なる遺伝子型を示したことから、遺伝的多様性が分離源の地域と関係していることが示唆された。さらに *S. cerevisiae* と同定された長野県由来のE-253とE-400および山梨県由来のH-267とH-389、4株を用いて同一条件でワインを醸造し、ワイン中の化合物について菌株間の有意差検定を行ったところ、乳酸、酢酸、イソブチルアルコール、オクタン酸エチル、デカン酸など16種について分離源別での有意差が見られた。

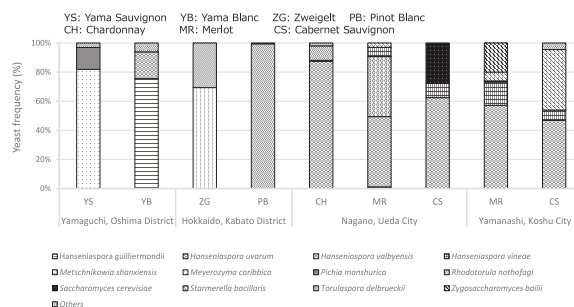


図1 ワイン用ブドウから分離された酵母の分布頻度

# スゲ属植物に寄生する日本産さび病菌の DNA バーコードデータベースの構築と多様性の解明

山岡 裕一

**【目的】** 本研究では、日本産のスゲ類に寄生するサビキン (*Puccinia* 属) の未同定標本を、菌類のDNA バーコード領域である rDNA ITS 領域に基づき、真菌類の分子同定のために作成されたデータベース UNITE と配列データ管理のためのプラットフォーム PlutoF を活用して種仮説 (SH, Species Hypothesis) レベルで同定することを目的とした。また、スゲ類の同定、さび胞子世代宿主の推定、胞子等の形態情報をリンクさせて各菌群の SH を検証し、それらの分類学的位置づけ決定のための基礎情報を収集した (図1)。

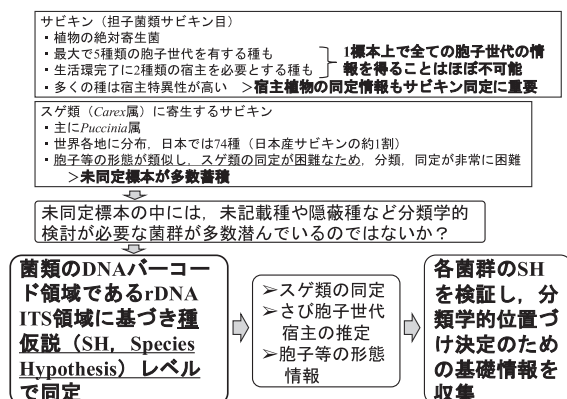


図1 本研究の背景と目的

**【方法】** 筑波大学および茨城大学保存標本、及び北海道、青森県、長野県、茨城県、大阪府、熊本県、沖縄県で採取した標本を供試し、約370標本からrDNA ITS2領域及びLSU rDNAの部分配列を得た。塩基配列が一致した標本が多数得られた場合は、その中から3~4標本の配列を選び、計156配列を選抜し、GenBankより取得した81配列を加えて最尤法 (RAxML-ng) 及びベイズ法 (MrBayes) による系統解析を行った。外群としてイネ科植物に寄生する *Puccinia* 属菌4種の配列を用いた。また、本研究で配列を取得した57菌群について、PlutoFを用いてITS2領域によるSH Matching analysis (ver. 2.0.0) を行った。

**【結果・考察】** ITS2-LSU D1領域を用いた系統解析の結果、日本産スゲ類のサビキンとして59菌群が認められた。うち15菌群は、形態的特徴や宿主から既知種と同

定したが、残りの44菌群は“G-”No. を着けて識別した。

SH Matching analysis を行った結果、既登録データと一致したのは7菌群のみで、36菌群が閾値 (Distance threshold levels) 3.0% 以下、3菌群が2.5% 以下、5菌群が2.0% 以下で新分類群と推定される菌群 (“new sh” または “new singleton”) と判定され、データベースに未登録の塩基配列を有する菌群が多数検出された。

今回の解析により高い閾値で新分類群と推定された菌群の中には、宿主として未報告のスゲ類に寄生するサビキンが13菌群 (G-1, 7, 8, 12, 13, 14c, 17, 18, 22, 23, 28, *Puccinia caricis-gibbae*, *P. velutina*) 含まれた。また、4菌群 (G-1, 3, 18, 22) については、形態的特徴から未記載種と考えられた (表1)。また、1「*P. albispora*, *P. seijoensis*, *P. hibayamensis*, *P. caricis-gibbae*, *P. caricis-stipatae* の5種については、種内に複数の菌群が検出された。」、2「菌群 G-4 は形態的に *P. caricis-japonicae* とほぼ一致したが、遺伝子解析では近年中国で記載された *P. caricis-tenuiformis* と一致した。」、3「近年中国で記載された *P. caricis-artemisiae* がヨモギをさび胞子世代宿主とする複数の菌群 (G-2, G-3, *P. dioicae* var. *micropuncta*) と一致または非常に近縁と判定された。」、4「近年中国で記載された *P. caricis-jilinensis* はイラクサの仲間をさび胞子世代宿主とする2菌群 (G-11a, 11c) と一致した。」など、分類学的検討を要する課題が多数見つかった。また、さび胞子世代宿主の候補となる植物が新たに7菌群 (G-1, 4, 15, 18, 19, 22, 25) で発見され、本菌群の生態の解明や寄生性と系統群の関係性解明の一助となると考える。

本研究により、日本産スゲ類に寄生するサビキンの中に未記載種を含む分類学的検討が必要な多くの菌群が存在することが明らかになったが、各菌群の分類学的所属の決定には、今後、比較に必要な標本の詳細な形態観察や他遺伝子領域の系統解析を行い、慎重に検討する必要がある。

表1 未記載種と考えられる菌群

菌群	冬胞子世代宿主	さび胞子世代宿主
G-1	メアオスゲ	キツネアザミ
	ハマアオスゲ他	
G-3	ヤガミスゲ	ヨモギ
G-18	カンスゲ	ニワトコ
G-22	アズマスゲ	フクオウソウ

## 細胞融合技術を利用した新規バクテリオファージ単離手法の開発

常 田 聡

【目的】バクテリオファージ（ファージ）は細菌に特異的に感染するウイルスであり、ヒトの腸内から深海まで細菌が存在する場所であれば至る所に存在する。総量は $10^{31}$ 粒子とも言われ地球上で最も多いウイルスとされる。ファージは高い宿主特異性を持ち、特定の細菌のみを溶菌できることから、新規抗菌技術や環境中の細菌制御への応用が期待されている。しかし、腸炎の病原菌である *Clostridioides difficile*、腸内環境に影響する *Bacteroides* 属菌、および窒素循環に関わる硝化細菌など多くの重要細菌はファージの単離が困難である。本研究では、細胞融合技術を利用し、ファージ易取得細菌とファージ難取得細菌を融合させることで、ファージ難取得細菌にファージ易取得性を付与する手法の開発を目的とした。

【方法】ファージ易取得細菌として *Escherichia coli* JM109 を選択し、難取得細菌モデルとして系統学的距離の異なる4種のファージ (*E. coli* TK001, *E. fergusonii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Atlantibacter hermannii*) との融合を試みた。両親株に異なる薬剤耐性遺伝子を導入し、プロトプラスト融合法で処理後、両方の薬剤を含む培地で選別を行った。得られた融合株について、走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察、ファージ感受性試験、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を実施した。ファージ感受性試験では、JM109 で増殖可能な42株のファージライブラリー (Kaneko *et al.*, 2023, 2025) を用いて各親株および融合株に対する溶菌活性を評価した。また、融合株のゲノム解析では、両親株および融合株のショートリードデータを用いて、各親株ゲノムに対する depth を計算し、融合状態を評価した。

【結果・考察】4種類のファージ難取得細菌とJM109との融合により、それぞれ4株ずつの融合株 (JT1-4: JM109とTK001の融合株, Jf1-4: JM109と*E. fergusonii*の融合株, JC1-4: JM109と*C. amalonaticus*の融合株, Jh1-4: JM109と*A. hermannii*の融合株) を得た。SEM観察の結果、融合株はJM109および相手親株とは異なる形態を示すものが見られ、特にJM109とTK001の融合株JT2は明瞭な球状形態を示した (図1)。また、系統学的距離が遠い *C. amalonaticus* および *A. hermannii* との融合株では、親株の中間的な形態が観察された。

ファージ感受性試験では、融合株は互いに異なる感受性パターンを示した。JM109とTK001の融合株では、

親株と比較して感受性に大きな変化は見られなかったが、その他の細菌種との融合株では、JM109とは明らかに異なる感受性パターンが観察された。特に *C. amalonaticus* および *A. hermannii* との融合株では、JM109感染ファージに対する感受性が低下し、むしろ相手親株の性質に近い反応を示した。これは融合株が両親株の性質を併せ持ちながらも、JM109以外の親株の性質をより強く保持していることを示唆している。

ゲノム解析からは、JM109と系統学的距離が遠い *C. amalonaticus* および *A. hermannii* との融合株において、明確な融合の証拠が得られた。TK001との融合株では、両親株に対する depth に大きな差は見られなかったが、*E. fergusonii* との融合株では1株 (Jf3) でJM109に対する depth が著しく低下し、*C. amalonaticus* との融合株でも1株 (JC1) で同様の傾向が観察された。*A. hermannii* との融合株では全株で *A. hermannii* に対する depth がJM109より明瞭に高く、最も明確な融合パターンを示した。

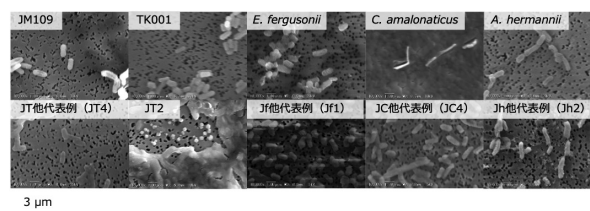


図1 親株と融合株のSEM画像

本研究では、細胞融合法により作製した融合株が両親株の性質を併せ持ちながらも、系統学的距離が遠いほど相手親株の特性をより強く保持する傾向が示された。特に *C. amalonaticus* および *A. hermannii* との融合株では、ゲノム解析から明確な融合の証拠が得られ、形態とファージ感受性にも変化が見られた。

本手法により、これまでプラークが検出できなかったファージ難取得細菌からのファージ単離が可能になると期待される。今後は、*C. difficile*, *Bacteroides* 属菌、および硝化細菌など医療・環境面で重要なファージ難取得細菌への応用を進め、新規ファージの単離・同定を目指す。また、融合株における両親株由来のゲノム要素の保持パターンを詳細に解析することで、ファージ感受性に関与する遺伝子領域の特定も進める予定である。

## ヒト腸内における有益な難培養 *Clostridium* 属菌の分離・分類 ～腸内嫌気性菌のバイオリソースの拡充～

阪口 義彦

【目的】 *Clostridium* 属菌は、私たちの腸内で常に検出されるにも拘わらず、その役割は不明である。我々は、肝疾患患者と健常人の腸内細菌叢を解析したところ、異なる *Firmicutes* 門の構成を示し、健常人からはこれまで分離されたことのない新種が多く存在していた。本研究課題では、肝疾患患者と健常人の腸内における *Clostridium* 属菌の比較解析データをもとに、健常人の腸内に常在する難培養 *Clostridium* 属菌の分離・分類を試みた。

### 【方法】

#### 1) 肝疾患患者糞便の細菌叢解析

新たに複数の肝疾患患者の糞便検体から DNA を精製し、得られた DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマー対を作製し PCR を行った。得られた PCR 産物について次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。本配列情報をもとに BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析を行い、糞便中の細菌叢を解析した。

#### 2) ヒト糞便からの難培養 *Clostridium* 属菌の分離

ヒト糞便を嫌気ワークステーション内で種々の培地 (BHI, 変法 GAM, プルセラ HK など) に接種し、35℃ で 2 日から 1 週間嫌気培養を行った。分離株は、16S rRNA 遺伝子解析により属を推定した。

#### 3) ヒト糞便の熱、エタノール、凍結融解処理による細菌の構成変化

ヒト糞便を熱 (100℃)、エタノール (終濃度 70%)、により時間依存的 (1 分間、2 分間、5 分間、10 分間) に処理した。また、凍結融解を繰り返した後も検討した。処理した糞便を 4℃、8,000 回転、5 分間遠心し、上清を除去した。また、沈渣を PBS (-) で洗浄することで溶菌した DNA を除去した。得られた沈渣から DNA を精製し、方法 1) と同様に糞便中の細菌叢を解析した。

【結果・考察】 新たに複数の肝疾患患者と健常人の腸内細菌叢の解析により、肝疾患患者に比べて健常人では異なる *Firmicutes* 門の構成を示した。特に、*Clostridia*, *Bacilli*, *Erysipelotrichia* の割合が高かった。本研究課題では、肝疾患患者においてより詳細な腸内細菌叢の解析を行ったところ、肝疾患患者において特定の *Clostridium* 属菌の割合が高くなることを明らかにした。そこで、*Clostridium* 属菌と肝疾患との関係性に着目した。肝疾患患者の糞便検体が少ないことから、まずは、健常人のヒト腸内に常在する難培養 *Clostridium* 属菌の分離培養

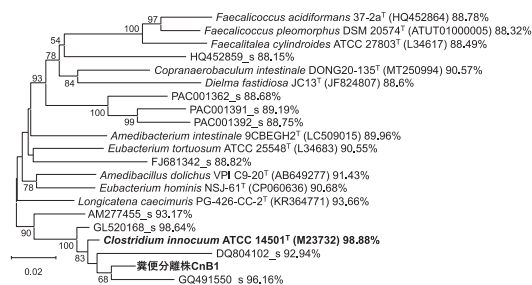


図1 16S rRNA 遺伝子に基づいた相同性の高い菌株との系統樹 (近隣結合法)

の確立を試みた。ヒト糞便を種々の培地に接種し 35℃ で 2 日間、嫌気培養を行ったところ *C. innocuum* に近縁な菌株 (CnB1 株) を取得することができた (図 1)。 *C. innocuum* の基準株とクラスターを形成しており、環境 DNA の GQ491550\_s, DQ804102\_s, GL520168\_s と近縁であった。分離株は、系統解析においてどの菌種とも系統学的に離れていたことから、新種の可能性が高いことが考えられた。しかしながら、他の菌種の増殖が多く、*Clostridium* 属菌の分離が困難であった。そこで、他の菌種を排除するために、ヒト糞便を熱、エタノール、凍結融解処理を行い細菌の構成を調べたところ、凍結融解処理後に熱またはエタノール処理することで、最も *Clostridium* 属菌の割合が増加し全体の約 60% を占めていた (図 2)。今後、このような前処理を行うことで、*Clostridium* 属菌の効率的分離法の開発が期待される。

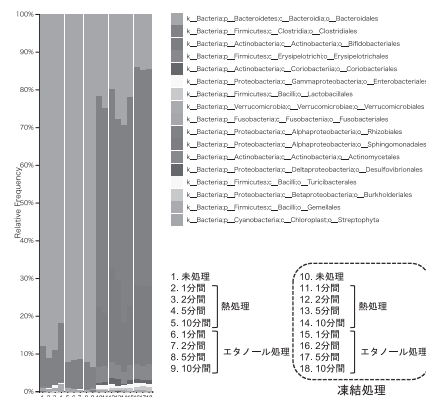


図2 ヒト糞便の熱、エタノール、凍結融解処理による細菌の構成変化

## 難培養アーキア *Candidatus Methanogranum caenicola* 共培養系のゲノムおよび培養特性解析

飯野 隆夫

【目的】 *Methanomassiliicoccus* 目はヒトや昆虫の腸管や嫌気消化槽など多様な環境から遺伝子レベルで検出されることから、健康・環境など多方面の研究分野で注目されてきた。2012年に初の培養株が報告されたが、現在までにヒト糞便由来の2株しか得られておらず、系統分類学的多様性や生態学的役割など今なお不明な点が多い。我々は、メタン発酵リアクターから第3の種と考えられるメタン生成アーキア Kjm51a 株の集積培養に成功した。しかし、FISHに基づく培養物中のアーキアの比率は  $3.5 \pm 1.4\%$  と著しく低く、純粋分離が困難な状況にある。本研究では新規メタン菌 Kjm51a 株の純粋分離実現に向けて、培養特性とゲノム情報の両面から、Kjm51a 株-細菌間の代謝生理コンソーシアムを解明する。

【方法】 メタノールと酵母エキスを含む液体培地を基礎培地として用いた。気相を  $N_2$  で置換した。Kjm51a 株の集積培養物を接種した後、 $30^\circ C$  で培養し、メタンや水素などの気相成分をガスクロマトグラフィーにより定量することで培養物の増殖を判定した。また、培養物からDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子 V4 領域を標的とした次世代アンプリコンシーケンス解析、およびDNBSEQとGridIONによるアーキア・細菌の全ゲノム配列を決定した。

【結果・考察】 Kjm51a 株を含む集積培養物の16S rRNA 遺伝子 V4 領域に基づくアンプリコンシーケンス解析を行った結果、Kjm51a 株の他、3種の細菌で構成された。Kjm51a 株の比率は8%だった。メタン菌・細菌の挙動を明らかにする為、培養物中の代謝産物の変化を継続的に分析した(図1)。培養4日目には水素 ( $H_2$ ) と二酸化

炭素 ( $CO_2$ ) が増加した。10日目からメタン ( $CH_4$ ) が増加し、同時に  $H_2$  が顕著に減少した。 $CO_2$  の減少は見られなかった。培養28日後の培養液中には酢酸が生成されていた。同様の観察をメタン生成菌の生育阻害剤であるBESを添加した条件で実施した結果、 $H_2$  と  $CO_2$  の増加は見られたが、その後の  $CH_4$  増加と  $H_2$  減少は見られなかった。このことから、細菌が  $H_2$  と  $CO_2$  を生成し、その  $H_2$  を利用してメタン菌 Kjm51a 株がメタンを生成すると考えられた。

培地成分の酵母エキスの効果を検証する為、酵母エキスを有機酸塩や20種類のタンパク質構成アミノ酸混合液に置き換えて集積培養物の培養を行なった。有機酸塩やアミノ酸混合液単独でメタン生成は見られなかったが、アミノ酸混合液と酢酸両方を加えた時、28日目以降にメタンが検出され始め、63日で定常に達した。この結果から、Kjm51a 株はアミノ酸供給に加え、細菌の代謝産物である酢酸を生育に要求すると考えられた。ただし、本条件ではメタン生成に酵母エキス添加時の4倍以上の日数を要し、生成量も1/7程度であったことから、Kjm51a 株の生育に酵母エキスはアミノ酸源以外の効果が機能すると考えられる。

1Lの集積培養物からゲノム解析を実施した結果、メタン菌および細菌の4本のコンティグを取得した(表1)。Kjm51a 株のゲノムサイズは1.1Mbで、既知の2種と比べて小さかった。Kjm51a 株は *mcrABGCD* を保持する他、メタノールからのメタン生成を修飾する *mtaABC* を保持し、本株のメタノール利用性を支持する結果となった。一方、酢酸からアセチル-CoAへ修飾する *acs* を有したが、以降のMethyl- $H_4$ MPTからMethyl-S-CoMを修飾する *mtrA* を保持せず、酢酸、 $CO_2$  やギ酸からメタンを生成できないと推定した。

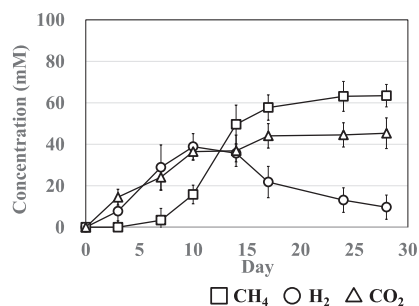


図1 集積培養物中の気相成分の変化

表1 集積培養物中のメタン菌および細菌の比率とゲノム情報

	1	2	3	4
集積培養物中の比率 (%)	8.0	43.9	12.7	35.4
ゲノムサイズ (Mbp)	1.1	4.1	2.0	3.6
G+C 含量 (%)	62.2	48.2	45.3	41.6
完全性 (%)	98.7	100	100	99.3

1. Kjm51a 株, 2. *Aminipila* sp., 3. *Aminobacterium* sp.,  
4. *Proteiniphilum* sp.

## ショウジョウバエ体内に存在する酵母叢の多様性解析

清 家 泰 介

【目的】酵母は果実や花、植物表面だけでなく、土壌や昆虫体内など多様な環境に生息している。なかでもショウジョウバエは発酵果実中の酵母を餌資源とし、その飛翔性により酵母の媒介や分散に関与していると考えられている。このような背景から、両者は相互依存的な関係を築いている可能性があるが、これまでの研究では酵母がハエに与える影響に偏っており、ハエ体内における酵母の多様性や適応的戦略は未解明のままであった。特にショウジョウバエの腸管には「クロップ」と呼ばれる微生物の一時貯留器官が存在し、酵母にとって特異な生態的環境となっている可能性がある。本研究では、日本各地から採集したショウジョウバエを対象に、体内に棲息する酵母の多様性と生態的特性を明らかにすることを目的とした。特定の植物やキノコに依存する種も含め、幅広いニッチにわたる調査を通じて、ショウジョウバエの生態的嗜好性と酵母叢の関係を解析し、酵母の自然界における適応戦略の理解を目指す。

【方法】本研究では、日本全国120か所以上において、ショウジョウバエおよびその周辺環境（果実、植物、土壌など）を採集対象とした（図1）。ハエはバナナトラップによって採集し、採集後は速やかに無菌的に処理した上で、体内から内容物を抽出した。内容物は複数の酵母選択培地（YPD, YEAなど）に接種し、25～30℃下で数日間培養してコロニーを形成させた後、単離・純化した。単離された酵母株については、DNAを抽出し、26SリボソームRNA遺伝子のD1/D2領域をPCRにより増幅したうえで塩基配列を決定し、得られた配列情報に基づいてBLAST検索および系統樹解析により分類・同定を行った。また優占種を確認するため、メタ26S解析を実施した。そして同定結果をもとに分類群ごとの頻度や分布傾向を整理し、ハエの生活環境や種分類との関係を検討した。

【結果・考察】本研究により、ショウジョウバエおよびその環境から合計1,936株の酵母を単離することに成功し、D1/D2領域の塩基配列に基づく分子系統解析の結果、これらの株は29科78属223種に分類された（図1）。注目すべきは、14種が新種候補と判定され、そのうち2種については形態的・生理的・分子系統学的な解析を経て新種記載に至った点である。そのうちの1種は沖縄の「昆虫体内」というこれまで見過ごされていたニッチから多様な種が検出された点で学術的意義は大きい。

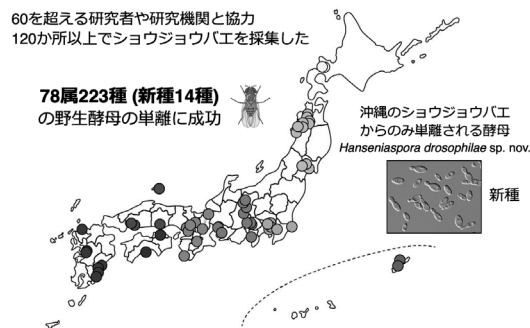


図1 ショウジョウバエの採集地点と得られた酵母株数（地域ごとにシンボルの色を分けて表示）

特に *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Starmerella bacillaris* などの発酵性酵母は、果実を餌とするショウジョウバエから高頻度で検出され、これらの酵母が果実環境に適応し、ハエを介して分布を拡大していることが示唆された。一方で、メタ26S解析の結果、ゲットウやノアサガオといった花を生活環境とするハエからは、検出される酵母種が限られていた。このことから、ショウジョウバエの採餌行動や産卵場所の選好といった生態的嗜好性が、体内酵母叢の構成に対して選択的な影響を与えていることが明らかとなった。すなわち、酵母の種多様性や生息ニッチの形成は、宿主昆虫の行動生態に大きく依存している可能性が高い。また、体内から単離された酵母の多くが高い胞子形成能を示したが、同一株を実験室内で継代培養した場合にはその能力が著しく低下する傾向が観察された。これは、ハエ体内が栄養制限的で不安定な特殊環境であり、そうした条件が胞子形成を誘導するトリガーとなっている可能性を示している。酵母にとって胞子形成は生存と散布の両面で有利な戦略であり、ハエ体内はそれを選択的に促す環境であると推察される。

本研究は、従来十分に検討されてこなかった昆虫体内の酵母叢というニッチに着目し、酵母の多様性と適応戦略を明らかにする上で新たな知見をもたらした。また、ショウジョウバエという媒介昆虫が酵母の生態や進化に及ぼす影響を実証的に示したことで、微生物-動物間の相互作用に関する生態学的理解を深める契機となった。このような研究は、応用的には新規な有用酵母の探索や発酵技術の開発にもつながる可能性があり、基礎と応用をつなぐ研究展開が期待される。

## 難培養性細菌群 *Verrucomicrobiota* 門細菌をターゲットとした バイオリソース基盤の構築

田中靖浩

【目的】近年のメタゲノムをベースとした環境試料の解析により、*Verrucomicrobiota* 門は環境中に広く分布する一方で、多糖分解能、抗生物質生産能、植物生育促進能などの有用な機能を持つ可能性が明らかになってきた。しかし、本細菌群は難培養性であることから、“生きた状態”での微生物資源としての利用が限定され、また、その特性など不明な点も多い。このような背景から、我々はこれまでに当該細菌群を含めた未培養・難培養性微生物の分離培養技術として“ウキクサー-微生物共培養法”（環境試料の微生物群集を無菌のウキクサーに接種・共培養した後、ウキクサー本体のホモジナイズ物あるいは栽培液を通常の平板培養法の試料として供する方法）を提案した。一方、土壤中に分布する *Verrucomicrobiota* 門細菌等の難培養性細菌群の細胞サイズは培養が容易な細菌群と比べて小さい傾向にあるとの知見がある。そこで本研究では、精密ろ過膜（0.8～5.0μm 径）による細菌群の分画と“ウキクサー-微生物共培養法”を組合せた方法と従来法を併用すること等で、種々の環境試料からの網羅的な *Verrucomicrobiota* 門細菌の分離培養を試み、当該門に属する菌株で構成されるバイオリソース基盤を構築することを目的とした。

【方法】本研究で用いた環境試料（微生物源）を表1にまとめた。

表1 本研究で用いた微生物源

環境試料	前処理等	サンプルID
河川水	未処理（原水）	FJ_NFCM
	0.8μm 精密濾過膜濾液	FJ_0.8CM
	1.2μm 精密濾過膜濾液	FJ_1.2CM
	2.0μm 精密濾過膜濾液	FJ_2.0CM
	5.0μm 精密濾過膜濾液	FJ_5.0CM
ハス田の水	未処理（原水）	LF_NFCM
	1.2μm 精密濾過膜濾液	LF_1.2CM
湧水	未処理（原水）	SW_NFCM
	1.2μm 精密濾過膜濾液	SW_1.2CM1
	1.2μm 精密濾過膜濾液*	SW_1.2CM2

\*ウキクサー-微生物共培養法後の栽培液をさらに1.2μm 精密濾過膜で濾過したものを使用

“ウキクサー-微生物共培養法”では、上述のようにウキクサー本体のホモジナイズ物または栽培液を通常の平板培養法の試料として供するが、今回は栽培液のみを用いた。取得した分離株については、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき簡易同定を行った。また、構築した *Verrucomicrobiota* 門細菌バイオリソースの有用性について

では一部菌株を対象に、コウキクサ（デンプン、タンパク質を多く含み、バイオ燃料、飼料としての利用等が期待されている）の生育促進能を指標として植物生育促進活性を、Microbial Viability Assay Kit-WST（酸化還元試薬）を用いて多糖類酸化（分解）活性の有無を評価した。

【結果・考察】まず、“ウキクサー-微生物共培養法”に適用する微生物源を精密ろ過膜（孔径0.8, 1.2, 2.0, 5.0μm）処理することで *Verrucomicrobiota* 門の分離培養の割合が向上するかについて河川水を対象に検討したところ、1.2μm 精密ろ過膜による処理が効果的であるとの結果を得た（図1）。そこで、ハス田の水、湧水についても1.2μm 精密ろ過膜処理を行い、“ウキクサー-微生物共培養法”に供したところ、河川水のケースと同様に当該細菌門の取得率の向上が確認され（図1）、これら一連の実験系から合計171株の *Verrucomicrobiota* 門細菌を分離培養できた。また、その他の環境試料を対象に本改良型および従来型の“ウキクサー-微生物共培養法”を適用するなどして47株の当該細菌門に属する菌株を分離培養でき、既存保存株83株と合わせ301株を取得した（298株が種レベル以上で新規）。ただし継代・保存できなかった株もあり、構成株数は最終的に247株で構成される *Verrucomicrobiota* 門細菌バイオリソースを構築できた。

次に、このバイオリソースの一部を対象に植物生育促進活性、各種多糖酸化（分解）活性を有する菌株を検索した。その結果、前者は2株（82株中）、後者についてはイヌリン（15株）、ペクチン（12株）、カラギーナン（17株）、キサントガム（13株）に対して高い酸化（分解）活性を持つ菌株（いずれも55株中）が見出された。また *Opitutaceae* 科に属する3菌株についてゲノム遺伝子を解析したところ、82～225個の多糖分解関連酵素遺伝子を保有していることが明らかとなり、これらは上記菌株の各種多糖類に対する高分解活性を裏付けるものと考えられた。

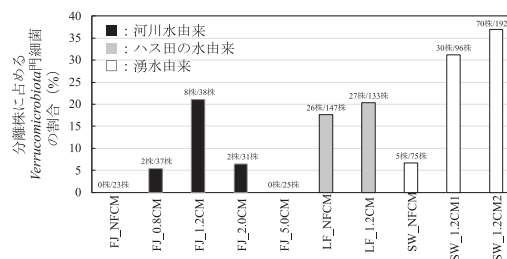


図1 *Verrucomicrobiota* 門細菌の取得率

# 大腸菌の炭素源代謝における酵素量と補酵素量の統合的転写制御機構の解明

島田 友裕

**【目的】** 中心炭素源代謝経路は、あらゆる生物で保存されている生命活動の基盤である。本経路を中心に多様な炭素源代謝経路が拡がっており、様々な局面に応じた制御により、重要な生命現象が引き起こされている。中心炭素源代謝の作動・調節原理が解明されれば、細胞活動の理解さらには操作につながり、疾病の理解や物質生産全般に応用される。これらの制御に関する知見は蓄積し続けているが、代謝フローの転換を引き起こす分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では、基盤的情報が最も整備された大腸菌をモデル微生物とし、中心炭素源代謝の酵素や補酵素の量を統合的に制御する新規転写制御機構の解明をめざした。

**【方法】** 私たちが独自に開発した、転写因子のゲノム上の直接的な標的遺伝子群を網羅的に同定することができる Genomic SELEX (gSELEX) 法を用いて、大腸菌が持つ機能未知な推定転写因子を解析し、中心炭素源代謝を転写の段階で制御する新たな転写因子を探索した。さらに、異なる炭素源における生育や、支配下遺伝子群の転写制御に与える影響を、詳細に検証した。

**【結果・考察】** gSELEX 法を用いた解析の結果、乳酸デヒドロゲナーゼやピルビン酸ギ酸リアーゼ、アセチル CoA シンターゼなど、代謝経路図におけるピルビン酸周辺の複数の炭素源代謝酵素、また、リポ酸やヘムなどの複数の補酵素合成酵素、をコードする遺伝子群のプロモーターに結合する新規転写因子を見出した。

続いて、新規転写因子の生理的機能や役割を明らかにするために、大腸菌野生株 BW25113 と転写因子欠損株 JW5703 について、異なる炭素化合物を用いた際の生育を比較した。その結果、グルコースやフルクトース、キシロース、ピルビン酸など、代謝経路図上でピルビン酸よりも上流の炭素源では、炭素源が枯渇するまでは生育速度に差は生じなかった。一方で、コハク酸やフマル酸、リンゴ酸など、下流の炭素源では、増殖初期から生育速度の低下が観察された (図1)。

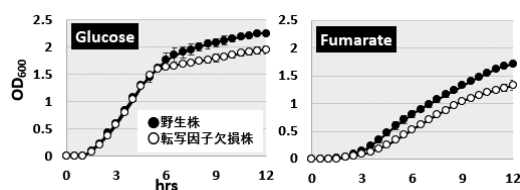


図1 異なる炭素源培地における生育曲線

さらに同一条件において、乳酸デヒドロゲナーゼやピルビン酸ギ酸リアーゼなどの支配下遺伝子群のプロモーター活性を、GFPをレポーターとして測定した。その結果、全ての炭素源において、欠損株では活性が上昇したことから、新規転写因子はこれらの支配下遺伝子群に対して、抑制化に働くことが分かった。また野生株では、ピルビン酸上流の化合物では活性の上昇が観察されたものの、ピルビン酸下流の化合物では低下したままであった (図2)。そこで、培地中のピルビン酸の濃度を段階的に変えたところ、濃度の低下に従って、欠損株ではピルビン酸枯渇から生育速度が低下し、また、野生株ではプロモーター活性の低下が観察された。

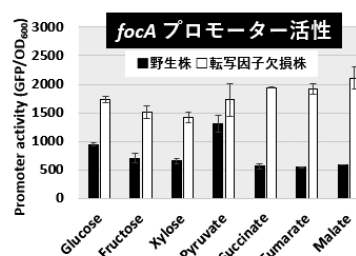


図2 支配下遺伝子の1つ *fociA* のプロモーター活性

次に、全ての支配下遺伝子群の転写に与える影響を検証するため、野生株と欠損株における mRNA レベルを RT-qPCR で検証した。その結果、乳酸デヒドロゲナーゼやピルビン酸ギ酸リアーゼ、酢酸排出経路、リポ酸合成の遺伝子群は抑制化され、アセチル CoA シンターゼやクエン酸シンターゼ、2-OG デヒドロゲナーゼ、スクシニル CoA シンターゼの遺伝子群は活性化されることが分かった。

本研究結果から、新規転写因子は、1. ピルビン酸もしくはアセチル CoA の細胞内濃度に応答し、低濃度下で活性型 (DNA 結合型) に、高濃度下で不活性型 (DNA 非結合型) になること、2. ピルビン酸やアセチル CoA 周辺の炭素源代謝経路を包括的に制御し、外部方向の代謝経路を抑制化、内部方向の代謝経路を活性化すること、が示唆された (図1)。要約すると、炭素源の豊富な存在下では増殖を有利にするための炭素源排出経路を作動させ、炭素源の不足時には同化代謝へと、代謝フローを転換させるための、新規な転写因子およびその制御ネットワークが明らかとなったと考えている。この知見は、微生物を用いた発酵技術全般に貢献するものである。



## 病原性細菌の有する接触性増殖阻害蛋白質の反応制御分子機構

富田 耕造

**【目的】**接触依存性増殖阻害（Contact-dependent growth inhibition; CDI）は多くの病原性細菌に広く見いだされる現象で、病原性細菌の優先的かつ爆発的な増殖に関与している。CDIは、隣接する他の非同質遺伝子系統の細菌内へ接触依存性増殖阻害蛋白質（CdiA）を挿入し、それによって隣接する細菌の増殖を阻害する。これは、特定の病原性細菌のみが優先的に増殖する細菌の「生存競争」システムのひとつであると考えられている。病原性細菌に見出されるCDIは病原性細菌が他の細菌の増殖を抑え、自身のみ増殖し、結果、病原性細菌による感染症が急速に蔓延することにも関与していることが示唆されている。食中毒を引き起こす腸管出血性大腸菌 EC869 株、NC101 株、EC3006 株や尿路感染症を引き起こす尿路病原性大腸菌 EC536 株などにおいて、CdiA は隣接する非同質遺伝子系統の大腸菌へ挿入された後、特定の tRNA を切断し、翻訳阻害を引き起こす。結果、病原性大腸菌のみが爆発的に増殖する。本研究では、これらの CdiA が特定の tRNA を認識し、切断する分子機構を明らかにする。CdiA の詳細な作用機序の分子機構の解明は、それらの蛋白質活性、あるいは活性化のプロセスを阻害することにより、病原性細菌の爆発的増殖、感染症の蔓延を予防する新たなタイプの薬剤開発への技術的基盤を提供し、結果、疾病の予防や治療、健康の増進に寄与することが大きく期待される。尿路感染症を引き起こす大腸菌 EC536 株の CdiA-CT は、tRNA のアンチコドンを含むループ領域を切断する活性を持ち、tRNA を不活性化することにより蛋白質合成を阻害し、標的細菌の増殖を抑制する作用があることが知られている。これまで大腸菌 EC536 株 CdiA-CT の tRNA 切断活性にはシステイン生合成に関わる CysK 蛋白質を必要とすること、CdiA-CT が CysK と複合体（CysK:CdiA-CT 複合体）を形成することが報告されていた。しかし、大腸菌 EC536 株の CdiA-CT の基質となる tRNA の認識機構や CysK による CdiA-CT の tRNA 切断活性化の分子機構については明らかになっていなかった。

**【方法】**本研究では大腸菌 EC536 株由来 CdiA-CT に注目し、CysK:CdiA-CT 複合体と tRNA との三者複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行い、その 3 次元構造の決定をおこない、また、構造を基にした機能解析をも行った。

**【結果・考察】**大腸菌 EC536 株由来の CdiA-CT に注目し、CysK:CdiA-CT:tRNA の三者複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析を行い、その 3 次元構造の決定に成功した（図 1）。

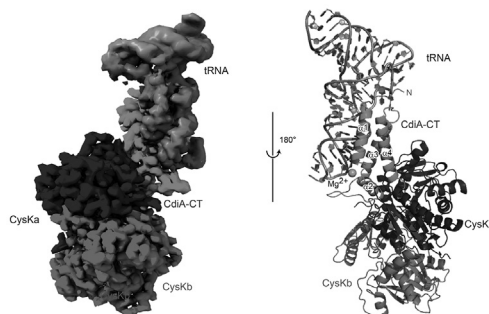


図 1 CysK:CdiA-CT:tRNA 三者複合体構造

構造解析から以下の点が明らかになった。まず、tRNA 分子は CysK とは全く相互作用せず、CdiA-CT とのみ相互作用する。CdiA-CT は CysK と結合することによって構造変化を起こし、その構造が安定化し、CdiA-CT 内に tRNA を切断する適切な活性触媒ポケットが形成される。また、CdiA-CT は tRNA の下半分領域（D システムアーム、アンチコドンシステムアーム）のヘリックス構造を認識し、ヘリックスの溝をつかむように結合する。結果、tRNA のアンチコドンループ領域が CdiA-CT の触媒ポケットに位置し、tRNA のアンチコドンループ（32-33 の間）が切断される。以上より、細菌の生存競争である CDI において、CysK が CdiA-CT を活性化して tRNA を切断する「足場（platform）」として機能していることが明らかになった（図 2）。

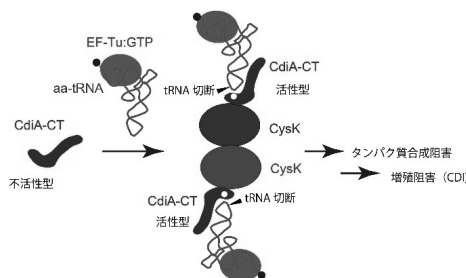


図 2 CysK が CdiA 活性化の足場として機能

# 小分子抗体を利用したオーキシン依存的タンパク質分解システムの開発

西村 浩平

【目的】 標的タンパク質の分解を活用したタンパク質解析は、遺伝子機能を解明する上で非常に有効な手法である。オーキシン誘導性デグロン (AID) システムは、標的タンパク質のノックダウン法として広く利用されており、オーキシンの添加により、AID タグを付加したタンパク質を迅速に分解することが可能である。しかし、従来のAIDシステムでは、標的タンパク質へのタグ付加が必要である点

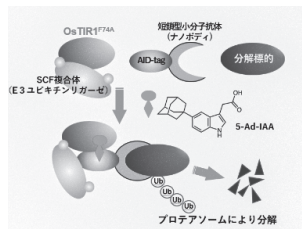


図1 AlissAID法によるタンパク質分解の模式図

が大きな課題となっていた。本研究では単鎖型小分子抗体を用いて、抗体が認識するタンパク質を細胞内で分解する新しいAID法 (AlissAID法) の構築を目指した (図1)。

【方法】 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, W303-1a株), ニワトリ (*Gallus gallus*, DT40 cells), ヒト (*Homo sapiens*, 293T cells, HeLa cells, T24 cells), マウス (*Mus musculus*, E14tg2a embryonic stem cells, ICR系統のメスマウスから採取したマウス初期胚) を実験に使用した。本研究では、標的タンパク質の分解をイムノブロットやルシフェラーゼアッセイ, 蛍光観察により解析した。標的タンパク質分解後の表現型をスポッティングアッセイ (出芽酵母), FACsを用いた細胞周期解析, mRNA-seqによる転写プロファイル解析により解析した。本研究で創出された光活性化型 5-Ad-IAA (caged-5-Ad-IAA) の活性化には 120mJ/cm<sup>2</sup> の紫外照射 (365nm) を用いた。

## 【結果・考察】

細胞内で用いられる汎用型蛍光タンパク質である GFP や mCherry を標的とする小分子抗体を用い、これらの融合タンパク質を分解する AlissAID 法を構築した。GFP 融合タンパク質の分解では細胞質と核に存在する Mcm4, 核に局在する Neo1 と出芽酵母細胞の様々な場所に局在するタンパク質を分解できることを明かした (図2)。

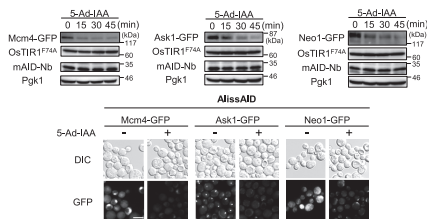


図2 AlissAID法による GFP 融合タンパク質の分解 (出芽酵母)

次に、AlissAID法が動物の培養細胞においても効率的にタンパク質分解を誘導できるかを検証した。その結果、ニワトリ, ヒト, マウスなど様々な動物由来の培養細胞においても、出芽酵母と同様に GFP 融合タンパク質の分解が可能であることが明らかとなった。さらに、マウスの初期胚を用いた実験でも、AlissAID法による GFP 融合タンパク質の分解が確認された (図3)。

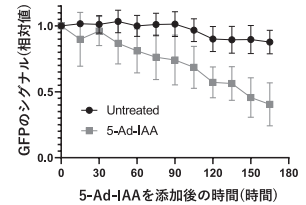


図3 マウス初期胚における H2B-GFP の分解

AlissAID法は、理論的には内在性タンパク質も標的とすることが可能である。そのため、原がん遺伝子の一つである HRas を標的とする小分子抗体を用い、内在性の HRas タンパク質の分解を試みた。その結果、AlissAID法により HRas の分解が誘導され、HRas 依存的にがん化が引き起こされている T24 細胞の増殖が抑制され (図4), Ras タンパク質の減少に伴う転写プロファイルの変化が確認された。

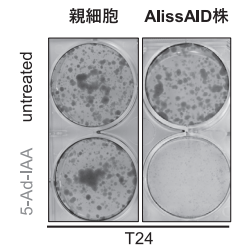


図4 T24細胞における HRas 分解後の増殖停止

また、照射によって活性化可能な caged-5-Ad-IAA を創出し、照射による分解誘導が可能となった (図5)。

本研究で開発した AlissAID 法は、タグを付加すること

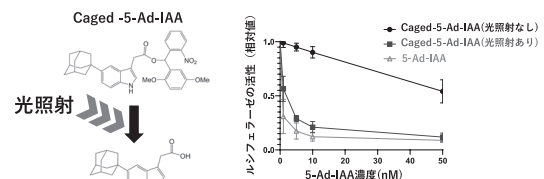


図5 照射依存的なタンパク質分解の検証

なく内在性タンパク質を効率的に分解できる画期的な手法であり、出芽酵母から哺乳類細胞・マウス胚に至るまで広範な真核生物種に適用することが可能である。さらに、光制御型分解誘導剤の創出により、タンパク質の機能解析における時空間的な制御が可能となり、今後の基礎研究および応用研究への貢献が期待される。

## 酵母の GPI リモデリングが制御するタンパク質選別輸送機構の解明

船 戸 耕 一

【目的】 グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) によるタンパク質の修飾は真核生物で広く保存された翻訳後修飾の1つで、GPIアンカー型タンパク質 (GPI-AP) の脂質ドメインへの集積や機能に重要な役割を担う。小胞体内腔で GPI がタンパク質に修飾されたのち、GPI の脂質部分に変化することから、脂質の構造変化 (リモデリング) が GPI-AP の選別輸送や局在を制御していると長い間推察されてきたが、その実体は不明であった。我々は最近、GPI の脂質部分をセラミドへ変換させる酵母のリモデリング酵素 Cwh43 が GPI-AP の小胞体からの選別輸送の品質管理に関与していることを発見した (図1)。また、Cwh43 欠損株と同様の表現型を示す遺伝子 *PBR1/YNL181* を新たに見出し、その遺伝子が GPI-AP の小胞体からの輸送に関与することを明らかにした。本研究では、*YNL181W/PBR1* がコードするタンパク質 Pbr1 と Cwh43 との機能的関係性、細胞内での局在性と膜結合性、GPI リモデリング過程における役割を明らかにすることを目的とした。

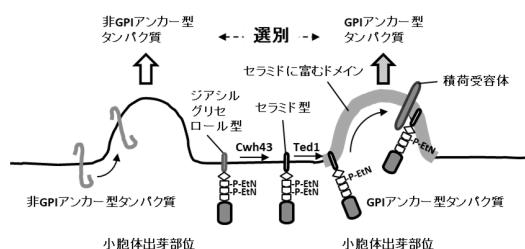


図1 GPIアンカー型タンパク質の選別における GPI リモデリングの役割

【方法】 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY strains (derived from S288C) の *PBR1/YNL181W* に変異が導入された温度感受性変異株 *pbr1-ts* (大矢 禎一氏より譲渡)、Cwh43 を欠く欠損株 *cwh43Δ*、それらの二重変異株 *cwh43Δ pbr1-ts*、さらに Cwh43 の上流で機能し、GPI の糖鎖鎖エタノールアミンリン酸 (EtNP) の付加に関与する遺伝子との二重変異株 *gpi7Δ pbr1-ts* 等を交配と四分子分離により作製し、GPI-AP のマーカータンパク質である 1,3-β-グルカノシルトランスフェラーゼ Gas1 の輸送と共役した糖鎖修飾や高温での生育を評価した。また、C 末端に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合させた Pbr1-GFP を内在性のプロモーター制御下で発現する細胞を作製し、細胞内での局在性や膜結合性を評価した。

さらに、変異株を用いて GPI リモデリング過程における Pbr1 の役割を解析した。

【結果・考察】 *PBR1* の酵母温度感受性変異株 *pbr1-ts* は Gas1 の未成熟体を蓄積させたことから、この遺伝子は GPI-AP の小胞体からの輸送に関与することが示された。次に、Cwh43 欠損株と同様に、*pbr1-ts* における GPI-AP の輸送の遅延は 2 つ目のマンノースの EtNP の付加に必要な Gpi7 を欠失させることによってレスキューされたことから、Cwh43 と類似の機能的役割を担っている可能性が示唆された。次にこれを受けて、Pbr1 と Cwh43 との機能的順序を明らかにする目的で、それらの二重変異株を作製し、遺伝学的相互作用を調べた。その結果、*pbr1-ts* の高温での生育障害は Cwh43 の欠失により部分的にレスキューされた。以上の結果から、Pbr1 が Cwh43 の下流で、GPI の脂質リモデリングに関与しているモデルを提唱した (図2)。

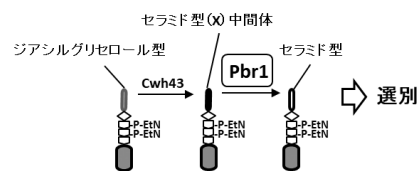


図2 Cwh43 の下流で機能する Pbr1

さらに、Pbr1-GFP を発現する細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、Pbr1-GFP は小胞体及び小胞体-ミトコンドリア間の接触部位に局在することが分かった。また、単離した生体膜を用いた生化学的解析と糖鎖付加配列導入法による膜内トポロジー解析により、Pbr1 は膜貫通ドメインを1つ有し、N 末端が小胞体の内腔側、C 末端が細胞質側になる I 型膜タンパク質であることを見出した。この結果は、N 末から膜貫通ドメインまでのアミノ酸領域が Pbr1 の機能に重要であることを示唆している。

最後に、Pbr1 が GPI-AP の脂質のリモデリング反応に関与しているかどうか調べるために、*pbr1-ts* 変異株の GPI-AP の脂質部分を放射能でラベルし、単離して薄層クロマトグラフィーで解析したところ、野生株では殆ど見られない脂質 (X) 中間体が蓄積することが明らかになった。これらの結果は、Pbr1 が GPI の脂質のリモデリングに関与しているモデルを支持しており、GPI リモデリングを介した GPI-AP の選別輸送機構の全容を解明するための重要な手掛かりになると期待される。

## ミトコンドリア分裂の分子機序と生理機能の解明

福田 智行

**【目的】** ミトコンドリアはエネルギー生産に加え、代謝や情報伝達など多様な機能を担う。ミトコンドリアの形態は、分裂と融合によりダイナミックに変動する。こうした形態の変動は、細胞の機能や活動に重要な役割を果たすと考えられている。既知の分裂因子 Dnm1 は分裂位置にくびれを形成する。最終的にくびれでミトコンドリア膜が切断される機構は、長年不明であった。我々は、分裂酵母のマイトファジー（ミトコンドリアのオートファジー分解）の際にミトコンドリア膜の切断を担う Atg44 を発見した。Atg44 が「くびれでミトコンドリア膜を切断する因子」であると予想し、分裂酵母 Atg44 の解析を軸に、ミトコンドリア分裂の分子機序の解明と、ミトコンドリア形態が果たす生理機能の探索とを行った。

**【方法】** 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*, 972 株) でミトコンドリア分裂を高頻度に誘導する条件を検討し、グルコース飢餓を見出した。この条件で、Dnm1 と Atg44 の欠損株のミトコンドリア形態を観察した。また、Dnm1 と Atg44 の細胞内での挙動を解析するため、各々に GFP を融合したタンパク質を発現する株を作製し、顕微鏡観察を行った。さらに、機能解析を目的に、Atg44 の過剰発現株とアミノ酸置換体を作製し、ミトコンドリア形態、マイトファジー活性、タンパク質発現量を調べた。加えて、ミトコンドリア形態が担う細胞機能を探索するため、形態異常変異株を用いて、富栄養および飢餓条件下における生存能を指標とした表現型解析を行った。

**【結果・考察】** 分裂酵母をグルコース飢餓培地で培養するとミトコンドリア分裂が高頻度に生じ、粒状のミトコンドリアが多数観察される。同条件下の Dnm1 欠損株では分裂が生じず、ミトコンドリアはケーブル状であった。一方、Atg44 欠損株ではくびれが見られるものの、ミトコンドリアが完全に切り離されない様子が観察された。こうしたミトコンドリアでは、くびれ箇所に Dnm1 が蓄積していた。したがって、Atg44 は Dnm1 が形成したくびれで膜を切断し、ミトコンドリアの分裂を助けることがわかった (図 1)。また、Atg44 を過剰発現すると、ミトコンドリアは著しく断片化したため、Atg44 はミトコンドリア分裂を促進する機能を有することが支持された。

Atg44 はミトコンドリアの膜間腔（外膜と内膜の間）に存在することを確認した。富栄養条件でも、マイトファジーが誘導される窒素源飢餓条件でも、Atg44 は同程度に発現していた。また、ミトコンドリア全体に分布

しており、特定の領域に集積する様子は認められなかった。したがって、Atg44 はミトコンドリア膜全体に作用するか、あるいは局所的に集積して作用するとしても、そうした作用は瞬間的であると考えられた。

Atg44 の立体構造を基に変異体を作成し、マイトファジー活性を評価した。その結果、機能が欠損する変異体は機能の低下に相関して発現量が低下していた。したがって、Atg44 は膜に作用することで安定的に存在できるのかもしれない。換言すると、ミトコンドリア膜は Atg44 から常に一定の作用を受けている可能性が示唆された。

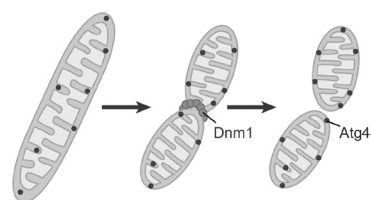


図 1 Dnm1 と Atg44 によるミトコンドリアの分裂機構

ミトコンドリア形態異常株の表現型解析から、分裂欠損は栄養増殖に影響しないものの、融合欠損あるいは Atg44 の過剰発現により過剰に分裂すると増殖が遅延した。一方、定常期到達後も培養を継続して経時寿命を評価すると、Dnm1 や Atg44 の欠損株は野生株に比べて寿命が延伸していた (図 2)。以上から、ミトコンドリア分裂は増殖を抑制し、老化を促進することが示唆された。

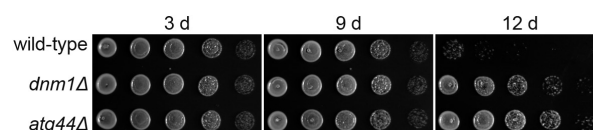


図 2 富栄養液体培地で定常期到達後も数日間培養を続け、各時点での生育能をスポットアッセイで評価した

本研究から、Atg44 はミトコンドリア内部から膜にはたらくことで潜在的に切断されやすい膜状態を形成・維持しており、特に、外側からの作用により形成される狭窄領域での膜切断を促進することが示唆された。ミトコンドリア分裂の際には Dnm1 の形成するリングにより、マイトファジーの際には隔離膜の作用により、それぞれ狭窄部位が形成されると考えられる。また、ミトコンドリア分裂が細胞の増殖や老化に関与することを見出したため、今後、その分子機序の解明と応用が期待される。

## 酵母減数分裂期に生じる新規のゲノム変化

篠原 彰

**【目的】** 生物の種や個体の多様性はゲノムの変化から生まれる。ガンを引き起こすような体細胞突然変異に関してはゲノム解析の発展により急速にその理解が進んでいる。一方、親から子へ世代を越えたゲノムの多様性、新規のゲノム変化がどのような仕組みで生まれてきたのかについてはまだ十分に理解されていない。親に子に生じる真核生物のゲノム変化、突然変異は *de novo* mutation (DNM) と呼ばれている。本申請研究は出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いて、減数分裂期に生じる DNM の分子メカニズムを解明することを目的とする。

**【方法】** 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (SK1 株) の減数分裂期特異的なゲノム突然変異 (meiosis-specific DNM; meiDNM) を解析するために、カナバニン耐性を指標に *CAN1* 遺伝子の変異株を単離した酵母 1 細胞から体細胞分裂で増やした細胞集団 ( $1 \times 10^7$ ) を孢子形成培地で培養することで減数分裂を導入し、生じた孢子 (4 分子) をカナバニンを含む固体培地で培養し、カナバニン耐性のコロニーを単離した。1 細胞由来のすべてのカナバニン耐性のコロニーすべての突然変異を DNA 塩基配列決定で同定した。1 つの細胞由来で、同じ突然変異を持つ場合は体細胞突然変異として、細胞集団で 1 つしかない変異を減数分裂期特異的なゲノム突然変異 (meiosis-specific DNM; meiDNM) とし、その突然変異スペクトラムを解析した。

**【結果・考察】** 15 の独立した出芽酵母の培養から生じたカナバニン耐性のコロニーの *CAN1* 遺伝子座近傍の突然変異の DNA 塩基配列を決定し、体細胞突然変異を除く 333 のユニークな減数分裂特異的な突然変異 (meiosis-specific DNM; meiDNM) を同定した (図 1)。すでに体細胞の突然変異スペクトラムの大規模解析が Lang & Murray (Genetics, 2008) に報告されているが、点突然変異と 1 塩基欠失がほとんどであり、それ以外の構造変化変異は稀であり、減数分裂期では構造変化変異が体細胞分裂期に比べ起きやすいことが推測できた。

さらにその変異スペクトラムを解析すると (図 1 右)、69% が点突然変異であり、C から A (G から T) が 69/229 (30%) と多いのが特徴的である。酵母さらに酵母のレトロトランスポゾンにあたる Ty 因子 (Ty1-6) が遺伝子の読み取り枠や 5' 上流の転写領域に挿入することで、*CAN1* 遺伝子を不活化している場合も数多く見られた (3.9%)。Ty 因子は体細胞分裂期では転移しないように厳密に制御されていることが知られていることか

ら、減数分裂期特異的にその制御が外れるか、Ty 因子自身が自身を次世代に伝えるために積極的に転移するような仕組みを減数分裂期で発現する可能性も考えられる。また、*CAN1* 遺伝子自体あるいは、その部分を含む、染色体の長い領域が欠失する構造変化も比較的多く (7.5%) 生じることが分かった。

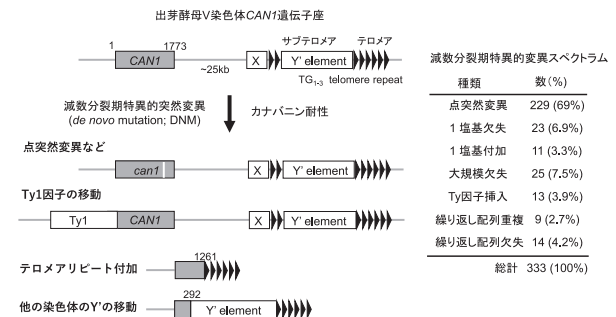


図 1 出芽酵母 *CAN1* 遺伝子に生じる減数分裂期特異的な突然変異の構造 (左) とその変異スペクトラム (右)

このことは減数分裂期ではゲノムの構造変化が生じやすいと考えられ、酵母を含めた真核生物のゲノムの進化を考える上で興味深い。この大規模変化を分類すると、*CAN1* 遺伝子の途中でテロメアが付加する構造変化に加え、酵母のサブテロメア領域に存在する Y' 因子が *CAN1* 遺伝子に連結している構造変化も見出している。サブテロメア領域が動くという報告はこれまでなく、新規のゲノム再編反応であると言え、染色体末端の構造であるサブテロメア領域の形成過程に新しい知見と言える。今後はサブテロメア領域の移動の仕組みを明らかにするために、サブテロメア領域 Y' 因子にマーカー遺伝子を挿入する構築を作成し、数多くの Y' 因子の移動した構造を解析することで、減数分裂期特異的な Y' 因子の移動の分子メカニズムの解明を目指す。

近年、家系を用いたゲノムの大規模解析により、ヒトでの生殖細胞特異的なゲノム突然変異 (*de novo* mutation; DNM) が同定されている。これらの解析は生殖細胞 (幹細胞を含む) で起きる体細胞突然変異と減数分裂期で起きる変異の総和を見る解析であり、厳密な意味で減数分裂期特異的な変異を見ているわけではない。そのために酵母を用いた meiDNM の解析は、その分子メカニズムの解明にとどまらず、真核生物全般のゲノム進化を理解する上で貴重な知見を提供すると考えられる。

## 新規病原性レンサ球菌の細胞壁構成バリエーションと環境応答

小倉 康平

**【目的】** *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) は、人獣共通感染症の原因菌である *S. dysgalactiae* グループの中でもヒトに対する病原性が特に高いレンサ球菌であり、人喰いバクテリアとして知られる *Streptococcus pyogenes* とはゲノムの Average Nucleotide Identity が約 80% と近い。SDSE による侵襲性感染症例数は、新型コロナウイルス感染症が蔓延した近年まで増加傾向であり、一時期はレンサ球菌の中で最多となったことが報告されている。この症例数増加の背景には、ヒト組織への定着・常在ならびにヒト免疫機構からの回避機構が考えられるが、*S. pyogenes* の免疫回避に重要な粘性構造（ヒアルロン酸カプセル）を形成する遺伝子群を SDSE は持たない。その一方で、他のレンサ球菌から水平伝播したと推測される種々の細胞壁アンカータンパク質（Cell wall anchoring protein, CWAP）遺伝子を有している。本研究では、CWAP を含めた SDSE の細胞外構造に着目し、本菌固有の宿主定着・免疫回避の機構の解明を目指した。

**【方法】** 国内で単離された SDSE 株を Multilocus sequence typing により分類し、分離頻度の高いタイプ（Type-A）を主な研究対象とした。ドラフトゲノムは Illumina 社 MiSeq により取得したリードから取得した。接着性は、ポリスチレンプレートに接着した菌体をクリスタルバイオレットで染色することで評価した。

**【結果・考察】** 宿主体内成分に応答した細胞外構造形成を解析するため、培地成分の違いによる SDSE の表面構造を走査型電子顕微鏡で観察した。イオンコーティング剤（ナノスツ溶液）を用いた非脱水条件でサンプルを調製した結果、RPMI-1640（高グルコース）含有培地で生育させた SDSE では、結晶物質が付着した細胞外構造が観察された（図 1 矢印部分）。この結晶は、SDSE が細胞外に分泌した成分が結晶化したものと予想され、その成分の解明が今後の課題とされた。

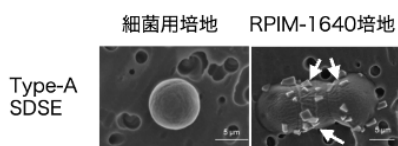


図 1 SDSE の細胞外構造変化

劇症型レンサ球菌感染症患者の血液由来の SDSE のゲ

ノムについての解析を進め、国内流行型 6 株についてはその完全ゲノムを決定した。機械学習モデルを用いて SDSE がもつアンカータンパク質遺伝子を検出したところ、本研究計画時に検出していた 8 種に加え、多くの CWAP が検出され、その保有の有無は判別型の間で多様であった。新たに検出された CWAP の多さから、SDSE の CWAP を直接的に解析することが困難であることが示された。

ドラフトゲノム解析済みの SDSE 保有株について、各種条件での接着性を解析し、その差異と保有遺伝子との相関に着目することとした。SDSE は *S. pyogenes* と同様に細胞表層局在 M タンパク質の遺伝子型（*emm* 型）により判別されるが、細菌用培地中ではいずれの遺伝子型の SDSE も接着能を有していたが、ヒト血清成分を含有した培地中では、国内において最流行である *emm* 型（Type-A）のみ SDSE 株は接着能を保持していた。またその Type-A 株のうち、ある 2 株は ANI が 99.8% 以上と近類であるにも関わらず、一方の接着性が特に高かった。この結果から、接着性が異なる *emm* 型 2 株の比較により接着性に関わる細胞外成因子が明らかにできる可能性が示された。

上記でみいだされた 2 株についてトランスクリプトーム解析を実施した。両株とも血清成分含有条件下での線毛形成関連オペロンの発現が有意に上昇していた。また上記培養条件における菌体含有タンパク質についてプロテオーム解析を実施した結果、血清成分含有培地中では細菌にアルブミンやイムノグロブリンといった血清由来成分が大量に付着していることが示された。さらに 2 株間の遺伝子発現の差異を解析した結果、CWAP やソルターゼを含む細胞外構造関連オペロンを高い接着性をもつ株のみが発現していた（図 2）。本オペロンが国内最流行型である Type-A SDSE の宿主接着性に関与することが予想された。現在、同オペロン内遺伝子の欠損株を作製中であり、今後その解析を進める予定である。

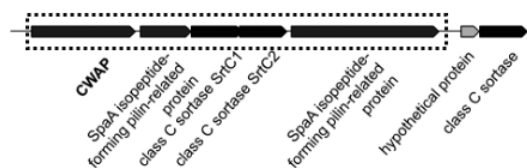


図 2 Type-A の 2 株間で遺伝子発現が異なるオペロン（図中点線部分）

## 病原性ビブリオ属細菌が保有する CRISPR-associated transposon の機能構造解析

沼田 倫 征

【目的】多くのビブリオ属細菌は、CRISPR-Cas系とトランスポジションタンパク質が共同してDNAの転移を誘導するしくみを保有している。この『動く遺伝子』はCRISPR-associated transposon (CAST)と呼ばれ、CAST内にCRISPR-Cas系およびトランスポジションタンパク質の遺伝子がコードされている。さらに、CASTには熱耐性溶血毒素やIII型分泌装置などの遺伝子が含まれており、病原性に関与することが示唆される。腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633では、I-F3型CRISPR-Casエフェクター (Cas6, Cas7, Cas8, crRNA) から構成された複合体: Cascade)とトランスポジションタンパク質 (TniQ, TnsA, TnsB, TnsC) がCASTの転移に関わる。本研究では、生化学的および構造生物学的な手法により、CASTの転移機構の解明を目指した。

【方法】CASTの転移に関与するCas6, Cas7, Cas8, crRNA, TniQ, TnsA, TnsB, TnsCの遺伝子を発現ベクター pCDFDuet-1およびpCOLADuet-1にクローニングし、大腸菌株BL21 (DE3)内におけるCASTの転移活性を定量PCRにより評価する系を確立した。TniQと結合したCascadeを大腸菌内で産生・再構成し、各種クロマトグラフィーにより精製した。精製したTniQ-Cascadeと標的DNAとの複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により決定した。標的DNAと結合したTniQ-Cascadeの立体構造に基づき変異体解析を実施した。

【結果・考察】クライオ電子顕微鏡単粒子解析の結果、TniQ-CascadeはcrRNAのガイド配列と相同なDNA配列 (プロトスペーサー) に結合し、定量PCRの結果と併せ、-2位にシチジンを持つプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) を選好して、CASTの挿入部位を決定することが分かった (図1)。また、TniQ-Cascadeは、PAMの-1位としてC, A, Tを優先的に認識していた。

PAMの認識にはCas8が関与していたため、PAMの-2位を認識する残基に変異を導入した。その結果、この変異体は、野生型では認識できないPAM配列をもつ二本鎖DNAに対してCASTを挿入する活性を獲得していた。つまり、PAMの特異性が低下し、プロトスペーサーさえ存在すれば、DNAの転移を誘導できる変異体を取得することに成功した。一方、PAMの-1位を認識する残基に変異を導入した結果、-1位のPAM特異性が

上昇することが明らかになった。以上の結果は、TniQ-Cascadeにおいて、PAM認識部位を改変することにより、PAM特異性を容易に操作できることを示唆するものである。この分子特性を利用することにより、配列制限の低いゲノム編集が可能となる。今後、CAST転移の分子機構を詳細に解明することにより、本システムを利用した新たなゲノム編集技術の開発が期待できる。

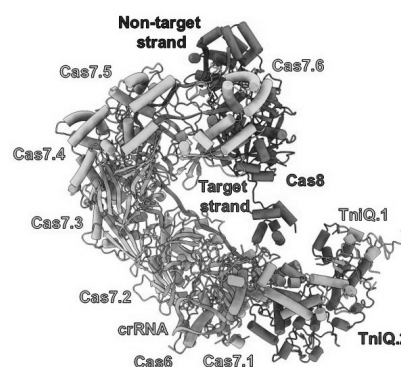


図1 *V. parahaemolyticus* 由来 TniQ-Cascade の立体構造

一般的なCRISPR-Cas系は原核生物が保有する獲得免疫機構として機能し、ウイルスなどの可動遺伝因子を切断して、その増殖と伝播を抑制する。したがって、獲得免疫に関与するCRISPR-Cas系 (獲得免疫型) は、自己と非自己を厳密に識別する必要があり、PAM特異性が極めて高い。一方、本研究で対象としたCASTは、DNA間さらには異なる生物種のゲノム間をまたいで移動する『動く遺伝子』である。そのため、CASTの転移に関与するCRISPR-Cas系 (CAST型) においては、PAM配列に対する特異性が低いことが、CASTの転移に有利であると考えられる。本研究における定量PCR解析からも、CAST型エフェクターのPAM特異性が、獲得免疫型エフェクターと比較して低いことが明らかとなった。CAST内には病原遺伝子に加え、制限修飾系をはじめとした各種の抗ウイルス活性に関与する因子の遺伝子が含まれている。したがって、ビブリオ属細菌は、細胞間でのCASTのやり取りを介して、ウイルス感染に対する耐性を獲得するとともに、速やかな環境変化に順応する能力を獲得するよう進化してきたと考えられる。

## 出芽酵母サイクリンの機能を再考する

田中 誠司

【目的】サイクリンは、真核生物の細胞周期の進行を制御するマスターキナーゼであるCDK（cyclin-dependent kinase）の制御サブユニットであり、異なるサイクリンが秩序正しく発現・消失することで、細胞周期が秩序正しく進行する。一方、異なるサイクリン-CDK複合体であっても機能重複があり、そのことが外的・内的攪乱に対する細胞周期の耐性を高めている。今では広く教科書に書かれているこのような概念は、1990年ごろの出芽酵母を用いた先駆的な研究により示された。

出芽酵母では、9種類のサイクリン（Cln1-3, Clb1-6）が単一のkinaseサブユニットであるCdc28と個別に複合体を形成する。このうちClb5,6は、過去の全ゲノム重複で生じたペアで、いずれもDNA複製を開始させる「S期サイクリン」であるが、その分解パターンが異なる（図1）。Clb5がM期中期まで存在するのに対し、Clb6はS期開始直後に分解され消失する。本研究ではこのClb6の「S期サイクリンなのに、S期を全うせず分解される」という奇妙な性質を理解することを目指した。

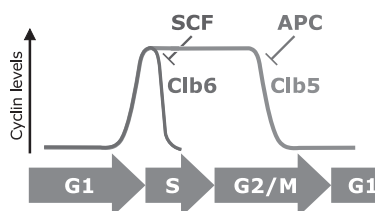


図1 S期サイクリンClb6は、S期中途中で分解を受け、消失する。

【方法】解析には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303株及びその由来株を用いた。同調培養には、 $\alpha$ ファクターを用いた。Clb6発現にはガラクトース誘導性プロモーター *GALI*pを用いた。細胞のDNA含量は70%エタノール固定後、ヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメーターを用いて計測した。核小体は、Net1-GFPを用いて可視化した。異常細胞は、セルソーターで回収後にDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて喪失/獲得ゲノム領域を同定した。

【結果・考察】Clb6はS期開始後すぐに分解され、消失する（図1）ため、細胞周期を通じてClb6が存在する状況を作り出すために、構成的に高発現（以下単に「発現」と記す）させた。その結果、Clb6を発現させると、

① Clb6発現細胞は強い致死性を示し、この際、② Clb6発現後最初のM期通過後に異常なDNA量の細胞が出現した。この際、決まった位置にピークが出現したことより、特定の染色体/領域の分配が異常になっていると考えた。解析の結果、③ rRNAをコードするrDNAのリピートが正しく分配されず、結果、rDNAが局在する核小体が正常に分配されないことがわかった。また、④ これらの表現型を示すためには、発現するClb6はCdkサブユニットと相互作用できることが必要であることも見出した。これまでに、核小体の正常な分配には、M期後期から終期にかけて核小体が凝縮することが必要であること、凝縮を誘導するためには、rDNA領域からrRNA前駆体を特異的に転写するRNA polymerase Iの不活化/活性低下が必要であることが報告されている。Clb6発現後の核小体を観察したところ、M期後期から終期にかけて凝縮しなかった（図2）。また、RNA polymerase I阻害薬を培地に加えると、Clb6発現で誘導される致死性が緩和されることもわかった。以上の結果は、Clb6-Cdk活性がM期後期から終期にかけて、細胞内に存在してはいけないことを示す。細胞周期の時期特異的にタンパク質を分解するためのポリユビキチン化E3酵素は、S期開始あたりから機能するSCF、M期中期以降に機能するAPCしかない。おそらくClb6をAPC依存的に分解したのでは正しい核小体凝縮が保証できず、SCF依存的に分解誘導せざるを得ないため、結果、Clb6はS期サイクリンなのにS期を全うせず分解されるという性質を示すに至ったと考えられる。このことは、ではなぜ細胞はClb6を保持し続けているのかという新たな疑問を生む。今後はこの点について、他のサイクリンとの関係性を軸に理解を進めたい。

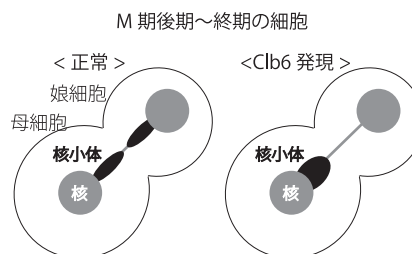


図2 Clb6-Cdkは核小体凝縮を抑制することでその分配を阻害する。



## 単細胞接合藻類の生殖様式進化の遺伝的背景

関本 弘之

【目的】微細藻類ヒメミカヅキモには、1形態種内に、自殖種と他殖種が含まれる。これまで、遺伝的に異なる+、-型細胞の間で接合子を形成するヘテロタリック株（ヘテロ株、他殖種）から、-型細胞ゲノムのみが存在し、性表現を決定する *CpMinus1* 遺伝子を発見し、① *CpMinus1* の有無によりヘテロ株の性は決定されること、② *CpMinus1* の発現レベルによっては、性決定の方向付けが曖昧になり、自殖化を起こしうること、を示唆した。一方、ホモタリック株（ホモ株、自殖種）の1系統株（naga37s-1株）からも、*CpMinus1* オルソログ遺伝子（*CpMinus1N*）を見出した。この遺伝子の発現を恒常的に高めた形質転換体においては、自殖能力が低下し、-型ヘテロ株との他殖傾向が強まった。遺伝子発現抑制株においては、+型ヘテロ株との他殖傾向が強まった。以上より、*CpMinus1* 遺伝子は、ヘテロ株における接合型決定のみならず、ヘテロ、ホモといった生殖様式の違いにも関わることを示唆された。

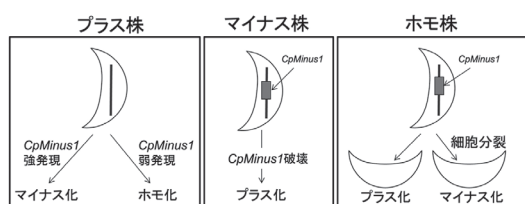


図1 *CpMinus1* 遺伝子の発現と性表現

そこで本研究では、ホモ株の *CpMinus1N* 遺伝子破壊株の作出を行い、得られた株の表現型を解析し、*CpMinus1N* 遺伝子が生殖様式進化にどのような役割を担っているのかを明らかにすることとした。また、一方の生殖様式をもつ集団から、自殖種が（あるいは他殖種が）どのように生じてきたのかを明らかにし、生殖様式進化の謎に迫ることを最終目的とした。

【方法】本研究では、ヒメミカヅキモ (*Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex) のホモ株の一つである naga37s-1 株（国立環境研究所にて、NIES-4550として登録）を用いた。まず、ヘテロ株（NIES-67, 68株）で用いてきた遺伝子破壊用コンストラクトから、ホモ株に適したコンストラクトを再構築した。エレクトロポレーションによりホモ株への形質転換を行い、得られた形質転換株の解析を行った。また、NIES-67, 68, naga37s-1

株に加えて、新たに15のヘテロ株、5のホモ株のゲノム解読を進め、詳細に比較解析した。

【結果・考察】ホモ株への形質転換を繰り返したが、薬剤耐性を示す形質転換体のほとんどは、*CpMinus1N* 遺伝子に変異が導入されていなかった。その中で、1-4と名付けられた株のみ、*CpMinus1N* 遺伝子のゲノムからの増幅が起こらず、当該遺伝子部分が大規模に欠失、あるいは染色体構造が崩れてレアレンジメントされていると推定された。この株は、自家接合能力を失い、系統樹上で近縁な位置を占めるヘテロ株のうち、交配群II Bの-株（slo26-4株）と弱い生殖反応（接合子は形成せず、単独でプロトプラスト放出）を示した。つまり、ホモ株における自殖能力は *CpMinus1N* 遺伝子に依存しており、この遺伝子に変異して機能を失うことで、ヘテロ株における+型性表現のみを示すようになることが強く示唆された。

さらに、多数のヒメミカヅキモ系統株のゲノム解読を進めた結果、ヘテロ株の-株には必ず *CpMinus1* オルソログ遺伝子が存在し+株には存在しないこと、ホモ株にはすべて *CpMinus1* オルソログ遺伝子が存在することが明らかになった（図2）。また、ホモ株である naga37s-1 は、ヘテロ株交配群II AおよびII Bと近縁な位置に存在していたが、この株のゲノムは両者由来と思われる配列をともに持っていることが明らかになった。

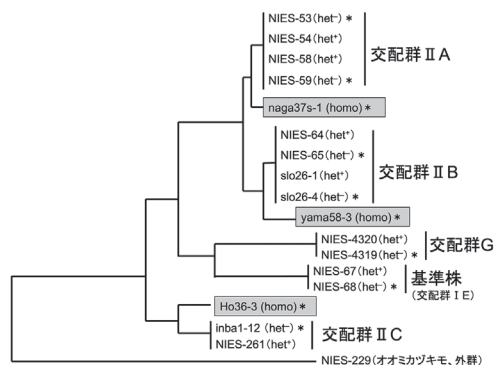


図2 ヒメミカヅキモの種内系統関係（\*は *CpMinus1* を持つ株、18S RNAの group I intron を用いて解析）

II A と II B は生殖隔離が不完全であることが知られており、おそらく両者間のハイブリッド接合子から naga37s-1 株が生じたと考えられた。つまり、ヘテロ株からホモ株へと進化したことが示唆された。

# DnaK シャペロンシステムの機能的ヒエラルキーを規定する分子基盤の解明

杉本 真也

【目的】 Hsp70 は、J-domain protein (JDP) と共同で基質タンパク質のフォールディングなどを介添える分子シャペロンである。大腸菌では、DnaK を含む3つの Hsp70 と6つの JDP が同定されている。細胞質で主要な機能を担う DnaK は、細胞質に局在する DnaJ と CbpA、および内膜に局在する DjlA という3つの JDP と協調的に機能する。また、DnaK の機能にはヌクレオチド交換因子 GrpE が必須だと考えられている (図1)。

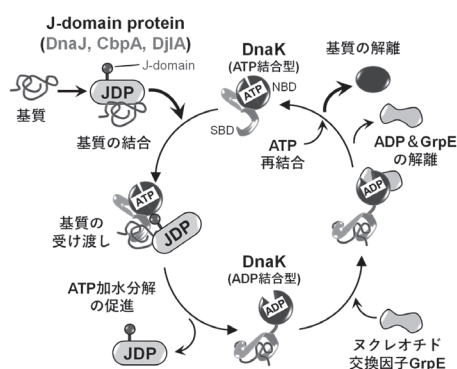


図1 DnaK シャペロンシステムの反応サイクル

大腸菌の高温条件での生育とバイオフィルムの形成に重要な菌体外アミロイド線維 Curli の産生には DnaK が必須である。一方、3つの JDP のうち唯一 DnaJ が高温での生育に必須であるが、Curli の産生では DnaJ と CbpA が相補的に機能する。我々はこれらの知見に基づき、結合する JDP によって DnaK のシャペロン機能の強さが変化し、担当する細胞機能の種類が決まるといふ、「DnaK システムの機能的ヒエラルキー」という概念を提唱している。本研究では、この概念を規定する分子基盤の解明を目指した。

【方法・結果・考察】 *Escherichia coli* BW25113 株を用いた。表面プラズモン共鳴法を用いて、DnaK に対する DnaJ と CbpA の結合の強さを比較した。その結果、両者とも同程度の親和性で DnaK に結合した。次に、免疫沈降法とプロテオーム解析により、DnaJ および CbpA に結合するタンパク質の同定を試み、DnaJ に結合する 285 種類のタンパク質と CbpA に結合する 152 種類のタンパク質を同定できた。多くの細菌において *dnaJ* は *dnaK* とオペロンを形成し、*cbpA* は染色体上の離れた位置に存在するため、これらの染色体上の位置を入れ替えた変異株を作製し、熱感受性を指標にして、オペロン構

造の重要性を検討した。その結果、*dnaJ* を欠損する株のみ 43°C で生育できなかったが、*dnaJ* を *cbpA* の座位に変更した株 ( $\Delta cbpA::dnaJ \Delta dnaJ$ ) と *cbpA* を *dnaJ* の座位に置換した株 ( $\Delta dnaJ::cbpA \Delta cbpA$ ) は、野生株や *cbpA* 欠損株などと同様に 43°C で生育可能であった (図2)。つまり、DnaJ は染色体上の位置に関わらず機能できること、CbpA は染色体上の本来の位置から発現する場合は機能が不十分であるが、DnaK と共にオペロンとして発現することで DnaJ と同等の機能を発揮できることが明らかとなった。

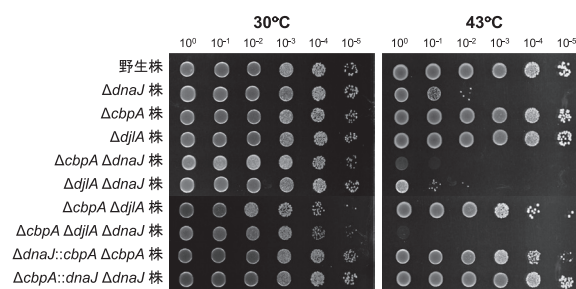


図2 大腸菌の温度感受性 (寒天培地上での生育)

大腸菌の生育に DnaK は必須ではなく、その補助因子 GrpE は必須であるが、この謎は長らく不明であった。GrpE は半減期の長いタンパク質であるため、プロモーター置換法などを用いた従来法では GrpE の必須機能の解析が困難であった。そこで、ATP 依存性プロテアーゼ ClpXP による標的タンパク質特異的分解系とライブセルイメージングを組み合わせた APLICoT 法 (Aimed Proteolysis and Live Cell Imaging Coupled Technology) を開発し、GrpE の必須な細胞機能を解析した。ウェスタン・ブロット法により、GrpE の迅速な分解が確認され、それに伴う細胞分裂阻害と細胞膜の破綻による死滅が観察された。なお、この効果は DnaK に非依存であった。

上記の通り、通常の大腸菌からは *grpE* を欠損できなかったが、染色体上の特定の領域を欠損した変異株の場合は *grpE* を欠損できることを明らかにした。この *grpE* 欠損株や遺伝子相補株を使ってバイオフィルム形成に重要な細胞外アミロイド線維 Curli の産生を調べた結果、GrpE は Curli の産生には必須ではないが、効率的な Curli の産生には必要であることがわかった。

これらの成果は、DnaK シャペロンシステムの機能的ヒエラルキーを規定する分子基盤についての新たな洞察を与えるものである。

## ヒト細菌叢形成に関与する V 型線毛の付着機構の理解と制御

柴田 敏史

【目的】 ヒト細菌叢は身体・精神の健康と密接に関与するため、健全な細菌叢の維持は課題である。細菌叢の形成には細菌間・他の微生物・宿主との相互作用を成立させる付着因子の線毛が重要である。なかでも、ヒト細菌叢内で主要な Bacteroidota 門細菌の線毛は V 型に分類されている。V 型線毛は (1) 構成蛋白質ピリンが膜蛋白質として菌体表面に輸送、(2) プロテアーゼ切断を契機に C 末端ストランドが放出、(3) 放出後に現れる疎水性の溝に結合相手の C 末端ストランドが交換されるように結合し、根元伸長すると予想されている (図 1)。しかし、V 型線毛の天然 (重合体) 構造は口腔細菌 *Porphyromonas gingivalis* (PG) の Fim 線毛ストーク以外は未解明である。本研究は腸内 Bacteroidota 門細菌群を含む種々の V 型線毛構造を同定し、構造学的知見から V 型線毛の中心的な構築・付着機構とその多様性の解明を目指した。

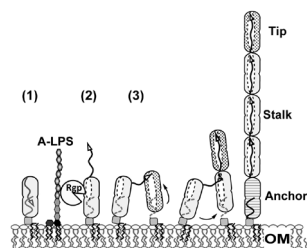


図 1 V 型線毛構築モデル

【方法】 PG ATCC33277 株の Fim 線毛のストーク構成ピリンは大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現、精製し、試験管内で PG 由来のプロテアーゼ RgpB と混合すると重合した。そこで、PG のマイナー Mfa 線毛ストークピリン Mfa1 と、腸内 Bacteroidota 門細菌のストークピリンの中でプロテアーゼ切断領域に RgpB が認識可能な Arg 残基が保存された *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) VPI-5482 株と *Bacteroides ovatus* (BO) ATCC8483 株のものについて、試験管内再構成を試みた。さらに、プロテアーゼ切断配列を非細菌性セリンプロテアーゼのエンテロキナーゼ認識配列に改変した、PG, BT, BO と *Parabacteroides distasonis* (PD) ATCC8503 株のストークピリンの、エンテロキナーゼを使った再構成も試みた。得られた重合体をクライオ電子顕微鏡構造解析した。免疫応答はヒト臍帯静脈内皮細胞の培養液に線毛蛋白質を加え、培養後 ELISA でサイトカイン量を定量し調べた。【結果・考察】 PG, BO のストークピリンは RgpB とエンテロキナーゼどちらの酵素を用いた系でも重合させる

ことができた。一方、BT, PD ではエンテロキナーゼ利用系で重合体が形成された (図 2)。これらの結果から、V 型線毛において、プロテアーゼによる切断が重合の引き金となる構築機構の共通性が示された。さらに BO のピリンは異種細菌由来の RgpB プロテアーゼによっても重合したことから、細菌叢内で共存する細菌、宿主が産生するプロテアーゼを利用した線毛構築の可能性も考えられた。腸内細菌 V 型線毛のクライオ電子顕微鏡解析は未達成であるが、重合、精製条件を最適化し進める。

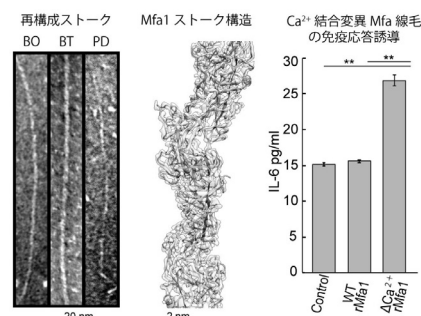


図 2 試験管内再構成された V 型線毛と Mfa 線毛の自然免疫応答性

PG の Mfa1 ストークは重合体の構造を決定し (図 2)、重合体とモノマーで球菌結合領域の構造が異なることを明らかにした。また、構造内に金属イオンが存在していることが判明し、結合の関与が推定されたアミノ酸残基の Ala 置換と元素分析 (ICP-AES 分析) により、Mfa 線毛は  $\text{Ca}^{2+}$  結合型 V 型線毛であることを明らかにした。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  結合は Mfa 線毛の重合に影響しないが、宿主の自然免疫応答抑制に関わり、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合しない変異型 Mfa 線毛 ( $\Delta\text{Ca}^{2+}\text{rMfa1}$ ) はヒト培養細胞の IL-6 サイトカイン産生を誘導する結果を得た (図 2)。つまり Mfa 線毛は進化の過程で、宿主の自然免疫を回避するために  $\text{Ca}^{2+}$  結合型になった可能性が示唆された。

天然状態の V 型線毛構造を創薬研究の鋳型として提案する。また、非細菌由来のプロテアーゼを用いて V 型線毛の重合を可能にした点は、網羅的な V 型線毛構造解析、線毛構築阻害剤スクリーニング、バイオマテリアルへの応用研究を加速させる成果である。また、線毛の免疫回避戦略の一端を示すこともできた。引き続き「Bacteroidota 門細菌独自の付着機構の理解」から、「Bacteroidota 門細菌の付着制御による健全な細菌叢の維持」を達成する応用研究への展開に取り組むたい。

## バクテリア MutS パラログによる翻訳ストレス緩和の分子メカニズム

福井 健二

**【目的】** MutS ファミリータンパク質は生物界に広く存在する ATPase スーパーファミリーであり、DNA ミスマッチ修復や組換えに関与する。バクテリア MutS2 は、組換え中間体である分岐 DNA 構造を認識することで知られていたが、近年では翻訳中に衝突したリボソーム（ダイソーム）の解離を通して翻訳ストレスの緩和に関与することが示されている。本研究では、バクテリア MutS2 によるダイソーム解離の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、特に、ATP の結合と加水分解による MutS2 の構造変化に着目した研究を行った。

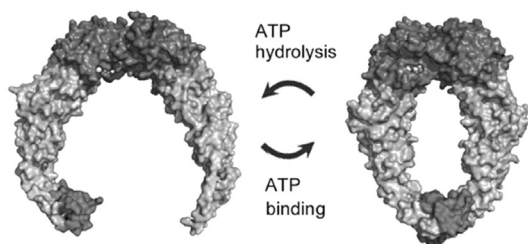


図1 MutS2 の ATP 結合と加水分解依存的な構造変化。ADP 結合型（左）は開いたクランプ状のダイマー構造。ATP アナログ結合型（右）は閉じたクランプ状。

**【方法】** 本研究では、*Thermotoga maritima* MSB8 株由来の MutS2 (tmMutS2) を対象に、ATP アナログ（アデノシン 5'-[ $\beta,\gamma$ -イミド]三リン酸）を結合した状態の X 線結晶構造解析を行った。まず、tmMutS2 の組換えタンパク質を大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株で発現・精製し、ATP アナログ存在下で結晶化を試みた。得られた結晶を大型放射光施設 SPring-8 において測定し、その X 線回折データから原子分解能の立体構造情報を得た。さらに、光感受性の非天然型アミノ酸である *p*-ベンゾイル L-フェニルアラニン を部位特異的に導入することで条件依存的な光架橋を施し、溶液中においても結晶構造と同様の構造が存在することを確認した。

**【結果・考察】** 本研究では、tmMutS2 のコア領域（1-497 残基）について、ATP 非加水分解性アナログを結合させた構造解析を行った。得られた tmMutS2 の結晶構造は非対称単位あたり 2 つのホモ二量体を含み、各プロトマーは ATP アナログと  $Mg^{2+}$  を 1 分子ずつ結合していた。MutS2 はクランプ状のダイマー構造を取るが（図 1 左）、

ATP アナログ結合状態の tmMutS2 構造は、ADP 結合型やリガンド非結合型の MutS2 と比較して、各クランプドメインの先端が内側に移動し、ATP 依存的に閉じた構造をとることが明らかになった（図 1 右）。

このクランプ閉鎖が溶液中でも起こるかを検証するため、クランプ先端に光反応性の非天然型アミノ酸 *p*-ベンゾイル L-フェニルアラニンを導入し、さらに隣接する Glu230 を Met に置換して光架橋実験を行った。その結果、ATP アナログ存在下で明確な二量体間架橋生成が観察され、ATP 結合によりクランプが溶液中でも閉じた状態を取ることが示された。この閉鎖には、Ser376 と Phe378 が ATP の  $\gamma$  リン酸を認識することが重要であり、これらの相互作用がサブユニットの配置変化を引き起こし、クランプ閉鎖を安定化させる「クラスプ」として機能することが示唆された。

MutS2 とリボソーム衝突複合体の形成時には、ADP 結合型の開いたクランプ状 MutS2 がリボソームの 50S と 30S サブユニットの界面に結合していることが知られているが、ATP 結合に伴うクランプの閉鎖は、50S と 30S サブユニットの界面を破壊すると考えられる（図 2）。MutS2 によるリボソームの解離には ATP の加水分解も必要であることが分かっているため、クランプの閉鎖後に ATP 結合型の MutS2 クランプが再び開環することも完全なリボソームの解離には必要であると推測される。

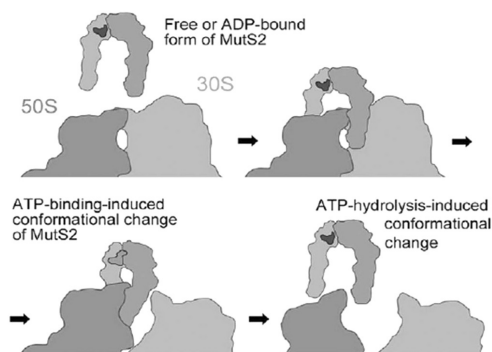


図2 MutS2 によるリボソームの解離。停止したリボソームに開いたクランプ状の MutS2 が結合する。ADP/ATP 変換により MutS2 のクランプが閉じ、さらに ATP の加水分解によりクランプが開く。一連の構造変化が 50S と 30S サブユニットを解離させる。

## 転写アテニュエーションは細菌固有のシステムか？

金井 保

【目的】生物は生育環境の変化に適応するため、自身の遺伝子を調節する能力をもつ。遺伝子の調節には様々な機構が存在するが、転写制御因子による転写開始時の制御は、全生物ドメインに共通に見られる仕組みである。一方、原核生物であるバクテリアには、転写アテニュエーションによる転写制御機構が存在する。これは、一度開始された転写が、環境要因によって途中で中断される（もしくはされない）仕組みである。この有名な例は、大腸菌の *trp* オペロンなどで見られるリボソーム上での翻訳停止を介した転写アテニュエーションである。大腸菌の *trp* オペロンの上流には小さな ORF (sORF) が存在し、この sORF の終止コドン付近に連続した2つのトリプトファン (Trp) コドンがある。Trp 濃度が高い場合は、オペロンの下流で転写が終結し、*trp* オペロンの転写量が低下する。一方、Trp 濃度が低い環境では、Trp コドン上でリボソームの翻訳が停止し、このスタックしたリボソームが RNA 構造を変化させることにより、*trp* オペロンの転写終結が抑制され、転写が継続する。このようなリボソーム上での翻訳を介した転写アテニュエーションは、原核生物を構成するもう一つのドメインであるアーキアでは、これまでに知られていない。私達は超好熱性アーキアのアミノ酸生合成遺伝子群のオペロンに、全ゲノム解析では見過ごされていた sORF を発見した。そこで、この sORF を含むプロモーター部分の解析により、アーキアにおいても転写アテニュエーションが存在する可能性を検証した。

【方法】超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1 株のヒスチジン生合成オペロンの上流には、16aa のペプチドをコードする sORF が存在し、この sORF の終止コドン手前にはヒスチジンコドンが2つ連続している。この sORF を含むプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子解析を行った。大腸菌 DH5a 株とのシャトルベクター pRPC03 は、各生物で機能する複製起点およびマーカー遺伝子と、レポータータンパク質となる耐熱性キチナーゼ遺伝子 (*chiAΔ4*) をもつ。*chiAΔ4* の上流にヒスチジン生合成オペロンのプロモーター領域を導入したプラスミドを作製した (図1)。さらにヒスチジン生合成オペロンの転写開始点より上流の部分、cell-surface glycoprotein 遺伝子 (*csg*) の領域と入れ替えたプラスミドを構築した。これらはそれぞれ pRPC11、pRPC21 と

した。作製したプラスミドを *T. kodakarensis* KPD2 株 ( $\Delta pyrF$ ,  $\Delta pdaD$ ,  $\Delta chiA$ ) に導入した形質転換株を、ヒスチジン濃度の異なる2種類の培地で培養した。キチナーゼ活性測定は、細胞抽出液に4-メチルウムベルリフェリル- $\beta$ -D-N, N'-ジアセチルキトビオースを加えて85°Cで30min インキュベーションし、加水分解により生じる蛍光物質を定量した。

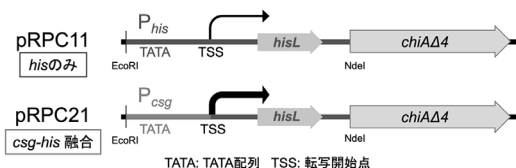


図1 レポーター解析で作製したプラスミド

【結果・考察】pRPC11 導入株では、培地内のヒスチジン濃度に関わらず、キチナーゼ活性はバックグラウンドと同程度の低いレベルであった (図2)。その原因として、本プロモーターの転写活性が低いこと、もしくは転写活性の上昇には何らかの誘導物質が必要であること、が考えられた。これらの問題を回避するため、転写を恒常的かつ強力に誘導する *csg* プロモーターの下流にこの sORF 領域を結合させた pRPC21 を用いた結果、ヒスチジン濃度が低い場合は高いキチナーゼ活性が見られたのに対し、ヒスチジン濃度が高いときは活性が大きく減少した (図2)。続いてこの系を用いて、sORF に様々な変異を導入した。sORF の開始コドンの除去や連続するヒスチジンコドンの変更により、共にヒスチジン濃度に依存した活性変化が消失した。これらの結果は、sORF 上におけるリボソームの翻訳を通じて外界のヒスチジン濃度が検知されている可能性を示し、アーキアでも転写アテニュエーションによる転写調節機構が存在することを示唆している。

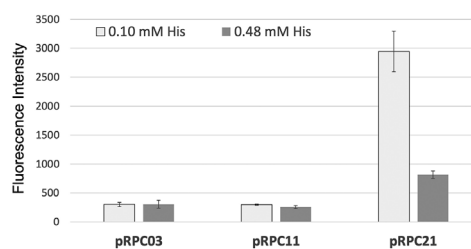


図2 キチナーゼ活性測定の結果

## 黒麹菌が複数の細胞壁 $\alpha$ -グルカンを有する生理的意義の解明

水谷 治

【目的】 泡盛醸造に用いられている黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、他の *Aspergillus* 属と同様にグルコースにより構成された細胞壁多糖  $\alpha$ -1,3-グルカン (AG) を有する。一方で黒麹菌は、黄麹菌やモデル糸状菌 *A. nidulans* には存在しない  $\alpha$ -1,3/ $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を交互に持つ細胞壁多糖、ニゲラン (NG) も有する。黒麹菌は、*Aspergillus* 属において最大である5つの細胞壁  $\alpha$ -グルカン合成遺伝子 (*agsA*~*E*) を有し、我々は黒麹菌における主要な細胞壁 AG 合成酵素遺伝子が *agsE* であること、更に、NG 合成酵素遺伝子が *agsB* であることを世界で初めて見出し、*nisA* として報告している。一方、その他の *ags* 遺伝子がどのような  $\alpha$ -グルカンを合成するのかは不明である。本研究では、黒麹菌を中心に *Nigri* 節糸状菌の細胞壁  $\alpha$ -グルカンの多様性と複数の  $\alpha$ -グルカンを作る生理的意義を明らかにすることを目的として、*Nigri* 節に属する糸状菌等の NG 合成遺伝子の多様性とニゲラン生産量を調べた。更に、黒麹菌 *nisA* 遺伝子や研究が殆ど進んでいない黄麹菌 *agsC* group に属する黒麹菌 *agsA* 遺伝子の機能解析にも取り組んだ。

【方法】 黒麹菌 (RIB2604) *nisA* や *agsA* が産生する細胞壁  $\alpha$ -グルカンを調べるために、ニゲラン生産能のない黄麹菌 ( $\Delta$ *ligD*) に対して、AG 合成酵素遺伝子及びガラクトサミノガラクトン (GAG) 合成酵素遺伝子群を破壊した  $\Delta$ AG-GAG 株を親株として、黒麹菌 *nisA* や *agsA* 遺伝子の高発現カセットを導入し、細胞壁多糖の酸加水分解によるグルコース量や表現型を調べた。また、*A. luchuensis* の *NisA* 配列をもとに *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属を対象として BlastP 検索を行った。クエリカバー 95% 以上のタンパク質配列の内、*NisA* との配列同一性が 80% 以上の配列を選択し、近隣接合法で系統樹解析を行った。NITE バイオテクノロジーセンターから *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属糸状菌を入手し、窒素源飢餓時におけるニゲラン生産量を調べた。

【結果・考察】 黄麹菌  $\Delta$ AG-GAG 株を宿主として複数の *nisA* 高発現株 (O*EnisA*) が得られ、*nisA* の導入コピー数に応じて NG 生産量が増加した。最も多く NG を生産した株では、乾燥菌体あたり 20% となり従来産生される細胞壁 AG と同程度まで NG を合成できることが明らかとなった。また、菌糸表層の顕微鏡観察では、NG 生産量に応じて棘様構造が観察された (図1)。この棘様構造が NG であるかを調べるために、NG 分解酵素の糖質結合モジュール領域と GFP を融合させたタンパクを

用いて、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、細胞表層とともに棘様構造が蛍光を発した。加えて、NG 分解酵素によって棘様構造が消失したことから、本構造が NG であることが明らかになった。同様に黒麹菌の *agsA* を  $\Delta$ AG-GAG 株で高発現させ、表現型を観察した。親株である  $\Delta$ AG-GAG 株は液体培養下でその菌糸が凝集せずに完全分散を示す。*agsA* 高発現株の表現型を観察したところ、その分散性は抑制されなかった。そこで細胞壁解析を行ったところ、細胞壁グルコース量の増加が認められた。これらの結果から、黒麹菌の *agsA* 遺伝子は従来の AG とは異なる  $\alpha$ -グルカンを合成している可能性が示唆された。

*NisA* のオルソログタンパク質候補に関して、BlastP 解析の結果、本酵素を持つ *Aspergillus* 属糸状菌は *Nigri* 節に属していた。また *Aspergillus* および *Penicillium* 属はゲノム上に *nisA* を一つだけコードしていた。各糸状菌株の NG 生産量を比較すると、*A. japonicus* が最も多くの NG を生産し、その量は *A. luchuensis* の 10 倍以上であり、これは上述した NG 高生産株と同程度だった (図2)。そこで、*A. japonicus* においても棘様構造が観察されるか調べたところ、菌糸の一部にのみ棘様構造が観察された (図1)。野生株である *A. japonicus* は NG 生産量こそ多いが、菌糸表層に AG や GAG を有するために棘様構造の部位が少なかったと推測された。以上のように黒麹菌を含む *Nigri* 節に属する糸状菌は多様な細胞壁  $\alpha$ -グルカンを産生することが示唆され、今後はその機能についても明らかにしていきたい。

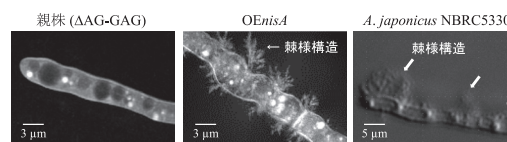


図1 ニゲラン高生産株 (O*EnisA*) と *A. japonicus* のニゲラン棘様構造

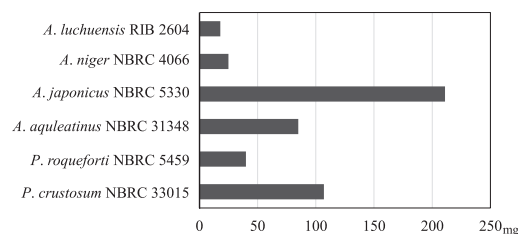


図2 糸状菌乾燥重量 1g 当たりのニゲラン生産量の比較

## ミトコンドリアに眠る機能未知の小さなタンパク質群の網羅的解析

古川 健太郎

**【目的】** ミトコンドリアは生命活動の根幹を担うオルガネラであり、分裂・融合・分解などを介して恒常性が維持されている。我々は最近、ミトコンドリアの恒常性維持機構の一種であるミトコンドリアオートファジー（マイトファジー）の必須因子として、新規ミトコンドリア分裂因子マイトフィッシン Atg44 を同定した（*Mol Cell* 2023）。Atg44 は、従来の研究対象から見逃されてきた 100 アミノ酸に満たない非常に小さなタンパク質（マイクロタンパク質）であったことから、ミトコンドリアには機能未知のマイクロタンパク質が未開拓状態であることが期待された。本研究では、酵母のミトコンドリアに眠る未開拓マイクロタンパク質群に焦点を当て、ミトコンドリアの機能・形態制御・品質管理における役割と機能発揮の分子機構を解明することを目的とした。

**【方法】** 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリアプロテオーム解析で同定されたものの、解析が進んでいないマイクロタンパク質群の遺伝子破壊株を作製し、呼吸増殖能・マイトファジー活性・ミトコンドリア形態・オルガネラコンタクトサイトの動態などの解析を行った。この中から、新規マイトファジー因子として見出した Mco12（Mfi2 と命名）について、*in vivo* と *in vitro* における機能解析を進めた。また、上記遺伝子破壊株の中で、唯一通常培地におけるミトコンドリア形態に異常を示した Atg44 と既知の分裂因子であるダイナミン様タンパク質 Dnm1 との関連性について、蛍光顕微鏡から電子顕微鏡レベルでの検証を行った。

**【結果・考察】** 解析対象のマイクロタンパク質の遺伝子破壊株のうち、既知の Atg44 欠損株に加え、Mfi2 欠損株もマイトファジーの低下（野生株の 70% の活性）が見られた。Mfi2 抗体を用いた生化学的解析から、Mfi2 はミトコンドリア外膜に局在することが分かった。Atg44 欠損株において Mfi2 を過剰発現させると、マイトファジーの部分的な回復とミトコンドリアの断片化が見られた。リコンビナント Mfi2 を用いた *in vitro* アッセイから、Atg44 と同様に、Mfi2 は脂質膜に直接結合・切断する活性を有することを明らかにした。さらに、Mfi2 と Dnm1 の単独欠損株ではマイトファジーの低下はわずかであるのに対し、二重欠損株では劇的な低下（野生株の 10% の活性）が見られた。この要因として、二重欠損株ではミトコンドリア分裂に欠陥があることを

突き止めた。以上の結果から、Mfi2 は外膜局在の新規マイトフィッシンであり、Mfi2 と Dnm1 はマイトファジー誘導時におけるミトコンドリア分裂を独立に促進している（図 1）。

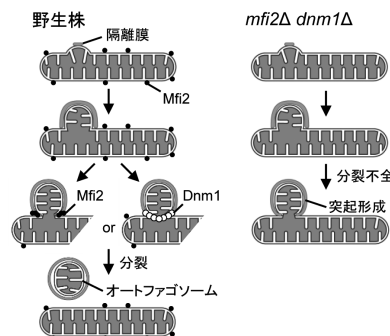


図 1 マイトファジー誘導時において Mfi2 と Dnm1 は独立にミトコンドリア分裂を促進する

Atg44 欠損株と Dnm1 欠損株は、通常培地において類似したミトコンドリア形態を示した。野生株において Dnm1 が集積する部位でミトコンドリアの分裂が見られたのに対し、Atg44 欠損株ではミトコンドリアの強い狭窄が見られたものの分裂は確認されなかった（図 2A）。この狭窄部位を詳細に調べたところ、内膜は切断されおらず、マトリックス成分はほとんど検出されないレベルまで非常に細くなっていることが確認された。以上から、通常のミトコンドリア分裂において、Dnm1 はミトコンドリアを狭窄するにとどまり、Atg44 と Dnm1 の協調作用が分裂に必須であることを明らかにした（図 2B）。

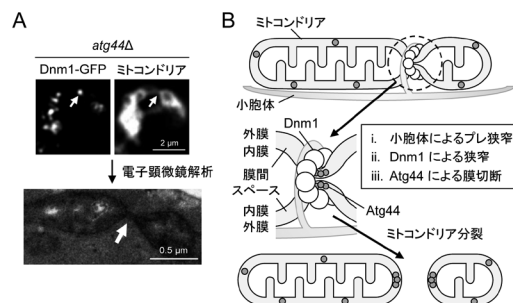


図 2 (A) Atg44 欠損株では Dnm1 が集積してもミトコンドリアの分裂は完了しない (B) Atg44 と Dnm1 の協調作用によるミトコンドリア分裂

## 概日リズムの振動を生み出す構造－機能相関の解明

武藤 梨沙

【目的】地球上の多くの生物は、地球の自転によって生じる約24時間周期の環境変化に適応するため、生物時計と呼ばれる分子機構を備えている。シアノバクテリアは、生物時計を最初に獲得した生物とされており、その時計分子装置は時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC から構成され、ATPを駆動力として概日リズムを生み出す。私たちは最近、KaiCに結合したATPが遊離する現象にリズムがあることを発見した(ATP遊離リズム)。このリズムは野生型 KaiC (KaiC<sub>WT</sub>) 単独で観察されたことから、KaiC自身に概日リズムの基となる振動機能が備わっていることが示唆された。古細菌やシュードモナドータは KaiABC 時計分子装置を持たないことから、生物時計を備えていないと考えられている。しかし、*kaiC* 遺伝子を有しており、これらの KaiC にも振動機能があるのではないかと考えられる。本研究では、KaiC のリン酸化部位に着目し、その変異が生物時計の機能に与える影響を解析することで、生物時計の起源に迫ることを目的とした。

【方法】KaiC のアミノ酸配列を NCBI データベースから収集し、Clustal W を用いてアライメントを作成した。その結果、シアノバクテリア KaiC では2つのリン酸化部位が Ser 残基および Thr 残基で構成されているのに対し、古細菌やシュードモナドータの KaiC では2つとも Ser 残基である例が多かった。そこで、本研究ではシアノバクテリア *Thermosynechococcus vestitus* BP-1 由来 KaiC の2番目のリン酸化部位である Thr 残基を Ser 残基に置換した変異体 KaiC (KaiC<sub>SS</sub>) を作製し実験を行った。Kai タンパク質は大腸菌株 BL21 で発現させ、精製した。

1. ATP 遊離リズムの測定: ATP-Mg<sup>2+</sup> を溶液中から除去した KaiC<sub>SS</sub> 溶液を 1.6 μM に調製し、0.1 μM ホタルルシフェラーゼと 10 μM D-ルシフェリンを添加した。高感度生物発光測定装置 (CL96, 中立電機) にセットし、3.5 分ごとに7日間、発光値を測定した。

2. KaiC のリン酸化リズムの測定: 0.3 μM KaiA, 0.3 μM KaiB, 0.2 μM KaiC を ATP-Mg<sup>2+</sup> を含むバッファーに混合し、25℃または40℃で保温した。*T. vestitus* の至適増殖温度は57℃であるが、*in vitro* の実験では溶液の蒸発を考慮し、40℃で行った。また、概日リズムを検出できる下限値25℃でも実験を行い、温度による影響を比較した。4時間毎に試料を回収し、SDS-PAGE 法によりリン酸化バンドと非リン酸化バンドに分離した。リン酸化バンドの強度をデンシトメトリーにより解析し、リズムは解析 NINJA (中立電機) を用いてフィッティングした。

【結果・考察】KaiC<sub>SS</sub> 単独でATP遊離量を測定した結果、0.5, 8, 46, 80時間目にピークが検出された(図1A)。KaiC<sub>WT</sub>と同様に(図1B)、ATP遊離量の増減が確認されたことから、KaiC<sub>SS</sub>は振動機能を有していることが明らかになった。この結果は、シュードモナドータや古細菌の KaiC も振動機能が存在する可能性を示唆している。

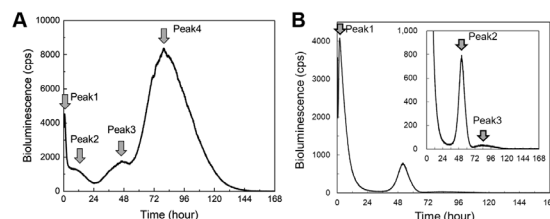


図1 ATP遊離リズム (A) KaiC<sub>SS</sub> (B) KaiC<sub>WT</sub>

次に、KaiC<sub>SS</sub> の時計としての機能を検証した。KaiA, KaiB, KaiC 存在下で KaiC のリン酸化リズムを測定したところ、40℃では、KaiC<sub>SS</sub> と KaiC<sub>WT</sub> の間で周期に大きな違いは認められなかったが、KaiC<sub>SS</sub> では位相の前進が見られた(図2A)。また、KaiA と KaiC を ATP-Mg<sup>2+</sup> 存在下で混合リン酸化の初速度は、KaiC<sub>WT</sub> が 22.5%/h であったのに対し、KaiC<sub>SS</sub> は 26.2% と高い値を示した。これは、KaiA と KaiC<sub>SS</sub> の親和性が高く、その結果、位相が前進したのではないかと考えられる。一方、25℃におけるリン酸化リズムでは、KaiC<sub>SS</sub> は短周期で低振幅のリズムを示した(図2B)。この結果は、KaiC<sub>SS</sub> が温度補償性を欠くことを示している。温度補償性は生物時計の特性を示す機能の一つであり、これが失われると生物時計は成立しないため、KaiC<sub>SS</sub> は生物時計としての機能はないと考えられる。以上より、シアノバクテリアよりも原始的な KaiC は生物時計としての機能を持たず、KaiC のリン酸化部位が Ser 残基から Thr 残基に置換されたことによって温度補償能が進化的に獲得された可能性が示唆された。

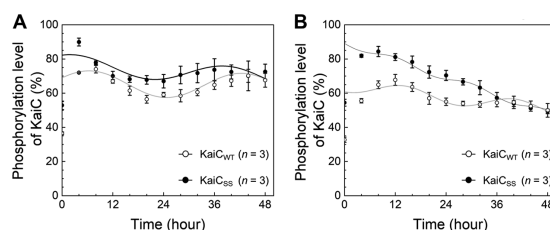


図2 KaiC のリン酸化リズム (A) 40℃ (B) 25℃



## グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを介した 真菌型ガラクトマンナンの細胞表層輸送モデルの解明

岡 拓 二

**【目的】** 真菌型ガラクトマンナン (FTGM) は、糸状菌が産生するユニークな構造を持つ多糖であり、マンノースとガラクトフラノースから構成される。FTGMはゴルジ体で生合成されることが知られているが、どのような受容分子に対して生合成され、その後どのように細胞表層へ輸送されるのかは未解明である。現在、有力なキャリアー分子の候補としてグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーが挙げられている。本研究では、ヒトや出芽酵母における先行研究により同定されている GPI アンカー生合成関連遺伝子群の糸状菌におけるオルソログに注目し、それらの破壊株を構築して、解析を行うことで、FTGMが GPI アンカーを受容分子として生合成され、細胞表層へと輸送される機構を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 供試菌として *Aspergillus fumigatus* A1151 株および A1160 株を用いた。ヒトおよび出芽酵母において既知の GPI アンカー生合成関連遺伝子を、病原性糸状菌 *A. fumigatus* のゲノムから BlastP により検索し、命名した。エタノールアミンリン酸転移酵素遺伝子として *pigO* および *pigF* を、GPI トランスアミダーゼ複合体の構成因子として *pigK*, *gaaA*, *pigT*, *pigS* および *pigU* を、GPI アンカーのマンノース転移酵素遺伝子として *pigX*, *pigV*, *pigB* および *smpC* を同定した。さらに、*clpA* については GPI アンカーの5番目のマンノース転移酵素をコードする遺伝子として既報に基づき注目した。各遺伝子の破壊株を定法に従って構築した。

**【結果・考察】** *A. fumigatus* の GPI アンカー生合成に関わる遺伝子破壊株を構築し、それぞれのコロニー形態と生育を評価した。タンパク質を GPI アンカーへ転移する際に必要なエタノールアミンリン酸を GPI の3番目のマンノース残基に転移する *pigO* および *pigF* の破壊株、ならびに GPI トランスアミダーゼ複合体遺伝子 (*pigK*, *gaaA*, *pigT*, *pigS*, *pigU*) の破壊株はいずれも顕著な生育阻害を示したが、いずれも致死ではなかった。一方、マンノース転移酵素遺伝子群のうち *pigX*, *pigV*, *pigB* の破壊は致死であり、GPI 糖鎖の3番目のマンノース残基までの構造は *A. fumigatus* においても出芽酵母と同様に生存に必須であることが示された。興味深いことに、4番目のマンノース転移酵素をコードする *smpC* の破壊

株 ( $\Delta smpC$  株) は、高浸透圧条件下でのみ生育可能で、他の非致死性 GPI 生合成遺伝子破壊株と比較して最も重篤な生育阻害を示した。このことは、GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の存在よりも、GPI の4番目のマンノース残基の存在が *A. fumigatus* の生育に重要であることを示していた (図1)。

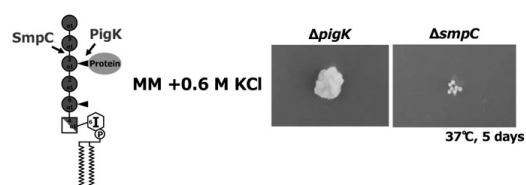


図1 左: SmpCとPigKの生合成箇所  
右:  $\Delta pigK$ 株と $\Delta smpC$ 株のコロニーの比較

また、eGFP-GPIを発現させて局在を解析したところ、 $\Delta smpC$ 株では GPI-AP が細胞表層に輸送されていたのに対し、 $\Delta pigK$ 株ではゴルジ体に滞留していた。さらに、 $\Delta smpC$ 株では細胞壁中の FTGM が消失していた。以上のことから、FTGM は GPI アンカーの4番目のマンノース残基を受容基質としてゴルジ体で生合成される可能性が強く示唆された。本研究により、FTGM は GPI-AP に結合するのではなく、GPI アンカー自体をキャリアー分子として利用し、その4番目のマンノース残基を受容基質としてゴルジ体で各種糖転移酵素によって伸長され、輸送小胞によって細胞表層に運ばれた後、GPI アンカーから切断され、細胞壁の  $\beta$ -1,3-グルカンに架橋されるといふ輸送モデルが支持された (図2)。

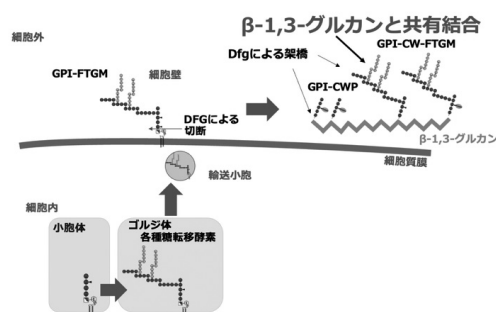


図2 真菌型ガラクトマンナンの細胞表層輸送機構の概略図

## 微細藻類の鞭毛に存在する蛋白質合成系の解明

久保智広

**【目的】** 真核生物の鞭毛(繊毛と同義)は、微小管細胞骨格で構成される運動性の細胞小器官で、細胞の遊泳、物質の輸送、細胞外からのシグナルの受容に重要な役割を担う。単細胞緑藻類のクラミドモナスは、pHショックを与えると、鞭毛を脱離するが、2時間程度で新しい鞭毛を再生する。このように素早く鞭毛が再生するためには、細胞体で合成された数百種類の鞭毛蛋白質が鞭毛内輸送系(Intraflagellar transport; IFT)と呼ばれる機構により鞭毛内へ運びこまれることが必須であると考えられている。

一方、最近、マウス上皮細胞の多繊毛内においてリボソームRNAや転写開始因子などの存在が報告された。すなわち、この結果は鞭毛内に蛋白質合成系が存在する可能性を示唆するものである。本研究は、鞭毛内に蛋白質合成系が存在するかどうか、そしてその意義を解明することを目的として開始した。鞭毛の構築異常は、ヒトにおいて「繊毛病」と総称される一連の遺伝的疾患を引き起こす。鞭毛構築の分子機構を追究することは医学的にも重要である。

### 【方法】

#### 細胞と培地

*Chlamydomonas reinhardtii* の細胞を用いて実験を行った。クラミドモナスリソースセンターから野生株(cc124)および *rpl4* (LMJ.RYO402.064157) を取り寄せて使用した。細胞の培養維持にはTAP(Tris-Acetate-Phosphate)液体培地および寒天培地を用いた。

#### 鞭毛再生過程における蛋白質合成の可視化

TAP液体培地で培養中のクラミドモナス細胞にpHショックを与えて鞭毛脱離した。鞭毛再生中の細胞に対して50 $\mu$ g/mlのpuromycin(Sigma)を添加し、2時間培養後、抗puromycin抗体(12D10, Merck)で免疫染色を行った。

#### 単離した鞭毛による鞭毛蛋白質の合成の可視化

Dibucaine(Wako)処理によってクラミドモナスから鞭毛を脱離し、遠心分離によって鞭毛を単離した。単離鞭毛に対して最終濃度が50 $\mu$ g/mlのpuromycinを処理し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、抗puromycin抗体を用いて、単離鞭毛の免疫染色およびWestern blotを行った。

**【結果・考察】** 本研究では、単細胞緑藻クラミドモナスにおいてpuromycinを用いた新規合成蛋白質を標識する方法を最適化することに成功した(図1)。Puromycinはア

ミノアシル tRNA と構造が類似しており、合成中のポリペプチド鎖に取り込まれる。特異的抗体が開発されているため、puromycinが付加された新規合成蛋白質を検出できる。本研究では、鞭毛再生中の細胞において、puromycin蛋白質が鞭毛内に多く検出されることが分かった(図1)。

さらに、単離した鞭毛が独自に蛋白質合成能を持つかを検証した。単離した鞭毛にpuromycinを添加したところ、驚くべきことに、puromycin蛋白質が明瞭に検出された(図2)。鞭毛長軸に沿って1mmあたり平均1個、1本の鞭毛に約10箇所の蛋白質合成活性部位が存在することが示唆された。

さらに、リボソーム構成因子RPL4に変異をもつ *rpl4* 株ではpuromycin取り込み量が著しく減少することも分かった。RPL4が鞭毛内蛋白質合成に関与することが示唆された。本研究では、鞭毛内の蛋白質合成系を構成する全ての分子を同定するには至らなかったが、これらの成果は、鞭毛構築に局所的な蛋白質合成が寄与する可能性を示すとともに、繊毛病の病態理解にも新たな視点を提供する可能性がある。

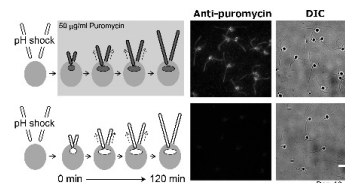


図1. 鞭毛再生中の蛋白質合成の可視化: Puromycin 標識細胞を脱離後、puromycinを添加し、抗Puromycin抗体によって新規合成蛋白質を可視化した。鞭毛および細胞体にpuromycin標識蛋白質が検出された。

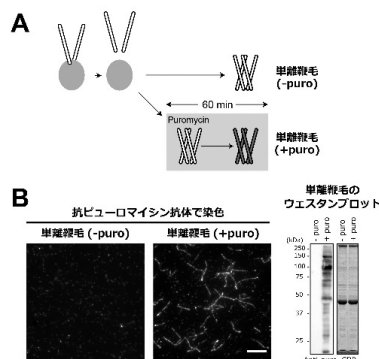


図2. 単離鞭毛の蛋白質合成能 (A) 単離鞭毛のpuromycin処理実験の概略図、(B) 単離鞭毛の抗puromycin抗体を用いた免疫染色とWestern blotの結果。

## 二形性油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* における細胞形態制御に関する研究

福田 良一

【目的】 *Yarrowia lipolytica* は *n*-アルカンなどの疎水性化合物の強力な資化能と脂質の高生産能を有する産業上重要な油糧酵母である。 *Y. lipolytica* を疎水性基質の微生物変換や脂質生産の宿主として高度利用するためには、疎水性化合物への応答と脂質代謝を理解する必要があると考えられる。一方、 *Y. lipolytica* は酵母型だけでなく偽菌糸型、菌糸型の形態をとる二形性酵母であり、 *n*-アルカンに反応して菌糸型生長が高度に誘導されることから、疎水性化合物と細胞形態に関連があることが予想される。本研究では、未解明な部分が多く残されている *Y. lipolytica* における細胞形態の変換機構とその意義を解明することを目的とした。

【方法】 本研究には *Y. lipolytica* の CXAU1 株 (MATA *ura3 ade1*) を使用し、常法に従って遺伝子の導入および破壊を行った。 *Y. lipolytica* からの DNA および RNA の抽出は常法に従って行った。 *n*-アルカンに対する吸着性の解析では、菌体を Yeast Nitrogen Base 培地に懸濁し、 *n*-ヘキサデカンを追加して激しく振とう撹拌した後に遠心して、上層の *n*-アルカンに吸着せずに沈殿した菌体を培地に懸濁して OD<sub>600</sub> を測定することにより *n*-アルカンに吸着しない細胞の割合を算出した。

【結果・考察】 我々は *Y. lipolytica* における *n*-アルカンの代謝経路について研究を行ってきたが、 *Y. lipolytica* による *n*-アルカンの取り込み機構は未解明であった。 *Y. lipolytica* は *n*-アルカンに吸着して細胞内に取り込む可能性が想定されていたことから、 *Y. lipolytica* による *n*-アルカンの取り込み機構を明らかにすることを目的として、炭素数 16 の *n*-アルカンである *n*-ヘキサデカンに吸着できない変異株を 80 株単離して解析を行った。その結果、それら変異株の 1 株は *n*-ヘキサデカンへの吸着と菌糸型生長に欠損を示すこと、この変異株は HMG-box 転写因子遺伝子 *MAR1* に変異を持つことが明らかとなっていた。

そこで本研究では、 *MAR1* の役割について解析を行うとともに、他の変異株についても解析を行った。その結果、 *MAR1* を破壊した株は菌糸型生長 (図 1) と *n*-ヘキサデカンに対する吸着に欠損を示すこと、 *MAR1* 破壊株では *n*-アルカン炭素源とする培地で野生型株よりもコロニーが小さくなること、 *Mar1* は核に局在すること、 *MAR1* を高発現すると菌糸型生長が高度に誘導されること (図 1) が

明らかになった。さらに、RNA-seq 解析および qRT-PCR 解析から、 *MAR1* 破壊株では転写因子遺伝子や細胞表層タンパク質遺伝子を含む多数の遺伝子の発現が変化していること、菌糸型生長に関わる転写因子遺伝子 *HOY1* の発現量が低下していることが明らかとなった (図 2)。

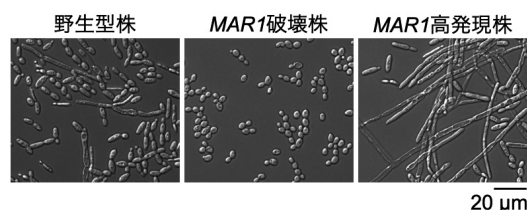


図 1 *MAR1* 破壊株および高発現株の形態

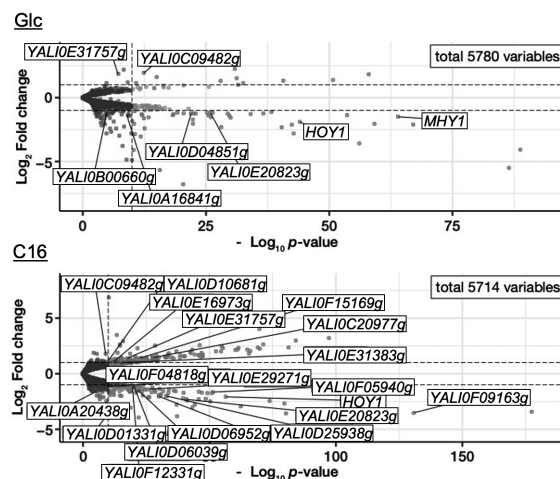


図 2 *MAR1* 破壊株における転写プロファイル。グルコース (Glc) あるいは *n*-ヘキサデカン (C16) を炭素源として培養した *MAR1* 破壊株と野生型株から RNA を調製し RNA-seq 解析を行った。転写産物量が変化した転写因子遺伝子および細胞表層タンパク質遺伝子を示した。

以上より、 *Mar1* は *Y. lipolytica* において細胞形態と細胞表層の疎水性を制御する転写因子として機能することが示唆された。

また、別の変異株の解析から、タンパク質の細胞膜への結合に関わるグリコシルホスファチジルイノシトールのアシル鎖のリモデリングに関わるアシル転移酵素遺伝子 *GUP1* が菌糸型生長に重要な役割を果たすことが明らかになった。

## 環状染色体細胞が抱える未知のストレスとその応答機構の解明

田中 克典

【目的】 原核生物と真核生物の染色体形態の違いは、生命進化の大きな謎の一つである。原核生物は環状の染色体を持つのにに対し、真核生物はなぜ線状の染色体を採用しているのか。この問いに対する明確な答えとして、「減数分裂（有性生殖）過程への適応」が挙げられる。しかし、それだけが理由なのだろうか。真核生物が線状の染色体を選択した進化的背景には、未解明の要因が潜んでいる可能性がある。

この根本的な問題に取り組むには、同一の生物種において線状および環状の染色体をもつ細胞を比較する必要がある。我々は分裂酵母を用い、線状染色体と環状染色体をもつ細胞を正確に比較・検討できる独自の評価系を確立した。これにより、染色体の環状化が細胞に与える影響や、環状染色体細胞における遺伝子発現の変動など、新たな知見を得ることができた。

本研究では、環状染色体細胞の遺伝子発現の特徴を解析し、真核細胞が栄養増殖期において線状染色体を維持する生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いた。環状染色体細胞が共通して抱える細胞内ストレスとその応答は、それぞれの分裂酵母細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により評価した。また、Sty1-Atf1 ストレス応答経路の活性化は、Sty1 および Atf1 タンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法により評価した。線状染色体細胞と環状染色体細胞の交配後、染色体の線状・環状状態（環状染色体の数と組み合わせ）を染色体上のマーカーを指標に見当をつけ選抜する手法を確立し（図1）、さまざまな組み合わせの子孫細胞を選抜し、PFGE 解析により解析した。

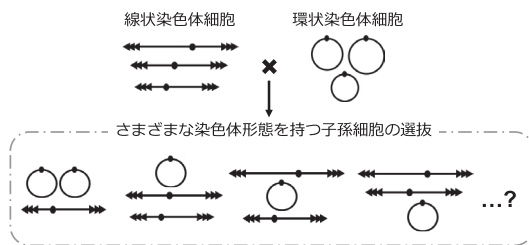


図1 染色体の線状・環状状態を制御する手法

【結果・考察】 環状染色体細胞が共通して抱える細胞内ストレスとその応答機構の解明を試みた。複数の環状染色体細胞において共通して発現上昇したストレス応答遺

伝子の多くが、MAPキナーゼ経路の下流に位置する CREB ファミリー転写因子 Atf1 依存的に発現制御を受けていることを見出した。そこで、環状染色体細胞において、このストレス応答経路が実際に活性化しているかを検証した。その結果、環状染色体細胞では Atf1 およびその上流因子である Sty1 のリン酸化修飾が亢進していることが確認された（図2）。以上の結果から、染色体の環状化により Sty1-Atf1 ストレス応答経路が活性化し、それに伴いストレス応答遺伝子の発現が亢進することが明らかとなった。

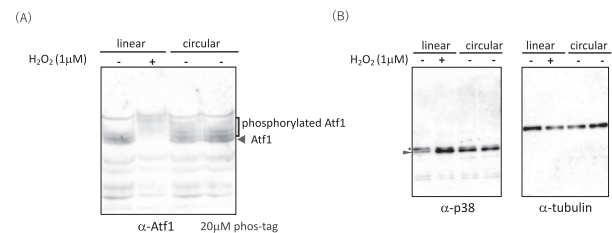


図2 環状染色体細胞では Atf1 (A) およびその上流因子である Sty1 (B) のリン酸化修飾が亢進している

次に、環状染色体細胞に共通するストレスの発生源を特定するため、分裂酵母の3本の染色体のうち、どの染色体の環状化がストレス誘導の原因となるのかを検証した。まず、染色体の線状・環状状態を制御できる手法を確立し、例えば1番染色体のみを環状化し、他の2本を線状のまま保持する細胞の作製を可能にした（図1）。この手法を用いて、線状染色体と環状染色体のさまざまな組み合わせを持つ細胞株を樹立し、ストレス応答を解析した。その結果、1番染色体のみを環状化した細胞において、3本すべての染色体が環状化した細胞と同程度のストレス応答が誘導されることが明らかとなった。これにより、1番染色体の環状化が細胞ストレスの主な発生源であることが示唆された。今後は、環状染色体の数や組み合わせの違いが染色体の核内配置に及ぼす影響を理解し、ストレス発生源である1番染色体の環状化との因果関係を解明する。本研究成果は、真核細胞が栄養増殖期において線状染色体を維持する生物学的意義を解明するための重要な手掛かりになると期待される。

また、今回の研究において、SUMO化が環状染色体細胞の生存に必須であることを偶然発見した。今後、SUMO化を介した環状染色体細胞の生存メカニズムを解明することで、線状染色体の生物学的意義に迫りたい。

## 単細胞生物のマイクロRNAが制御する生命現象発見への挑戦

山崎 朋人

【目的】 Argonaute (AGO) タンパク質はmiRNAと複合体 (AGO3/miRNA) となり, miRNAと相同な配列を持つ標的 mRNA に結合して翻訳を阻害する。クラミドモナスではAGO3がmiRNAと複合体を作る主要なAGOである。多細胞生物のAGO遺伝子変異は胚性致死や発生異常を起こすことが知られるが, 単細胞のクラミドモナスAGO3変異体は一見して分かる異常形質を見せず, 数百種類も存在するmiRNAが制御する生命現象は1つも解明されていなかった。本研究では, miRNAの標的遺伝子の同定から, miRNAが制御する生命現象の発見に挑んだ。

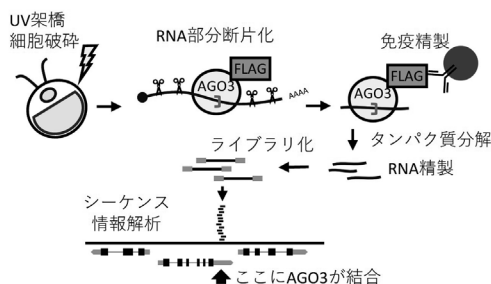


図1 AGO3 HITS-CLIP 解析の概要

【方法】 *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) 野生株 CC-124 株における miRNA の標的遺伝子同定のため, AGO3 に対する HITS-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation) 解析を行った (図1)。この技術では, まず生細胞に紫外線を照射して生きた細胞内で RNA 結合タンパク質 (RBP) と RNA に架橋し, RBP に架橋された RNA を RNase A で部分消化した後に RBP-RNA 複合体の免疫精製と 3' アダプターライゲーションを行う。RBP-RNA-3' アダプター複合体を PAGE で分離, 抽出し, Proteinase K 処理を経 RNA-3' アダプターを精製する。その後 5' アダプターライゲーションを経てライブラリ化し, 配列解析を行って AGO3 結合 RNA のリードを得る。リードは AGO3 結合フットプリントであり, 参照

配列にマッピングすることにより, AGO3 の結合領域がリードクラスターとして同定される (図2)。また, 架橋部位で生じる逆転写エラーは架橋誘発変異部位 (CIMS) と呼ばれ, これも情報解析で検出することでも RBP 結合領域を特定する。最終的には CIMS とリードのクラスターが重複する領域をもつ遺伝子を標的遺伝子として同定した (図2)。

【結果・考察】 AGO3 HITS-CLIP 解析を行い, AGO3 と結合する mRNA の種類と結合領域を網羅的に同定した。培養環境に応じた miRNA 動態の変化を捉えるため, 光混合栄養条件, 光独立栄養条件で実施した結果から, 計 120 の核コード遺伝子が検出された。それらの 30% は葉緑体移行が予測されるタンパク質をコードする核遺伝子であり, 光合成電子伝達系における鉄硫黄クラスター (*HCF101*), 葉緑体分裂 (*FTSZ2*), カルビンサイクル (*CP12*), 色素合成 (*PSY1*), 二酸化炭素濃縮 (*CAS*), 脂質合成 (*SSS4*) などに関わる多様な遺伝子が含まれていた。

また, HITS-CLIP 解析と並行して行っていた研究により, クラミドモナス miRNA の 1 つが, 青色光受容体フォトトロピンの発現調節を通じて光化学系 II の光防衛制御を行っていることも発見した。これらの研究成果から, 不明であったクラミドモナス miRNA の主たる制御対象が葉緑体の生理制御であることを示すことができた。

興味深いことに, HITS-CLIP 解析で 2 つの葉緑体遺伝子が検出された。AGO3 の結合領域は, mRNA 安定化因子 (M 因子) や翻訳促進因子 (T 因子) の結合領域と重複していた。M・T 因子による葉緑体遺伝子の転写後発現調節の仕組みは藻類や植物一般に存在し, 各遺伝子に対する個別の M・T 因子遺伝子が核にコードされている。クラミドモナスでは, 葉緑体にある 72 のタンパク質遺伝子のうち, 52 遺伝子が調節されることが示唆されている。このことから, AGO3/miRNA が葉緑体遺伝子の mRNA に結合して M・T 因子の結合を阻害し, 発現を抑制する機構が広く存在する可能性が見いだされた。

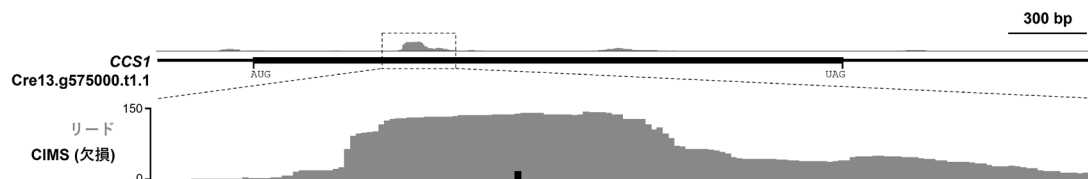


図2 AGO3 HITS-CLIP の情報解析結果例

## 出芽酵母の mRNA 転写において TFIID 依存性を 後天的に付与する分子機構の解明

古久保 哲 朗

【目的】 基本転写因子 TFIID とその類縁複合体である SAGA は、5 種類の Taf をサブユニットとして共有し、TBP のコアプロモーター結合能を制御するコア因子であるが、転写における両者の機能分担についてはまだよく分かっていない。我々は、*PGK1* プロモーターの TFIID 非依存的な転写を、塩基配列を改変することなく（エピジェネティックに）TFIID 依存的な転写へとリプログラミングすることに成功した。具体的には、TFIID 変異（温度感受性 *taf1-N568A* 変異）と SAGA 変異（*spt3Δ* 変異）を一時的に共存させ、その後 SAGA 変異を除去すること（以下、TFIID 依存性付与操作）により、*PGK1* 転写を TFIID 非依存性モードから TFIID 依存性モードへと変換できることを明らかにした（図 1）。また本現象には、リプログラミング因子と名付けた未知の相転移産物の生成と維持が重要な役割を果たす可能性を見出した。本研究では、Ccr4-Not 複合体が上記リプログラミング因子の本体である可能性について検証を行うこととした。

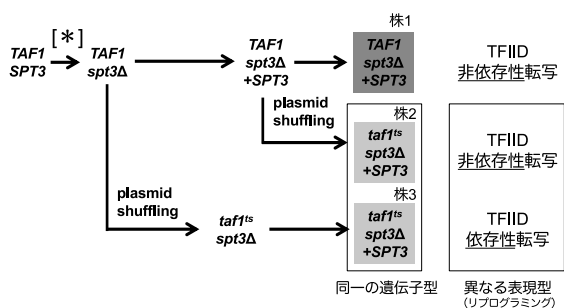


図 1 株の作製方法. 本研究では、[\*]において *ccr4Δ* or *caf1Δ* 変異を導入し（株 3\*/図 2）、その影響を調べた。

【方法】 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741/4742 由来株の作製は、定法に従い、行った。本来の *SPT3* 遺伝子を欠失後、*TDH3* プロモーターに連結した *SPT3* 遺伝子を *AUR1* 遺伝子座に挿入することにより、*spt3Δ* 変異を除去した。25°C にて培養した細胞及び 25°C から 37°C にシフト 2 時間後の細胞からホットフェノール法を用いて RNA を抽出し、RT-qPCR 法により *PGK1* mRNA の定量を行った。

【結果・考察】 Ccr4-Not 複合体は、9 種類のサブユニット（Not1-5/Ccr4/Caf1/Caf40/Caf130）から構成される巨大

な複合体であり、転写反応のみならず mRNA 分解反応や翻訳反応をも制御することが知られている。本複合体がリプログラミング因子の本体であるかを検証するべく、*ccr4Δ* or *caf1Δ* 変異の存在下において TFIID 依存性付与操作の実施を試みたが、両変異とも *taf1-N568A* 変異との二重変異株が重篤な生育不全を示したため、さらなる *spt3Δ* 変異の導入やその除去を行うことができなかった。ただし、弱いながらも生育したこれら二種類の二重変異株では *PGK1* 転写において TFIID 依存性が付与されなかったことから、リプログラミング因子の本体が機能喪失型の Ccr4-Not 複合体である可能性は低いと考えられた。

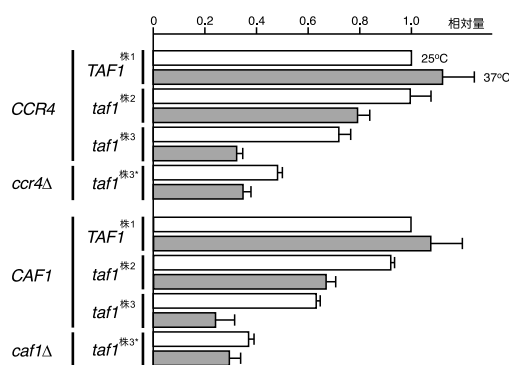


図 2 RT-qPCR 法による *PGK1* mRNA の定量結果. 25°C（白色）及び 37°C における結果（灰色）を示した。

次に、上記の問題点を解決するべく、Spt3 の C 末端にオーキシシデグロンを付加し、培地へのオーキシシ添加を介して TFIID と SAGA の同時機能喪失状態を一過的に誘導することにより、*PGK1* 転写における TFIID 依存性の付与を試みたが、やはりうまくいかなかった。そこで、*ccr4Δ* or *caf1Δ* 変異と *spt3Δ* 変異を共に有する二重変異株を最初に作製し、当該株に対して後から *taf1-N568A* 変異を導入することにより TFIID と SAGA の同時機能喪失状態を誘導し、その後 *spt3Δ* 変異を除去する操作を加えた場合に TFIID 依存性が付与されるかを調べることにした。その結果、*ccr4Δ* or *caf1Δ* 変異の存在下においてのみ、*PGK1* 転写における TFIID 依存性が有意に低下することが明らかとなった（図 2）。以上の結果は、上記リプログラミング因子の本体が、機能獲得型の Ccr4-Not 複合体である可能性を強く示唆するものと考えられる。

## マルチモーダル顕微分光で明らかにする葉圏微生物の 光エネルギー利用ポテンシャル

菅野 葉々子

**【目的】** 地球上の植物葉圏面積は、陸地面積の約4.4倍におよび、 $10^{26}$ 個もの細菌が生息していると試算されている。葉圏は太陽光にさらされることから、光エネルギーを利用しながら生活する微生物は少なくないと予想できる。実環境下での光利用率を評価するためには、微生物の光利用に直結する色素の発現状態を分析することが重要である。本研究では、自家蛍光とラマン散乱光を同時に取得可能なマルチモーダル顕微分光装置を用いて、1細胞ごとにスペクトル解析を行い、葉圏微生物群集内における色素多様性と生理状態の評価を試みた。

**【方法】** 色素の電子吸収帯付近の励起光を用いることで、蛍光および増強効果を受けたラマン散乱光（共鳴ラマン散乱光）という、色素に関する複数の分光情報を得ることができる。細胞懸濁液をガラスボトムディッシュに移し、倒立顕微鏡下で励起波長632.8nmのレーザー光を1細胞ごとに照射して、バクテリオクロロフィル（BChl）関連分子の自家蛍光スペクトルとカロテノイド（Car）の共鳴ラマンスペクトルを同時に取得した。さらに、励起光を照射し続けて光退色させ、生体分子情報に関するラマンスペクトルを取得し、生理状態の評価に用いた。

**【結果・考察】** Car保有細菌（*Sphingomonas astaxanthinifaciens*, *Micrococcus luteus*等4株）と光合成細菌（*Rhodospirillum rubrum*, *Blastochloris viridis*等7株）の共鳴ラマンスペクトルは、Car分子の共役二重結合長の長さや末端修飾の種類、細胞内Car組成の違いを反映したものとなることがわかった（図1）。光合成細菌はBChl色素を介して

光を利用する微生物である。海洋表層に広く分布し、海洋の炭素循環への重要性が指摘されているが、葉圏における生態はよくわかっていない。光合成細菌の自家蛍光スペクトルから、一般的なBChl a型、さらにこれまで技術的に検出困難とされていたBChl b型色素を持つ光合成細菌が検出可能であることがわかった。

野外植物としてシロツメクサとコツボゴケを対象に、5 $\mu$ mポアサイズシリンジフィルターを用いて、細菌サイズの葉圏微生物細胞を回収し分析した（表1）。いずれの植物サンプルにおいても、85%以上の細胞からCarピークが検出された。嫌気性光合成細菌様の強い強度の自家蛍光を持つ細胞がわずかに含まれた一方、自家蛍光強度の低い好気性光合成細菌様の細胞が頻りに検出され、モデル株との類似性から、その多くは葉圏優占種であるメチロバクテリウム属細菌と考えられた。光退色後の生体分子情報を反映したラマンスペクトルを分析したところ、核酸ピーク強度の低さや、一部の細胞から細胞内貯蔵物質ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）が検出されたことから、これらの葉圏細胞は細胞分裂があまり盛んでない定常期のような状態である可能性が考えられた。また、葉圏微生物の炭素源であるメタノールを用いて培養を行った結果、菌叢解析よりメチロバクテリウム属やスフィンゴモナス属、バクテロイデテス門細菌が検出され、これらはCarスペクトルを用いることで細胞レベルである程度判別できる可能性を見出した。

1細胞ラマン・蛍光スペクトルを用いることで、葉圏サンプルの色素多様性の違いや細胞状態を評価できることを示した。本手法を活用して生育環境や植物種による違いを追求することで、光利用微生物の生態系へのインパクトの深い理解へとつながると期待できる。

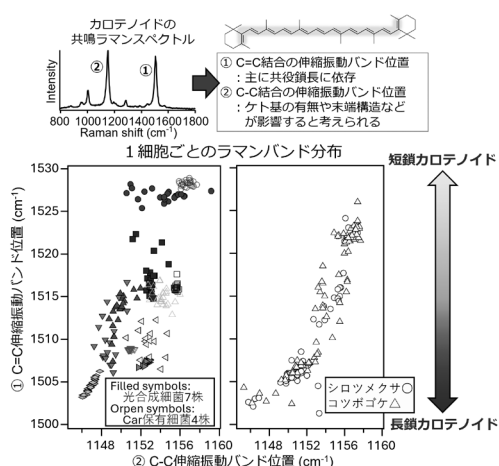


図1 細胞内カロテノイドの特徴を反映した微生物の1細胞ごとのラマンバンド分布

表1 野外植物葉圏微生物細胞より取得した1細胞ラマン・蛍光スペクトルの特徴

	シロツメクサ	コツボゴケ
総測定細胞数	100	105
カロテノイド色素 ラマンピーク検出細胞数	85	92
フレキシルピントタイプ 色素ラマンピーク	0	3
PHA様ラマンピーク	7	1
メチロバクテリウム様 自家蛍光	24	5
その他強い自家蛍光& カロテノイドピーク	6	7

## 様々なプラスミドが宿主に与える負荷の実体の解明

野尻 秀昭

**【目的】** 宿主細菌がプラスミドを保持した場合、細胞内でのプラスミドの安定性の低下や、他の細菌との競合培養条件下で宿主の割合（生残性）の低下が頻繁に起こる。これは生体内物質やエネルギーの不足（負荷）のためとされるが、原因となる代謝経路やその寄与率は明確でない。同じ長鎖DNAでも、宿主内でプラスミドごとに負荷の原因が異なる例も多く、負荷誘導機構に興味を持たれる。本研究では、負荷を与える代謝を精査し実体を解明することで負荷軽減への可能性を探る。

**【方法】** 異なる不和合性（Inc）群のpBP136（IncP-1）、pCAR1（P-7）、NAH7（P-9）の3種のプラスミドを用いた。pCAR1はカルバゾールの、NAH7はナフトレンの分解遺伝子群を載せるが、pBP136はアクセサリ領域がない。また、各プラスミドのコア領域のうち複製に必要な部分のみを含むミニプラスミドも比較対象とした。宿主としては、様々なプラスミド保持することが負荷にならない非感受性株*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4株を用いた。非感受性とは、様々なプラスミドについて、プラスミドを持つことが有利にならない非選択条件下でもプラスミドが安定で、かつ同条件下での非保持株との競合培養で保持株の割合（生残性）が低下しない性質と定義される。また、トランスポゾン変異等で得られた、安定性は変化しないものの生残性のみが低下するようになったCA10dm4株変異株も用いた。種々の組み合わせでプラスミド保持株を作成し、非保持株も対照に用いてメタボローム解析、トランスクリプトーム解析を行った。

### 【結果・考察】

まず、pCAR1を保持させたCA10dm4株とプラスミド感受性変異株の解析を行った。化合物量の変化が明確でも、酵素遺伝子の転写量変化は検出できず、メタボローム解析の有効性を示すことができた。結果として、野生型株と変異株では異なる化合物プロファイルが検出され、その差はペントースリン酸経路（図1）やアルギニン・グルタミン酸の代謝経路上の化合物で顕著だった。

ペントースリン酸経路は核酸代謝系や硫黄代謝系とも関連し、以前の研究で非感受性と硫黄代謝系の関連について示唆されていたことと合致する。野生型株では、変異株で起こる代謝の変化を修正できるため、形質としてプラスミド非感受性を示すものと考えられる。

次に、3種の完全長プラスミドとそれぞれのミニプラスミドを保持する野生型株のメタボロームを比較した。その結果、アミノ糖と糖ヌクレオチド代謝経路上や補酵

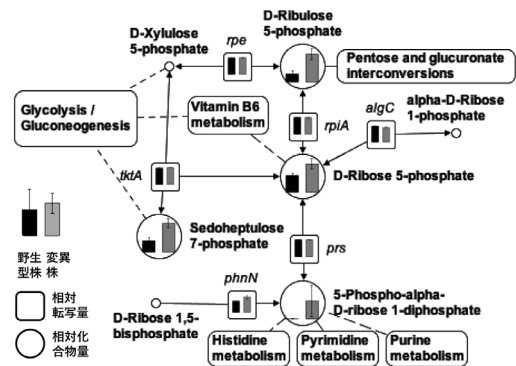


図1 ペントースリン酸経路の構成遺伝子の転写量（四角内）と化合物量（丸内）の野生型株と変異株での相対比較。各量は当該遺伝子・物質についての相対量を示す。

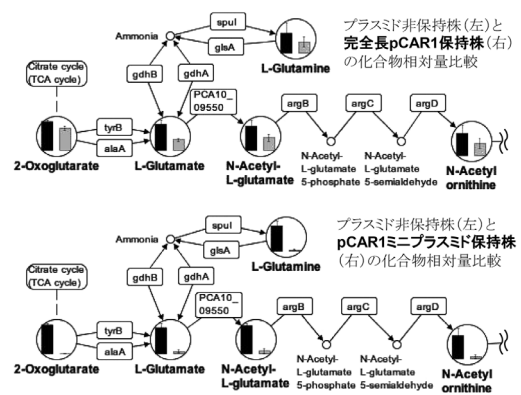


図2 プラスミドサイズによる代謝物量比較の例

素代謝経路上の化合物が3種の完全長プラスミドで非保持株より保持株で共通に減少し、この傾向はミニプラスミドでも同様だった（例を図2に示す）。これらはプラスミドの受容（複製・保持）により直接誘導される現象と考えられた。一方、完全長では核酸代謝経路上の化合物の増加が認められたが、ミニプラスミドでは増加せず、これは細胞内のDNA量の増加を反映すると考えられた。

今回の解析で、プラスミドの宿主の代謝ネットワークへの影響を明瞭に捉えることに成功した。特に、プラスミドの存在そのものによる影響と、DNA量の増加による影響を区別して検出できた。今後フラックス解析などを行うことで、非感受性を含め、外来DNAへの細胞応答の全貌に迫れるものと期待できる。



## *Bacillus subtilis* の膜変形を伴う膜小胞と洞穴の形成機構の解明

橋本 渉

【目的】納豆菌 (*Bacillus subtilis*) は、蒸し大豆 (枯死体) 表面に生育する腐生作用により納豆を生成する。一方、蒸し大豆上での納豆菌の細胞形態について、不明な点が多い。これまでに、我々は納豆菌の腐生機構に焦点を当て、納豆菌と大豆との間のせめぎ合いについて明らかにしてきた。その過程で、蒸し大豆上で生育する納豆菌が増殖期に細胞表層に膜小胞を、定常期に細胞の極に大きな洞穴を形成することを見いだした。膜小胞と洞穴の形成は、枯草菌 (*B. subtilis* 168株) にも認められる。本研究では、*B. subtilis* における膜変形を伴う膜小胞と洞穴の形成機構を明らかにすることを目指した。

【方法】*B. subtilis* 168株の細胞表層構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) により解析した。蒸し大豆上での生菌数を以下の通り測定した。大豆上で生育した枯草菌を生理食塩水にボルテックス操作により回収し、その懸濁液を寒天培地に塗布して形成されるコロニー数を計測した。また、懸濁後の大豆に接着した細胞については、大豆を液体培地で培養し、その光学密度 ( $OD_{600}$ ) を測定した。

【結果・考察】納豆菌を蒸し大豆とLB寒天培地の双方で生育させ、それぞれの細胞表層構造をSEMで観察した。その結果、蒸し大豆上で生育した納豆菌の細胞表層とその周辺には膜小胞が多数認められた。一方、LB寒天培地上では膜小胞が観察されなかった。したがって、納豆菌が蒸し大豆に特異的に応答して膜小胞を細胞表層に形成・分泌する機構の存在が示唆された。

ナショナルバイオリソースプロジェクトより分譲された枯草菌一遺伝子破壊株の細胞表層構造をSEMで解析することにより、芽胞形成をはじめ多数の遺伝子発現を調節するマスターレギュレーターが洞穴形成に関わることを見いだしている。一方、芽胞形成に直接関わる遺伝子破壊株では洞穴形成が認められるため、洞穴は芽胞非依存的な膜変形機構であることが示唆された。なお、洞穴形成細胞は死細胞の様相 (アポトーシス) を示す。枯草菌の細胞表層には分厚いペプチドグリカン (PG) 層が存在する。そこで、PG層に作用する分子を対象に、それらの一遺伝子破壊株の細胞表層構造を解析したところ、PG分解に機能するエンドペプチダーゼの遺伝子破壊株において、野生株と比較すると洞穴形成が顕著に低下していた (図1)。本酵素は細胞伸長の際に細胞壁分解に機能するオートリシンであることが示されているため、エンドペプチダーゼによる細胞壁の分解が洞穴形成

に必要であることが明らかになった。遺伝子組換え大腸菌より発現精製した本酵素を抗原とし、抗エンドペプチダーゼ抗体を作製した。この抗体を用いて、現在、本酵素の細胞局在性を調べている。

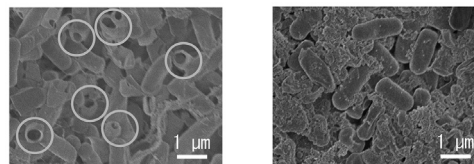


図1 枯草菌の細胞表層構造 [左: 野生株 (丸印: 洞穴), 右: エンドペプチダーゼ遺伝子破壊株]

これまでに、洞穴形成欠損株は、野生株と比較して、蒸し大豆上での生菌数を著しく低下させること (1%以下) を見いだしている。エンドペプチダーゼ遺伝子破壊による洞穴形成欠損株についても、蒸し大豆上の生菌数を測定した。生理食塩水に回収される生菌数に関しては、野生株と洞穴形成欠損株の間に顕著な相違は認められなかった。一方、回収後に大豆上に接着していた生菌数を調べたところ、洞穴形成後の野生株では速やかに増殖を示す光学密度が上昇するのに対し、洞穴形成欠損株では顕著な生育遅延が認められた (図2右)。なお、洞穴形成前の段階では、両株の間に生育に有意差はなかった (図2左)。このことから、枯草菌は、エンドペプチダーゼが関わる洞穴形成により生細胞の大豆上での接着を高め、大豆上での生菌数を維持することが明らかになった。

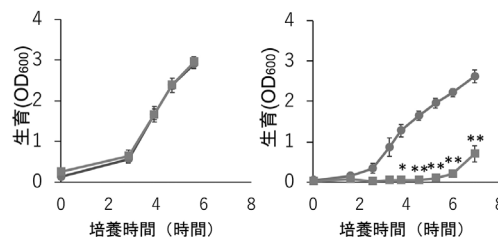


図2 蒸し大豆に接着する枯草菌の生育 [左: 洞穴形成前, 右: 洞穴形成後 (●野生株, ■エンドペプチダーゼ遺伝子破壊株) mean ± SE (n=3) \*\* $p < 0.01$  \* $p < 0.05$ ]

以上のことから、オートリシンであるエンドペプチダーゼの作用により形成される洞穴は、アポトーシスを惹起し、細胞群集の中で生細胞を維持する *B. subtilis* の特異な生存戦略であると考えられる。

## 麹菌における転写因子の分解を介した分生子形成制御機構の解明

田中 瑞己

【目的】細胞内におけるタンパク質の安定性はN末端のアミノ酸に依存し、この機構はN-end ruleと呼ばれる。麹菌においてN-end ruleを制御するユビキチンリガーゼ(UbrA)を破壊すると、無性胞子である分生子の形成が促進されるが、その分子機構は明らかになっていない。ubrAが欠損した株では、分生子形成の制御において中心的な役割を担う転写因子であるBrlAのC末端断片が蓄積したことから、N-end ruleが関与する転写因子の分解を介した新たな分生子形成制御機構の存在が考えられた。本研究では、UbrAによる麹菌の形態分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるN-end ruleを調べるため、ユビキチン融合GFPを用いてN末端アミノ酸を20種のアミノ酸それぞれとしたGFPを発現させ、抗-GFP抗体を用いたwestern blottingによって検出した。次に、ubrA破壊による形態分化への影響を調べるため、寒天培地における菌糸の形態と分生子からの菌糸の発芽時間を顕微鏡観察によって調べた。また、ubrA破壊によるbrlAやその制御下遺伝子、形態分化制御に関与するGタンパク質制御因子(RGS)の転写発現への影響を調べた。さらに、C末端にタグを融合したBrlA翻訳産物をwestern blottingによって調べた。

【結果・考察】コントロール株において、N末端アミノ酸が各種アミノ酸であるGFPを発現させた結果、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、トリプトファン、ヒスチジン、フェニルアラニン、リジン、チロシン、プロリンがN末端のGFPは著しく量が減少した。プロリンがN末端のGFP以外はubrA破壊株で量が増加したことから、これらはUbrA依存的に分解されていることが示唆された。

菌糸の形態を観察した結果、ubrA破壊株ではコントロール株よりも気中菌糸の伸長が抑制された。さらに、分生子からの菌糸の発芽を経時的に調べた結果、コントロール株がほとんど発芽していない4時間後において、ubrA破壊株では約30%の分生子が発芽していた。これらの結果から、ubrAの破壊は分生子形成だけでなく、発芽や菌糸成長にも影響を与えることが明らかになった。

brlAやその制御下で分生子形成に関わるabaAとwetAの発現量を調べた結果、いずれもubrAの破壊によって著しく増加した(図1)。また、BrlAの上流で分生子形成を負に制御することが報告されているrgsDの発現量

を調べた結果、ubrAの破壊によって発現量が著しく減少した(図1)。これらの結果から、ubrA破壊による分生子形成の促進はbrlAとその下流遺伝子の転写量増加によって引き起こされ、この発現量増加にはrgsDの発現量低下が関与している可能性が示唆された。

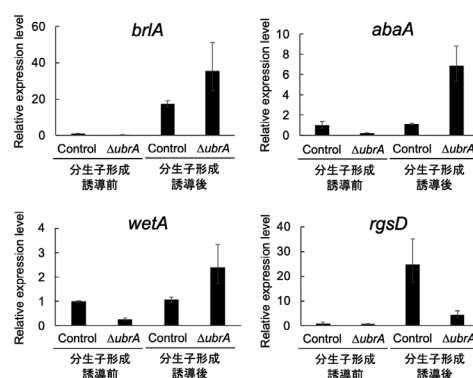


図1 形態分化の制御に関連する因子の遺伝子発現量

C末端にタグを融合したBrlAを強制発現させてwestern blottingで検出した結果、分生子形成誘導前には推定質量である50kDaよりも大きい70kDa付近に強くバンドが検出された。分生子形成誘導後には、このバンドが著しく減少し、27kDa付近に最も強くバンドが検出された(図2)。このことから、BrlAは分生子を形成しない環境では翻訳後修飾を受けた状態で主に存在しており、分生子形成誘導条件になるとプロセッシングを受けることが示唆された。ubrAを破壊すると27kDa付近のバンドの量が増加したことから(図2)、このC末端領域の蓄積が分生子形成の促進に関与する可能性が示された。

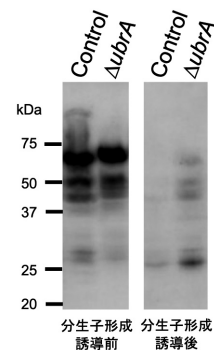


図2 C末端タグ融合BrlAのwestern blotting

## ミトコンドリア代謝酵素前駆体の誤局在によって誘導される 異所性代謝ストレスの解析

中 務 邦 雄

**【目的】** ミトコンドリアタンパク質の多くはサイトゾルで前駆体として合成された後、プレ配列と呼ばれる標的化シグナルを介して膜透過装置を通過し、ミトコンドリア内に取り込まれる。この取り込み過程はインポート反応と呼ばれている。しかし、老化や活性酸素の蓄積、代謝異常などにより、インポート効率が低下することが分かってきた。神経変性疾患に関わるタンパク質凝集体が膜透過装置に結合することによっても、インポート反応は阻害される。インポート反応が阻害されると、前駆体がミトコンドリア外に蓄積する。蓄積した前駆体はユビキチン・プロテアソーム系によって分解されるが、分解に関わる因子と、過剰な蓄積が細胞に与える影響については不明な点が多い。

本研究ではクエン酸合成酵素および他のTCA回路酵素に注目し、インポート阻害によりサイトゾルに蓄積した前駆体の挙動を解析した。

**【方法】** 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, BY4741株, W303-1a株など) を用いた。前駆体は、細胞へのCCCp添加、*tom40-97*温度感受性変異株、および*b2-DHFR*過剰発現による競合阻害により蓄積させた。タンパク質の安定性はシクロヘキシミドチェイス法により解析した。細胞内の代謝状態はメタボローム解析により調べ、代謝異常に対する細胞応答はトランスクリプトーム解析により調べた。リボソームによる翻訳活性はポリソーム解析およびピューロマイシンの取り込み反応により解析した。

**【結果・考察】** 最初に、プレ配列を欠損させたクエン酸合成酵素の安定性を解析したところ、ユビキチンリガーゼSCF<sup>Ucc1</sup>複合体によりユビキチン化され、プロテアソームを介して分解されることが分かった。次に、SCF<sup>Ucc1</sup>複合体による基質の認識機構を調べるために、基質認識を担うFボックスタンパク質Ucc1とクエン酸合成酵素のX線結晶解析を行った。その結果、一般的なFボックスタンパク質がリン酸化ペプチドを認識するのに対して、Ucc1はクエン酸合成酵素が活性型の三次構造形成して生じた分子表面を認識するという極めてユニークな特徴をもつことが明らかになった(図1)。

インポート阻害によって蓄積したプレ配列付きクエン酸合成酵素前駆体も、SCF<sup>Ucc1</sup>複合体を介してプロテアソームにより分解された。このことから、前駆体であってもインポート阻害時に活性型の立体構造をとる可能性が示唆された。さらに、クエン酸合成酵素がサイトゾルに過剰に蓄積すると、凝集体形成を伴わずとも細胞増殖が著しく阻害された。その原因は、ミトコンドリア外で

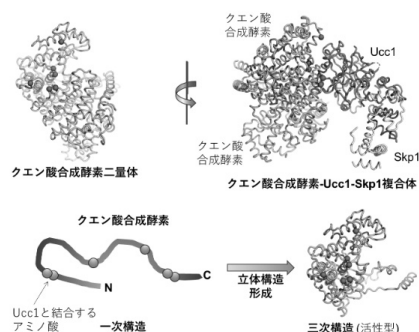


図1 Ucc1によるクエン酸合成酵素の認識機構

異所的にクエン酸が合成されることにより代謝恒常性が攪乱されるためであった。この現象を、我々は「異所性代謝ストレス」と呼ぶことにした。細胞はこれに対抗するため、翻訳抑制を含む防御応答を誘導することも明らかとなった(図2)。

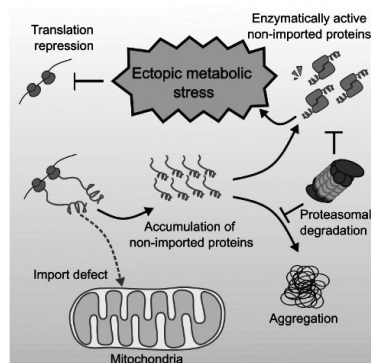


図2 本研究で提唱した異所性代謝ストレスのモデル (Nishio *et al.*, 2023より引用)

以上の結果から、インポート阻害によりミトコンドリア外に蓄積した代謝酵素は、凝集体形成を介して細胞障害を引き起こすだけでなく、異所的な代謝活性を通じて代謝恒常性そのものを破綻させることで、細胞障害を引き起こしうることが示された (Nishio *et al.*, *Science Advances* 2023)。現在、他のTCA回路酵素についても、前駆体が特異的なユビキチンリガーゼを介して分解されることを見出しており、ミトコンドリア外に蓄積した前駆体が酵素活性を発現する可能性について、遺伝学的な解析を進めている。

## 酵母におけるリボフラビン代謝中間体依存的なメチルグリオキサル耐性機構

那須野 亮

**【目的】** 解糖系の副生成物であるメチルグリオキサル (MGO) は、タンパク質などの糖化修飾 (AGEs) を引き起こし、細胞毒性を示す。筆者らはこれまでに、リボフラビン合成酵素 GTP cyclohydrolase II (GCH2) が生成する 2,5-diamino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)-pyrimidin-4(3H)-one (DARP) が、アルデヒド類と非酵素的に反応することを見出した。本研究では、DARPと MGO が非酵素的に反応すると仮説を立て、これを検証するとともに、酵母を用いてその生理機能を解析した。

**【方法】** MGOとウシ血清アルブミン (BSA) を反応させ、抗AGEs抗体を用いたウェスタン解析により、AGEs生成を評価した。この時、DARPのピリミジン部位に相当する 2,4,5-triamino-1H-pyrimidin-6-one (TAPO) を共存させ、DARPによるAGEs生成抑制効果を検証した。続いて、大腸菌を用いた組換え酵素として酵母GCH2を精製し、酵素反応により調製したDARPをMGOと反応させ、LC/MS/MSにより反応生成物を同定した。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741株のGCH2遺伝子 (*RIB1*) 過剰発現・欠損株を用いて、GCH2がMGO耐性に及ぼす影響を評価した。本解析には、既知のMGO耐性遺伝子である *GLO1* を欠損した株を親株として用いた。さらに、MGOが生成しやすいと予想される高濃度グルコース条件下におけるGCH2の機能を解析するため、通常濃度 (2%) と高濃度 (20%) のグルコースを用いて、野生型株と *RIB1* 欠損株の生育を評価した。

**【結果・考察】** MGOによるタンパク質のAGEs生成がDARPによって抑制されるか、BSAをモデルタンパク質として用いて解析した。BSAをMGOと反応させると、BSAのAGEs修飾が引き起こされたが、この現象はDARPの誘導体であるTAPOを、MGOと等量共存させることにより、完全に抑制された。このことから、DARPがMGOによるAGEs修飾を抑制することが示唆された。続いて、DARPとMGOが非酵素的に反応するか検証した。両者の反応生成物は、化学構造や既知の化合物の反応との類似性から、7-メチルプテリン (7mPt) と推定された。DARPとMGOの反応液からは、明確な7mPtのピークが検出された (図1)。このことから、DARPがMGOと反応しこれを消去することが明らかになった。

DARPによるMGO消去の生理機能を解析するため、酵母 *S. cerevisiae* のMGO耐性を評価した。その結果、GCH2をコードする *RIB1* 遺伝子を欠損させることによ

り、酵母のMGO耐性は低下した。一方、既知のMGO耐性遺伝子である *GLO1* の欠損株は、MGOに対して感受性を示したが、これは *RIB1* の過剰発現によって、相補された。以上のことから、GCH2が酵母のMGO耐性に寄与することが明らかになった。MGOは解糖系の副生成物であり、高濃度グルコースはMGO生成を誘導する。そこで、高濃度グルコース条件下におけるGCH2の機能を解析するため、異なるグルコース濃度において、野生型株と *RIB1* 欠損株の生育を評価した。通常濃度のグルコース条件下においては両株とも同程度の倍加時間を示した。一方、野生型株は高濃度グルコース条件下においても通常濃度のグルコース条件と同程度の倍加時間を示したのに対し、*RIB1* 欠損株の倍加時間は高濃度グルコース条件下において有意に延長された。このことから、GCH2が高濃度グルコースにおける良好な生育に寄与することが明らかになった。

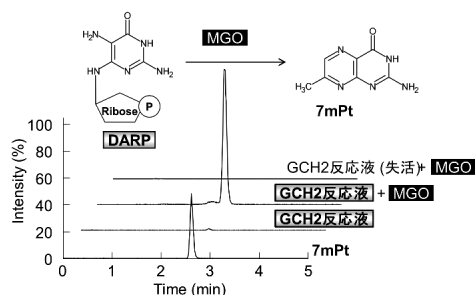


図1 DARPの非酵素的反応によるMGOの消去

以上のことから、次のようなモデルを提唱した (図2)。酵母 *S. cerevisiae* が高濃度グルコース条件下で生育する時、解糖系の副生成物MGOにより生育が阻害されるが、GCH2によって合成されるDARPがMGOを消去し、タンパク質のAGEs修飾を抑制することで、良好な生育が維持される。GCH2は多様な微生物に保存されているため、同様の機構が他の微生物種でも機能している可能性がある。

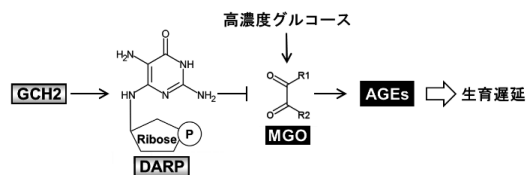


図2 GCH2/DARP依存的なMGO耐性/高濃度グルコース適応機構

## クロストリジウム属の葉酸合成におけるミッシングエンザイムの同定

佐藤 喬章

【目的】 ヒトの腸内には1,000種類以上、約100兆個もの細菌が生息しており、それらがバランスを保ちながら細菌叢を形成している。腸内細菌叢はヒトが合成できない葉酸などの補酵素の生産、ヒトが消化できなかった未消化物の分解、病原性細菌の増殖抑制など、臓器の一つに例えられるほど重要な働きを担っている。一方、加齢や抗生物質投与などによって細菌叢が変化することが知られており、悪玉菌が増加しすぎるなどそのバランスが崩れる（ディスバイオシス）ことが原因でヒトの健康が損なわれる可能性が指摘されている。これまでに細菌の種類を調べる菌叢解析は盛んに行われてきているが、個々の腸内細菌の代謝には未解明な部分が多く残されている。また、悪玉菌特異的な酵素や代謝系があり、その阻害剤が開発できれば悪玉菌特異的な増殖抑制が可能ではないかと考え、腸内細菌の代謝研究を進めている。

葉酸の誘導体はアミノ酸や核酸塩基を生合成するのに用いられる重要な補酵素であるが、多くの細菌では葉酸生合成経路における7,8-ジヒドロネオプテリントリリン酸（DHNTp）から7,8-ジヒドロネオプテリンモノリン酸（DHNMP）を生成するステップを触媒するDHNTpピロホスホヒドロラーゼ（FolQ）がミッシングエンザイムとなっていた。そのような中、*Lactococcus lactis* および *Escherichia coli* においてそれぞれ相同性をほとんど示さないFolQが同定された（FolQ1およびFolQ2とする）。さらに、申請者らは乳酸菌 *Limosilactobacillus*

*reuteri* においてアミノ酸配列も予測立体構造も新規なFolQ3を同定した（図1★）。しかし、クロストリジウム属の細菌を含め幾つかの細菌ではいずれの相同遺伝子もなく、未同定のみである（図1☆）。そこで本研究ではクロストリジウム属におけるFolQ酵素の同定を目的とした。

【方法】 *Clostridium perfringens* のゲノム上における遺伝子配置などを参考にfolQ候補遺伝子を探索し、2つの候補（folQ4-c1, folQ4-c2）を見出した。候補遺伝子を大腸菌で発現させ、発現産物を各種カラムにより精製し、精製組換え型タンパク質を得た。各精製組換え型タンパク質の反応産物をHPLCにより解析し、DHNMPの生成量を定量して活性を評価した。

【結果・考察】 FolQ4-c1 および FolQ4-c2 の精製組換え型タンパク質を反応系に添加して反応を行い、反応産物をHPLCにより解析した。どちらのタンパク質を添加した際も、DHNMPの標準物質とほぼ同じ溶出時間にピークが検出されたが、FolQ4-c1を添加した際に、より大きなピークが検出された。同一条件で反応させた結果、FolQ4-c2による生成物は検出されなかった一方で、FolQ4-c1によって生成した反応産物は検出された（図2）。これらのことから、クロストリジウムにおけるFolQの有力候補としてFolQ4-c1を同定することができた。しかし、比活性を算出したところ、一桁  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  のオーダーであり、既知のFolQ3の比活性（ $28 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ）と比較すると、酵素活性としてはかなり低いことが明らかとなった。何らかの活性化因子が存在する可能性を考え、葉酸生合成経路の中間体などを反応系に添加したが、反応生成物量に大きな差は見られなかった。今後は、予測立体構造から結合し得る化合物の知見を得るなどしながら、活性化因子のさらなる探索を目指す。また並行して、培養が容易なクロストリジウム属の無細胞抽出液からの目的活性を示す酵素と結合化合物の精製および同定を進める。

	folEBKP	Ll-folQ1	Ec-folQ2	Lr-folQ3
<i>Bacillus</i>				
<i>Streptococcus pyogenes</i>				
<i>Lactococcus lactis</i>		Ll-folQ1		
<i>Lactococcus piscium</i>				
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>				
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
★ <i>Limosilactobacillus reuteri</i>				Lr-folQ3
<i>Lactobacillus buchneri</i>				
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
☆ <i>Clostridium</i>				
<i>Cutibacterium acnes</i>				
<i>Oenococcus oeni</i>				
<i>Pediococcus clausenii</i>				
<i>Lactobacillus sakei</i>				
<i>Enterobacter cloacae</i>				
<i>Leuconostoc citreum</i>				
<i>Enterococcus gilvus</i>				
<i>Weissella cibaria</i>				
<i>Escherichia coli</i>			Ec-folQ2	
<i>Salmonella enterica</i>				
<i>Bifidobacterium longum</i>				
<i>Bacteroides fragilis</i>				

図1 様々なバクテリアにおけるfolQ遺伝子の分布

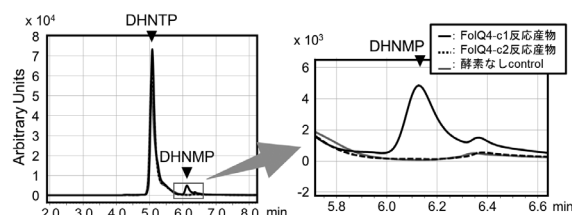


図2 HPLCによる反応産物解析

## *Ruminococcus gnavus* の腸管定着機構の遺伝的解析

尾花 望

【目的】 ヒトの腸内微生物叢は宿主の健康維持や疾患の調節に重要な役割を果たす。腸内環境の乱れ（ディスバイオーシス）は、炎症性腸疾患（クローン病や潰瘍性大腸炎）など多様な疾患と関連する。オミクス解析の飛躍的進歩は、疾患と関連する腸内細菌叢のパターンを解明してきたが、特定の細菌の遺伝子が宿主の病態生理に及ぼす因果関係には依然として不明な点が多い。これは腸内細菌の多くは非モデル細菌であり、遺伝的ツールの利用が限定されていることに起因する。本研究では炎症性腸疾患やアレルギーと相関するヒト腸内常在腸内細菌 *Ruminococcus gnavus* の遺伝学的ツールを開発し、これを利用することで、本菌の腸管定着や疾患調節に関連する遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】 *R. gnavus* NBRC114413 株が有するプラスミド配列より、複製開始点を含む配列をPCRで増幅し、*E. coli*-*Clostridium* ショットルベクター pMTL83151 と組み合わせ、*E. coli*-*R. gnavus* ショットルベクターを作製した。接合伝達法により *R. gnavus* JCM 6515 株にプラスミドを導入した。遺伝子破壊および欠失には Clostron システムまたは CRISPR-Cas9 を用いた。莢膜の生産性は、墨汁染色、SDS-PAGE および透過型電子顕微鏡観察によって評価した。野生株と破壊株を同量混合し、無菌マウス (BALB/c, 8-13 週齢) に投与した後、便中の各株の存在比率を算出した。また、*R. gnavus* 単独定着マウスにデキストラン硫酸ナトリウムを投与して大腸炎を誘発し、体重減少、下痢、血便から算出した DAI スコア (Disease activity index) によって炎症の程度を評価した。

【結果・考察】 ソルターゼはタンパク質を細胞壁に固定化する酵素であり、様々な細菌において宿主免疫認識や定着に関連することが知られている。*R. gnavus* JCM 6515 は 8 つの推定ソルターゼ遺伝子を有しており、本研究で開発した遺伝子改変ツールを用いて、そのうち 6 つの遺伝子 (*srtA1* と *srtB1-5*) の破壊株の作製に成功した。作製した変異株のうち、*srtB4* 破壊株では莢膜生産性が失われていた (図 1)。各破壊株を野生株と無菌マウス腸管に共定着させ、経時的に便中の野生株:破壊株の割合を測定したところ、*srtB4* 破壊株は腸管定着 1 週間後には存在量が劇的に減少し、2 週間後には検出限界以下まで減少した (図 2)。以上のことより、*srtB4* は莢膜合成に必須の遺伝子であるとともに、腸管定着にお

ける野生株との競合に必要なことが示された。*srtB4* 遺伝子座の周辺には糖転移酵素や LCP ファミリー酵素など莢膜産生に関与する遺伝子群が存在していた。これらの遺伝子破壊株においても莢膜生産性が失われたことから、*srtB4* を含む遺伝子クラスターが莢膜合成を担うことが明らかとなった。

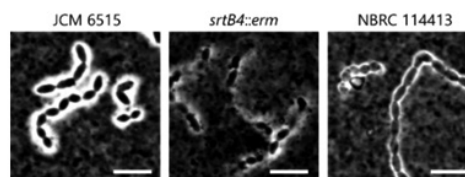


図 1 墨汁染色による莢膜生産の観察。Bar=5μm

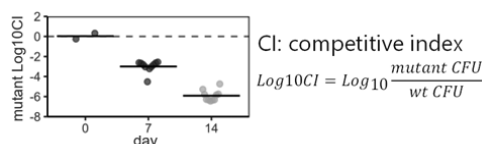


図 2 野生株と *srtB4* 破壊株のマウス腸管競合定着試験。

莢膜は宿主免疫細胞による認識を妨げることが報告されていることから、莢膜産生が宿主免疫および炎症応答に与える影響を解析した。*R. gnavus* 単独定着マウスの大腸炎モデル試験の結果、野生株と比較して、*srtB4* 破壊株単独定着マウスでは DAI スコアが有意に増加した。以上の結果より、*srtB4* 遺伝子の破壊とそれに伴う莢膜生産の欠如は、腸管への定着には不利である一方、腸炎の悪化を引き起こすことが示唆された。

健康者およびクローン病由来の *R. gnavus* 単離株のゲノム解析の結果より、*srtB4* クラスター保有頻度は健康者株で 0.69 に対して、クローン病株では 0.21 と低かった。*srtB4* と莢膜産生との関連性を確認するため、*srtB4* を欠く NBRC 114413 株を培養したところ、本株は厚い莢膜を生産しなかった (図 1)。これらの結果は、莢膜生産性が低く炎症誘導性の高い *R. gnavus* 株がクローン病患者の腸管に頻繁に定着していることを示唆している。

本研究の結果より、腸内細菌の腸内定着や病原性に関与する遺伝的要因を同定するためには、オミクス解析のみならず、個々の腸内細菌に適応した遺伝子改変システムが重要であることが示された。

## シアノバクテリアに内在する新たな DNA 複製開始機構の解明

大林 龍胆

**【目的】** ゲノム複製はすべての生物に不可欠な生命現象であり、その開始機構は種を超えて厳密に制御されている。細菌では DnaA と呼ばれる複製開始因子が複製起点 (*oriC*) に結合し、二本鎖 DNA の局所的な開裂とヘリカーゼのリクルートを促すことで複製開始を誘導する。*dnaA* 遺伝子はほぼ全ての細菌に保存されており、そのため DnaA 依存的な複製開始機構は「細菌の共通祖先」で獲得し、細菌に普遍的な複製開始機構であると信じられてきた。しかし近年、共生細菌や、真核生物のオルガネラ (葉緑体、ミトコンドリア) のゲノムでは、*dnaA* 遺伝子が失われている例が多数見つかっており、DnaA に依存しない複製開始機構の存在が強く示唆されている。さらに葉緑体の祖先生物である一部のシアノバクテリアも DnaA 非依存的に複製していることが示された。これは「ゲノム複製開始」という生命の根幹機構が進化によって変化し得ることを示すものであり、分子進化や細胞機能の理解において重要な問題である。本研究では、我々が見出した DnaA 非依存型のシアノバクテリアをモデルに、DnaA に依存しない複製開始機構を担う因子の同定と、その分子基盤の解明を目指した。

**【方法】** まず、DnaA 非依存的に複製する *Synechocystis* sp. PCC 6803 において、複製開始に関与する新規因子を遺伝学的にスクリーニングするため、既知の複製開始過程に関わる因子の一つである *dciA* に注目した。*DciA* はヘリカーゼを複製起点にリクルートするローダーの役割を持つが、複製開始後の伸長には直接関与しないため、*dciA* をターゲットとすることで、開始段階に特異的な因子をスクリーニングできると考えた。*dciA* 遺伝子にランダム変異を導入し、得られた変異体の中から高温条件下で生育が阻害される温度感受性 (TS) 株を選抜した。次に、各 TS 株から高温下でも生育できる抑圧変異株 (サプレッサー株) を単離し、全ゲノムシーケンス解析により変異部位を網羅的に同定した。得られた変異情報から遺伝子を同定し、AlphaFold2 による構造予測解析を行い、相互作用の可能性を検討した。

**【結果・考察】** *dciA* に変異を導入した結果、複数の TS 株を取得することに成功し、すべての株で高温下における生育停止が確認された (図 1)。まず、この TS 株において、DNA 複製への影響を検証するため、フローサイトメータによる解析を行った。その結果、特に W108A 変異株は、1 細胞あたり通常よりも著しく高い DNA 含

量を示し (図 2)、このことから過剰な複製が起こるなどの複製開始制御異常の存在が示唆された。これは、*DciA* の特定部位の変異により、複製起点の制御に異常が生じた可能性を示している。

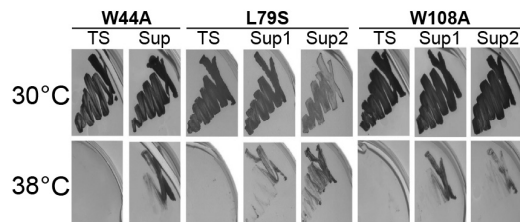


図 1 温度感受性変異株とサプレッサー株のプレート培養

次に全ての TS 株から単離した抑圧変異株を解析した結果、すべてのサプレッサーにおいて単独の変異を検出することができた。この中でも特に、W108A 由来の二つの独立した抑圧変異株 (Sup1, Sup2) に共通して、*gene X* (unpublished) という機能未知遺伝子に変異が存在することが明らかになった。この遺伝子はこれまで DNA 複製との関連が知られていなかったが、AlphaFold による構造予測解析により、*DciA* と *Gene X* の物理的相互作用が予測され、複製開始過程への関与が強く示唆された (図 2)。さらに、W108A 変異によって *DciA* の構造が変化し、明らかに *Gene X* との相互作用の構造も変化する可能性が示唆された (図 2)。この結果より、*Gene X* は直接的に *DciA* の機能を調節している可能性が示唆される。

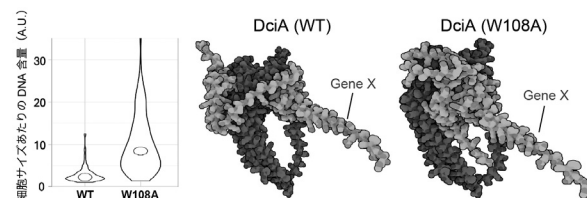


図 2 TS 株の表現型と抑圧因子との相互作用

以上の成果により、DnaA 非依存型複製開始機構の分子基盤に迫る手がかりが得られた。今後は、具体的な分子機能解析を通じて、DnaA 非依存的複製開始の全体像解明を目指す予定である。また、こうした新規因子の同定は、オルガネラゲノムの複製機構の理解や、細胞内共生過程におけるゲノム維持戦略の解明にもつながると期待される。

## 細胞と核のサイズ連動性を制御する膜供給メカニズムの解析

久米 一規

【目的】真核生物の核サイズは、細胞サイズと連動して厳密に制御される（図1A）。核サイズの異常は、がん細胞や老化細胞でみられ、細胞機能の異常を引き起こすことが示唆されており、核サイズ研究は重要な研究課題である。しかし、20世紀初頭に核サイズ制御についての最初の論文が報告されて以降、当該制御の実体はいまだに謎に包まれている。著者はこれまでに、分裂酵母を用いて、核サイズの制御に重要な遺伝子群の同定に成功した。そしてその解析から、核サイズ制御の新規モデルを提唱した。その詳細は、進化的に保存された核膜タンパク質 Lem2 と小胞体膜タンパク質 Lnp1 が、小胞体から核への膜供給量を制御することにより、適切な核サイズを維持できるというモデルである（図1B）。本研究では、Lem2 と Lnp1 がいかにして小胞体から核への膜供給量を調節して適切な核サイズを制御しているのか、その分子機構の解明を目指した。

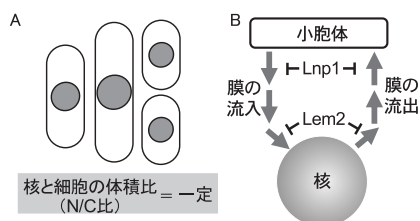


図1 核と細胞の体積比 (N/C比) (A) と Lem2 および Lnp1 による小胞体と核の間の膜輸送の制御 (B)

【方法】本研究では、*Schizosaccharomyces pombe* L972 株を親株とした分裂酵母を使用した。核サイズの評価には、核の体積を細胞の体積で割った値（以下 N/C 比）を用いた。核および細胞の体積は、核膜孔タンパク質 Cut11 に蛍光タンパク質を融合した細胞株の蛍光画像と明視野の画像を用いて算出した。Lem2 や Lnp1 の細胞内局在には、各タンパク質に蛍光タンパク質を融合した細胞株を構築して観察した。さらに、Lem2 もしくは Lnp1 の発現量を変化させる方法として、プロモーター部分の改変や各遺伝子のコピー数を変化させた。また、Lem2 や Lnp1 の細胞内局在を変化させる方法として、Lem2 の核膜上の局在を 1 点に集積させる *bqt4* 欠損株や GBP (GFP 結合タンパク質)-GFP システム (核膜や小胞体膜に局在するタンパク質に GBP を連結し、Lem2 もしくは

Lnp1 に GFP を連結することで、Lem2 や Lnp1 の局在を変化させる) を用いた。Lem2 と機能関連する因子の探索には、各遺伝子の変異株に加え、過剰発現株を用いた。【結果・考察】Lem2 や Lnp1 の過剰発現株が示す表現型 (核膜成長の阻害により N/C 比を減少させる) に注目して解析を行った。Lem2 もしくは Lnp1 について、N/C 比を減少させる条件を見つけるために、各遺伝子の発現量や各タンパク質の局在を変化させた細胞株を構築して、N/C 比への影響を調べた。その結果、Lem2 については、発現量を変化させずに核膜上での局在を核膜全体から 1 点に集積させただけで、核膜成長を阻害し、N/C 比が減少した (図2)。Lnp1 については、Lem2 ほどの核膜成長の阻害効果は示さなかったが、小胞体での局在変化が、核膜成長を阻害して N/C 比を減少させた。Lem2 の局在変化による核膜成長の阻害効果は、Lem2 や Lnp1 の過剰発現によるものとほぼ同程度であったことから、Lem2 の核膜上での局在制御が核への膜供給量を調節して適切な核サイズを制御するうえで重要であることが示唆された。

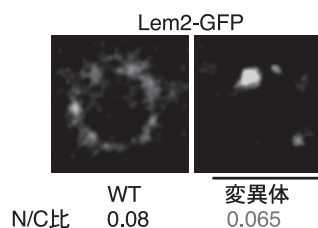


図2 WT と *bqt4* 欠損株での Lem2 の局在 (核膜部分の画像) と N/C 比。スケールバーは 5  $\mu$ m。

Lem2 の局在制御を介した核サイズ制御機構の全体像をとらえるために、Lem2 と相互作用する因子や機能関連する因子について遺伝学的解析を実施した。その結果、Lem2 の局在に影響を及ぼす因子を複数選抜することに成功した。中でも、ホスファチジルコリンの合成に関わる Cho2 を含む構造リン脂質の代謝に関わる遺伝子群が関わるということがわかった。本研究により、核膜タンパク質 Lem2 を介した小胞体から核への膜輸送の調節による核サイズ制御機構の一端が明らかになった。Lem2 の局在制御には脂質代謝の変化が関わるということが示唆され、当該機構の全容解明につながる重要な知見が得られた。



## 新規作用機序を有する抗菌薬の開発 — 透過性促進薬の開発に向けた基礎的研究 —

永野 恵 司

【目的】 *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) は、抗菌薬に対して高い自然耐性を示すことが知られ、その要因の一つとして外膜の低い透過性が挙げられる。外膜透過性を向上させることで、既存の抗菌薬の効果を高める可能性がある。本研究では、ランダム変異導入法を用いて、外膜透過性に関与する遺伝子を網羅的に探索した。

【方法】 緑膿菌 PAO1 株由来のラフィノース代謝酵素導入株 (親株) に対し、トランスポゾン (pUT-mini-Tn5) を用いてランダムに変異を導入した。外膜透過性が亢進した変異体を選別するため、ラフィノース (三糖) を唯一の炭素源とする最小発育培地においてケモスタット培養を行った。選別された変異株を、グルコース (単糖)、ラフィノース、およびスタキオース (四糖) を唯一の炭素源とする最小発育培地で培養し、増殖曲線を作成した。また、各種抗菌薬 (ペニシリン G、アンピシリン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、クロラムフェニコール、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。変異導入箇所を、PCR 法および塩基配列決定法で特定した。

【結果・考察】 ケモスタット培養では、培地交換速度を5段階に分けて徐々に上昇させ、増殖速度の速いクローンを選別した (図1)。

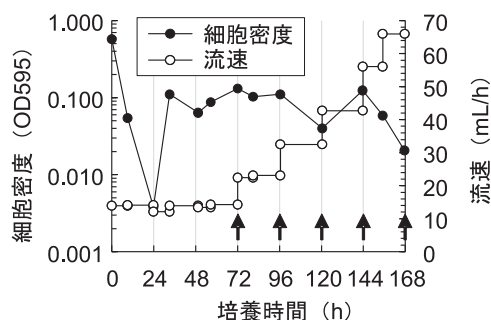


図1 ラフィノースを唯一の炭素源とする最小発育培地でのケモスタット培養。矢印はサンプリング時を示す。

各段階で培養液を採取し、8株ずつ単離した。変異株の増殖速度は、グルコース含有培地では親株と同程度

だったが、ラフィノースおよびスタキオース含有培地では顕著に上昇した。この結果は、単糖の透過性には変化がないものの、三糖以上の大きな糖の透過性が向上したことを示唆する。また、すべての抗菌薬に対するMICが2~4倍程度低下した (図2)。この結果も、変異株の外膜透過性が亢進したことを示唆する。

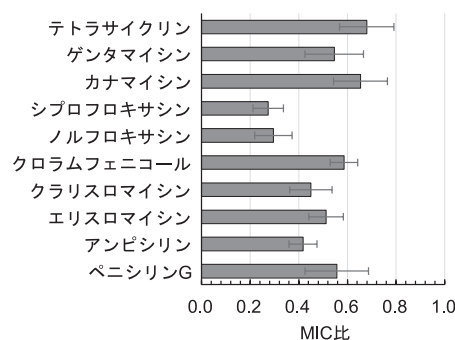


図2 親株に対する変異株のMIC値の比 (平均値±標準偏差)。

各サンプリング時期で2株ずつ、計10株の変異導入箇所を解析した結果、すべて、*morA* 遺伝子の変異が認められた。MorAタンパク質はcyclic di-GMPの受容体であり、cyclic di-GMPは細菌の運動性やバイオフィルム形成を含む多様な機能を制御する。本研究により、MorAおよびcyclic di-GMPが外膜透過性の制御にも関与することが示された。特に、抗菌薬の透過性を亢進させる可能性が示されたことから、新たな創薬の標的となる可能性がある。

緑膿菌の低い外膜透過性は、主要ポーリンであるOprFのうち、わずか5%が物質透過性を有する開口型で、残り95%は透過性を示さない閉鎖型であることに起因すると考えられている。本研究の当初の目的は、OprFポーリンの開閉機構を解明することであった。今後、*morA* 欠損株における全遺伝子の発現変化やOprFポーリンの開閉構造の割合を解析し、外膜透過性に直接作用する機構についてさらなる研究を進めていきたい。

## 吸着槽併設高層型界面ファーマンターの開発： 生物活性二次代謝物の生産への応用

小 田 忍

【目的】 抗ウイルス、抗結核、抗ガン等の重要な生物活性を示すスクレロチオリン (SCL) を主対象に、脂溶性代謝物の生産に有効な界面ファーマンターの実機プロトタイプの開発を目的とした。寒天/有機層 (ジメチルシリコンオイル;ICS) の界面に増殖する *Penicillium sclerotiorum* NBRC 113796 が生産する SCL は有機層中に分泌されてくるが、これをシリカゲルで連続的に吸着除去する吸着槽併設多段高層界面ファーマンター (ASU-IFF) の構築を目指した。さらに、天然界最強の抗ガン活性物質と称されるルプロバンクタチン (RUB) 生産への適用も試みた。

【方法】 50ml 容バイアルのスケールで本株の培養条件の最適化を図る一方で、2.5L 容ポリプロピレン製トレーより作成したファーマンターユニットの多段高層・並列化をデザインした。これにシリカゲルを充填した吸着槽と送液ポンプを連結し、有機層中に生産されてくる SCL を連続的に吸着した (図 1)。吸着された SCL の抽出挙動を把握し、さらには ICS の再利用についても検討した。

一方、RUB 生産への適用については、*Monascus pilosus* NBRC 4520 より RUB 生産の選択性が高い UV 変異株 (UM0070) を創製し、培養条件の最適化を図る一方で ASU-IFF への適用も図った。

【結果・考察】 *P. sclerotiorum* NBRC 113796 による SCL の界面発酵条件を最適化した結果、炭素源はマンニトール (40g/L)、窒素源はペプトン (10g/L)、C/N 比 (4.0)、NaCl 濃度 0.5%，初発培地 pH 5.5 あるいは 8.5、前培養日数 2 日間、培養温度 30℃ となった。上記の最適条件下、界面培養法では液体培養法の 13 倍もの SCL を対培地当たりで生産できた。また、培地中に疎水性樹脂のポリプロピレン微粒子を配合することにより、胞子形成と SCL 生産量が亢進する現象も確認された。なお、SCL の構造は北里大学大村研の岩月正人教授と渡邊善洋助教により決定頂いた。

ファーマンターシステムはスペースの観点より箱型とし、有機層の Inlet/Outlet 設置位置をコーナーに決定した。吸着層のシリカゲルは 1g 当たり約 22mg の SCL を吸着でき、等量の酢酸エチルによる抽出を 4 回繰り返すことによりほぼ全量を回収できた。マンニトール (60g/L) を炭素源、ペプトン (10g/L) を窒素源とする寒天培地 900ml を注入したファーマンターユニット (2.6L) を 8 段高層化し、それを 2 塔並列化した。300g のシリカゲルを充填し

た吸着層と送液ポンプを有機層循環ラインに組み込んで、流速 202ml/min で 9L の ICS を循環させた。4 週間に渡って毎週吸着層を交換し、吸着材からの酢酸エチルによる抽出を 4 回繰り返して HPLC で SCL 生産量を定量したところ、2.63, 1.77, 4.02, 7.32g、トータルで 15.74g の SCL が生産されていた (図 2)。有機層 ICS の蒸留による回収・精製も可能であった。また、ICS 層から回収した SCL 量は 211mg となり、トータルでの SCL 生産量は約 16g に達した。なお、NBRC 113796 の 2 倍以上の SCL 生産量を与える UV 変異株 UM0689 の取得にも成功した。

一方 RUB の生産研究に関しては、*M. pilosus* NBRC 4520 から RUB 生産の選択性が高い UM0070 変異株を取得した。本株の培養条件について、炭素源をグルコース (60g/L)、ペプトン (5g/L)、初発培地 pH 6.0、培養温度 25℃ に最適化した。この最適培地を用いて 6 段高層型の ASU-IFF を 4 週間実動させた結果、1,099–1,710mg の RUB と 53.0–87.0mg のモナスチン (MON) が吸着層から回収された。RUB は MON の 19–22 倍量高生産されており、アンカフラビンとモナスコルブリンの副生はわずかであった。

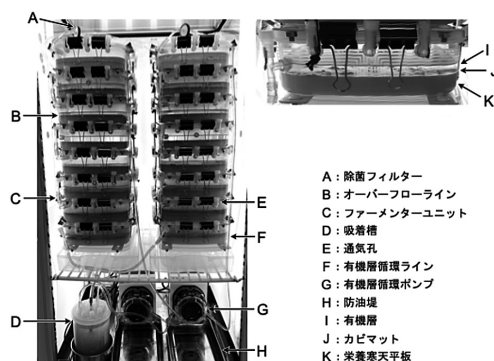


図 1 吸着層併設式多段高層並列式界面ファーマンター

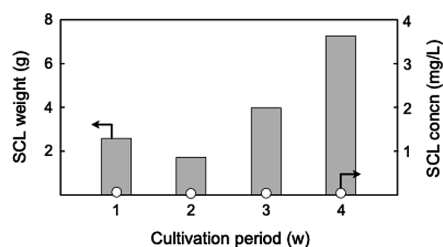


図 2 ASU-IFF による SCL の繰り返し生産

## 機械学習を利用した変異導入による可溶性発現の概念の解明

松井大亮

**【目的】**異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体を形成し、活性を示さないことが多く、このことは異種宿主による酵素の大量発現における大きな問題点である。これまでに大腸菌で不溶性画分に発現する植物由来酵素遺伝子への変異導入による可溶性発現や、二次構造やアミノ酸配列の保存性、疎水性度に着目した変異導入法による可溶性発現手法を研究してきた。本研究では高度好熱菌由来のタンパク質のアミノ酸配列と大腸菌における各々の発現情報を機械学習に入力し、得られた計算機を用いて可溶性確率が高い置換部位を選抜し、実際に変異導入による可溶性発現への効果を検討した。

### **【方法】高度好熱菌由来のタンパク質の異種発現情報の取得：**

理研バイオリソース研究センターから購入した *Thermus thermophilus* HB8 のタンパク質発現用プラスミド 414 種類をそれぞれ大腸菌 BL21 (DE3) に挿入し、抗生物質を添加した LB 液体培地で 37 度振盪培養し、菌体濁度が 0.5 の時にイソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシドを添加後、16 度で 12 時間誘導した。その菌体を超音波破碎後、上清を可溶性画分、ペレットを不溶性画分とし、SDS-PAGE で発現情報を取得した。**機械学習：**教師付き学習技術の一つであるニューラルネットワークで学習を実施した。上記タンパク質群の 70% のアミノ酸配列と発現量の情報を計算機に導入し、可溶性に発現する割合（可溶性確率）を算出し、残り 30% の配列情報をその計算機に入れ、可溶性確率を算出し、実際の発現量と比較することで正答率を確認した。**変異導入と活性測定：**KOD Plus DNA polymerase（東洋紡株式会社）もしくは PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ株式会社）を用いて変異導入し、比色定量法もしくは吸光度変化による活性測定を行った。

**【結果・考察】**255 種のタンパク質が可溶性画分、159 種のタンパク質が不溶性画分に大腸菌で発現することを明らかにした。機械学習により、75% の精度で可溶性確立を予測することができ（図 1）（JP2023-080992）、その計算機を用いて数種の酵素配列に対し、一残基ずつ他のアミノ酸に置換した酵素の可溶性確率を算出し、可溶性確率が高い置換部位を見出した。その部位へ変異導入し、大腸菌で発現した結果、Arginine decarboxylase で 18 変異体中 8 変異体（44%）、Catechol 2,3-dioxygenase で 20 変異体中 14 変異体（70%）、Glutamate dehydrogenase

で 20 変異体中 16 変異体（80%）、Lactate dehydrogenase で 19 変異体中 7 変異体（37%）に可溶性画分の活性の検出や増加が見られた。

本研究で得られた測定結果を用いてロジスティック回帰分析を実施し、変異部位の生化学的特徴と可溶性の向上にどのような関連があるかを調査した。その結果、元の配列で Gly, Ile であるアミノ酸残基、溶媒と接している部位の疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸、 $\alpha$ -ヘリックス構造への変異導入が可溶性の向上に有意な正の影響を示すことが示唆された。一方、元の配列が Phe であるアミノ酸残基、予測構造における中心から  $C\alpha$  間の距離が長い部位、ストランド構造、変異後のアミノ酸が Leu, Arg, Ser であるアミノ酸残基への変異導入が可溶性発現に負の影響を示すことを明らかにした。

計算機で予測した部位への変異導入による効果が見られない酵素もあり、詳細なタンパク質の可溶性発現の機構を解明する必要があるが、この新たな取り組みは、化学工業および医療産業などに有効に利用することが大いに期待できる。

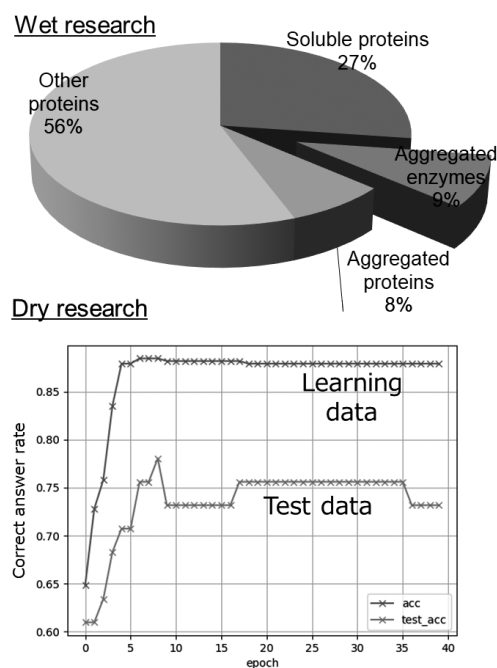


図 1 機械学習による予測法の開発

# 蛋白質間相互作用の合理的リデザインによる NRPS 生合成系の分解および再構築

石川 文洋

**【目的】** ペプチド天然物は多様な骨格と特異な生物活性をもつことから、医薬品資源として重要な位置を占める。新たな天然物の多様性拡充戦略として生合成遺伝子や生合成酵素の応用が盛んに研究されている。それにより、微生物を宿主として生合成遺伝子の異種発現や物質生産に加えて、生合成系の反応機構が急速に解明されてきており、生合成系の人工的な改変から天然物を超えた非天然物生合成へと研究がシフトしてきている。

ペプチド天然物の多くは、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) により生合成される。NRPSでは、アデニル化 (A) ドメインにより選択されたアミノ酸はキャリアータンパク質 (CP) に受け渡され、ペプチド骨格へ導入される。この過程で、AドメインとCPは特異的な蛋白質間相互作用 (PPI) を形成することでアミノ酸が受け渡される。NRPSを利用して非天然型骨格を生合成する手法のうち、最も汎用されるドメインスワッピング法は、人工的に置換したA'ドメインが本来の生合成経路のCPを認識することができなくなるため、望む生成物ができない、あるいは収量が低下することが多いことが明らかになっている。本研究では、AドメインとCPのPPIエンジニアリングとドメインスワッピング法を融合した新規物質生産法の確立を目的とする。

**【方法】** *Escherichia coli* K-12 (大腸菌) 由来のエンテロバクチン生合成系 (EntE, EntB, EntF), *Vibrio cholerae* O395 (コレラ菌) 由来のビブリオバクチン生合成系 (VibE) をモデルにAドメインとCPのPPIのエンジニアリングとドメインスワッピング法を融合した新規物質生産法の可能性を検証する。Entは、2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) 選択的AドメインEntE, EntB (CP), EntFにより生合成される。また、Vib生合成に関与するVibEはDHB選択的Aドメインである。本研究では、VibE (Aドメイン) とEntB (CP) とのPPIをエンジニアリングにより最適化する (図1A)。さらに、天然には存在しないVibE (Aドメイン), EntB (CP), EntF生合成系による天然物Entの生成をHPLCやLC-MSにより定量する。まず、EntE (Aドメイン), EntB (CP), EntFを大腸菌組換えタンパク質として調製し、Ent生合成系を確立する。次に、EntE (Aドメイン) とEntB (CP) との複合体構造を利用し、VibE (Aドメイン) とEntB (B) の複合体構造を予測する。続いて、VibE (A

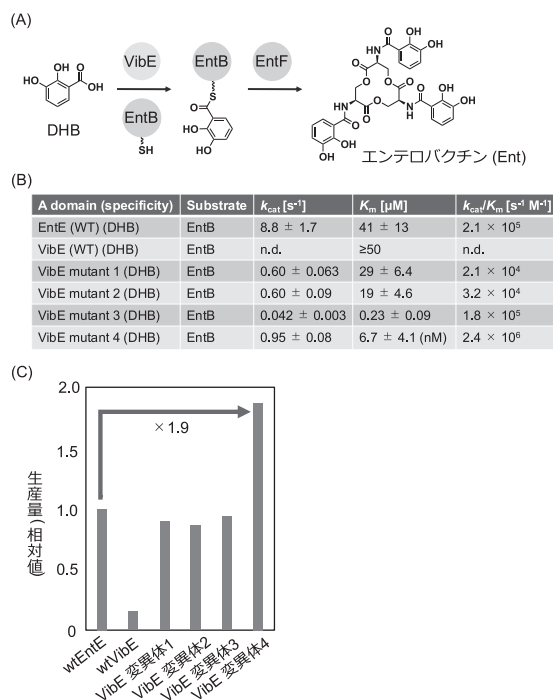


図1 (A) 非天然型Ent生合成経路。(B) 基質DHBの受け渡し反応の酵素速度論解析。(C) Ent生成量の比較。

ドメイン) とEntB (CP) とのPPIが最適化されたVibE (Aドメイン) 変異体を設計後、大腸菌組換えタンパク質として調製する。最後に、VibE (Aドメイン) 変異体, EntB (CP), EntF生合成系によるEntの生成量と天然型Ent生合成系 (EntE, EntB, EntF) によるEntの生成量を比較する。

**【結果・考察】** EntE, EntB, EntF, 基質 (DHBやL-Ser), ATPを混合することにより、Ent生合成をHPLCおよびLC-MSにより確認した (図1B)。一方、野生型VibEに置換するとEntはほとんど生成しなかった (図1B)。これは野生型VibEとEntBが特異的なPPIを形成できないことに起因すると考えられる。続いて、EntBとのPPIが最適化された4種類のVibE変異体を大腸菌組換えタンパク質として調製した。最後に、天然には存在しないVibE変異体, EntB, EntF経路によるEntの生合成を検討した (図1B)。その結果、天然型Ent生合成系 (EntE, EntB, EntF) によるEnt生成量と同程度か1.9倍生成量が向上した (図1C)。

## AI 細胞選抜法による変異酵母株の単離

磯崎 瑛 宏

**【目的】** ビールや日本酒、ワインといったアルコール飲料では、その醸造過程において酵母による発酵の力を借りており、それぞれ異なる種類の酵母を用いる。さらに、ビール醸造に絞っても、複数種類の酵母株が候補になり、酵母の種類がビールの味に影響を与えるため、おいしいアルコール飲料を生み出す酵母の創出は大きな需要がある。酵母創出の強力な技術となりうるゲノム編集細胞株は、一般のアルコール飲料への使用において厚生労働省の届け出が必要になるなど、その使用には高いハードルがある。そこで本研究では、ランダム変異を加えた酵母細胞集団から、形態情報を手掛かりとして、ゲノム編集細胞株と同等の性質を持った細胞を単離する手法を確立することを目指し、基礎技術開発を行う。なお、酵母の形態はゲノム情報を強く反映することから、本提案を行った。

**【方法】** 図1に本研究で提案する手法の概念図を示す。この手法は、ゲノム編集細胞を作成して分取アルゴリズム

ムの構築 (①&②)、ランダム変異の導入 (③)、iACSによる細胞の選抜 (④)、取得したコロニーの細胞の画像を高速に取得してAI判別することで標的細胞が含まれるコロニーの単離 (⑤)、ビールの醸造 (⑥) から構成される。本研究では、ステップ④から⑥の原理検証を行った。

**【結果・考察】** ビール酵母がきれいに撮像できていること、得られたコロニーの評価を高速イメージングフローサイトメトリーで行うこと、単離したビール酵母がアルコール発酵できることが確認できた(図2a-c)。また、iACSで用いる細胞分取デバイスの改良にも取り組み、粒子を畳み込みニューラルネットワークの画像分類モデルに基づく画像活性分取を行う原理検証実験により、分取速度毎秒285粒子において純度93.1%、収率50.1%の結果を得ることができた(図2d)。この手法に図1で示す2段階目選抜を組合せて、高純度の単離が可能になる。

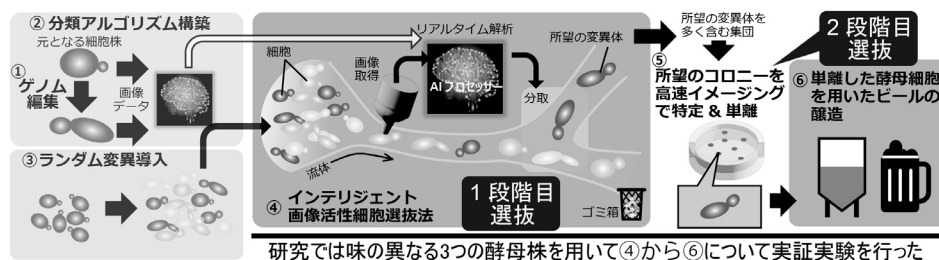


図1 本研究のコンセプト図 ①ゲノム編集細胞株、②高速イメージング画像で細胞分類AIアルゴリズム構築、③ランダム変異導入、④AI細胞選抜法による所望の変異体の分取と分取した細胞のコロニー形成、⑤コロニーから所望の変異株を見つけて単離、⑥単離した酵母細胞を用いたビールの醸造。

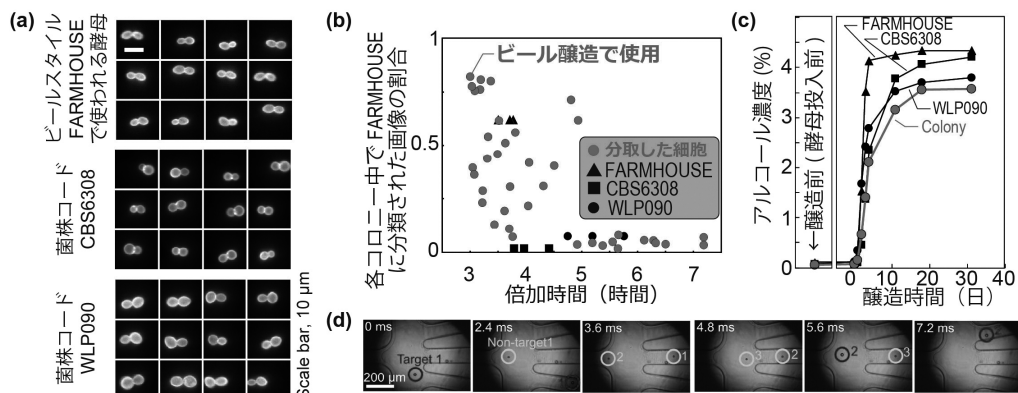


図2 実験結果 (a) イメージングフローサイトメトリーで撮影した酵母細胞画像 (b) 分取した細胞の評価結果 (c) ビール醸造中のアルコール濃度 (d) 改良した細胞分取デバイスの評価結果

## フォトグラニュールによる排水処理での エネルギーキャリアとしての炭素循環の最大化

日 高 平

**【目的】** 一般的な排水処理技術である活性汚泥法およびメタン発酵によるエネルギー回収を組み合わせる場合、流入排水中の炭素量に対して、メタンとして回収される炭素量は限られている。半分程度は電力を消費しながら無機化され、汚泥に含まれる分はバイオガス利用や発酵残渣の焼却などを経て、二酸化炭素として大気中に放出されている。活性汚泥法の代わりにシアノバクテリアを中心とするフォトグラニュールを導入することで、光合成により酸素が供給され、排水処理で電力を消費する曝気操作が不要となる。大気中に放出されていた二酸化炭素は、光合成により藻類バイオマスとして固定化され、後段のメタン発酵によりエネルギー利用できる。本研究では、排水の微生物処理から脱炭素社会の構築に貢献するために、フォトグラニュールおよびメタン発酵を組み合わせ、エネルギーキャリアとしての炭素循環を最大化する技術の開発を目的とした。

**【方法】** 実験室規模のフォトグラニュール反応器および比較のための活性汚泥反応器により人工排水を用いた連続運転を行い、排水処理特性およびメタン発酵特性を分析した。フォトグラニュールは都市下水処理場の活性汚泥由来で、光照射条件で優占化させてから運転を開始した。人工排水に加えて、外部から人工排水の有機炭素の約3割に相当する二酸化炭素を投入する条件も設定して比較した。生成したフォトグラニュールについては、メタン発酵実験を行い、メタンガス発生率を比較した。また、16S rRNA 遺伝子の解析によりフォトグラニュールを構成する微生物叢を確認した。

**【結果・考察】** フォトグラニュール系および活性汚泥系の放流水の平均水質は、全有機炭素濃度がそれぞれ5.5mgC/Lおよび4.0mgC/L、浮遊物質濃度がそれぞれ9.5mg/Lおよび8.3mg/Lであり、処理状況は安定していた。フォトグラニュール系にて、二酸化炭素投入が放流水の水質に及ぼす影響は大きく見られなかった。フォトグラニュールの性状として、クロロフィル $a$ や元素割合についても、二酸化炭素投入条件が異なることによる影響は特に見られなかった。フォトグラニュールの元素組成の平均値は、Cが46.8%、Hが6.8%、Nが8.4%であった。二酸化炭素投入の影響として、溶存無機炭素濃度40mgC/Lで最大の比増殖速度が得られた。

フォトグラニュールのメタン発酵特性を測定した結果、有機物1gあたり0.3~0.5L程度のバイオガスが得

られた(図1)。反応器での固形物滞留時間を短くすればガス発生率が増加するものの処理水質は悪化する関係が示された。ガス発生率は活性汚泥と同程度の値であり、同様にメタン発酵によるエネルギー回収が可能であることが確認された。

遺伝子解析では、フォトグラニュール中でのシアノバクテリア(主としてOscillatoriales)の検出率が15~20%程度であった。その他40~50%はProteobacteriaが占めており、活性汚泥と同様に有機物分解に関わる細菌が同時に含まれていることが確認された。

提案システムの炭素収支を、処理水量1,500m<sup>3</sup>/d規模の下水処理場を想定して、1日あたりとして算出した(図2)。活性汚泥系では処理槽からの二酸化炭素排出量が132kgC/dに対して、フォトグラニュール系では処理槽からの排出量より吸収量が上回り、15kgC/dの吸収になると試算された。発生する汚泥量はフォトグラニュールが活性汚泥の3.5倍程度であり、メタン発酵などに用いることができるバイオマス資源の増加が示された。

フォトグラニュールによる排水処理は従来の活性汚泥と比較して大幅に二酸化炭素排出量の削減に貢献すると考えられた。今後排水処理過程で生産されるフォトグラニュールの有効活用の観点から、フォトグラニュールの性状や高付加価値物質への変換を検討していきたいと考えている。

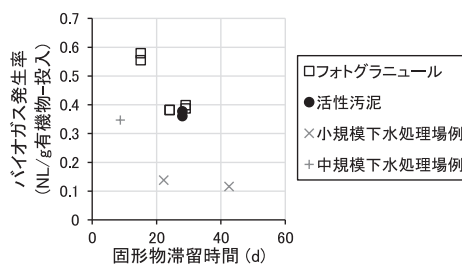


図1 バイオガス発生率の測定結果

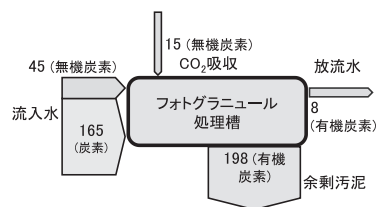


図2 炭素収支の試算結果 (kgC/d)

## 腸内細菌が産生する膜小胞の特性解析とその応用

山崎 思乃

**【目的】** ヒトの腸内には約1,000種、100兆個の腸内細菌が複雑な腸内細菌叢を形成して共生している。腸内細菌叢は健康と密接に関連し、そのバランスの破綻は多様な全身性疾患を引き起こす。一方、細菌はグラム陰性・陽性を問わず、メンブランベシクル（MV）と呼ばれる膜小胞を産生する。MVは核酸やタンパク質などを内包したナノ粒子であり、クオラムセンシングをはじめとする菌体間の情報伝達に加え、免疫調節などの宿主細胞への情報伝達ツールとしても機能する。特に、腸内細菌が高密度に生息する腸内環境には、宿主細胞が産生するエクソソームに加え、腸内細菌由来のMVも多数存在しているが、それらの特性や機能にはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、マウスの糞便および盲腸内細菌を対象に、MV産生能およびMVの生理活性を解析することで、ポストバイオティクスとしての応用が可能なMVの探索を試みた。

**【方法】** BALB/cマウス（雄性、8週齢）から糞便および盲腸内容物を採取し、リン酸緩衝生理食塩水にて懸濁した。多段階沈殿法により残渣を除去した後、上清をフィルターろ過し、イオジキサノール密度勾配超遠心分離によってMVを精製した。細菌から抽出したDNAと外部DNAを分解したMVから抽出した内部DNAについて、V1-V2領域を対象とした16S rRNA解析を実施することでMVを産生する細菌種を推定した。培養可能な腸内細菌はGAM培地にて嫌氣的に培養し、上清から超遠心分離およびゲルろ過クロマトグラフィーによりMVを精製した。また、MVの免疫調節作用はマクロファージ様J774A.1細胞株のインターロイキン（IL）-6の産生量を指標として評価した。MVの定量は、全工程を通じて脂質特異的色素FM4-64を用いた蛍光分析法を利用した。

**【結果・考察】** マウスの糞便および盲腸内容物の密度勾配超遠心分離では、由来によらず密度1.09g/cm<sup>3</sup>の画分にMVが集積し、高い純度で精製できた。透過型顕微鏡観察ではMVの平均粒子径は約100nmであり、蛍光分析によりDNA、短鎖RNAおよびタンパク質の含有を確認した。また、MV画分は、免疫調節に関わるグラム陰性菌の外膜リポ多糖（LPS）およびグラム陽性菌の細胞膜に局在するリポテイコ酸を含み、J774.1細胞のIL-6産生を誘導した。さらに、MVの産生菌の特定のた

め、糞便および盲腸内容物の細菌叢とMV菌叢を門レベルで解析したところ、部位に関わらず細菌叢とMV菌叢は異なり、細菌種によりMV産生能が異なることが示唆された（図1）。また、種多様性は盲腸のMV菌叢において有意に乏しく、腸管の部位により腸内細菌のMV産生挙動が異なる可能性が示された。また、属レベルにおいて、細菌叢と比較してMV菌叢で相対存在比が顕著に増加したのは、糞便では*Sphingomonas*属と*Candidatus Saccharimonas*属、盲腸では*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*属細菌であった。腸内において、これらの細菌がMVを相対的に高産生している可能性が考えられたが、有害菌に該当するものが多く、ポストバイオティクスとしての応用には適さないと判断した。しかし、疾病との関連も示唆されたため、今後、詳細な解析が必要である。

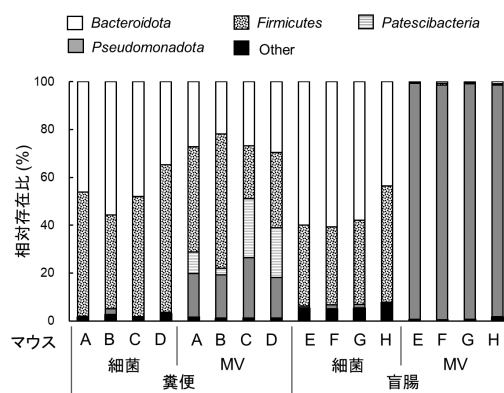


図1 マウスの糞便および盲腸の門レベルのMV菌叢と細菌叢（アルファベットはマウスの個体を表す。）

また、培養可能な腸内細菌において、MV産生能と免疫調節能について調査し、*Megamonas funiformis* NBRC 114415と*Bacteroides uniformis* NBRC 113350に高いMV産生能を見出した。中でも、*M. funiformis*のMVはJ774.1細胞のIL-6産生を強く誘導し、その活性成分としてLPSを特定した。今後、このLPSの化学構造を解析し、ポストバイオティクスとしての応用の可能性を検証する予定である。本研究において明らかにした腸内細菌のMV産生特性とMVの生理活性に関する知見は、MVの腸内環境の恒常性への関与を示唆するものであり、その詳細の解明が期待される。

## 逆グリオキシル酸経路を利用して高収率にアセチル CoA を供給可能な大腸菌の開発

戸谷 吉博

**【目的】** 微生物による物質生産では、二酸化炭素の排出を伴う反応を迂回して、原料から目的物質へ高効率に変換することが課題である。逆グリオキシル酸 (rGS) 経路は、TCA 回路のリンゴ酸を 2 分子のアセチル CoA に変換できる魅力的な人工経路であり、この経路を活用することで、理論上 1 分子のグルコースから最大 4 分子のアセチル CoA を得ることができる。本研究では、グルコースから rGS 経路を介してアセチル CoA を供給可能な細胞の創出を目指し、rGS 経路を実装した大腸菌株において、導入した経路がどの程度働いているかを  $^{13}\text{C}$ -代謝フラックス解析 ( $^{13}\text{C}$ -MFA) を用いて評価した。また、量論モデルを用いたシミュレーションにより、rGS 経路の導入により理論最大収率の増加が期待できる化合物を探索した。

**【方法】** 大腸菌 MG1655 (DE3) 株を宿主として、P1 トランスダクションによりクエン酸合成酵素をコードする *gltA* と *prpC* の欠失株を作成した。異種のリンゴ酸チオキナーゼ、マリン CoA リアーゼ、ATP-クエン酸リアーゼ、イソクエン酸リアーゼを *LlacO-1* プロモータ制御下で過剰発現させた。合成培地を利用してバッフル付きフラスコで培養を行った。培養液中のグルコース、グルタミン酸、酢酸などの有機酸の濃度の測定には、バイオセンサーと高速液体クロマトグラフィーを用いた。 $^{13}\text{C}$ -MFA のための実験では、 $[1,2-^{13}\text{C}]$  グルコースと非標識グルタミン酸を用いて培養した。対数増殖期の細胞を回収して加水分解した後、タンパク質由来アミノ酸の質量同位体分布 (MDV) をガスクロマトグラフ質量分析により測定した。フラックス分布の推定には OpenMebius を利用した。

**【結果・考察】** 大腸菌に rGS 経路の利用を強いるため、内在のクエン酸合成酵素が触媒する反応を遮断した。空ベクターを保持するコントロール株、rGS 経路を触媒する酵素を有する rGS 経路導入株を構築した。両菌株は、グルコースを単一炭素源とする合成培地では生育できなかったが、グルコースとグルタミン酸を共基質とする生育可能な条件を見出した (図 1)。

この培養条件において、アミノ酸の MDV を計測し、 $^{13}\text{C}$ -MFA を実施した。最適化計算の結果、実測した MDV を説明可能なフラックス分布を推定することに成功した (図 2)。コントロール株では rGS 経路のフラックスがゼロなのに対して、rGS 経路導入株ではグルコース消費の半分程度のフラックスで rGS 経路が働いたことが確認

できた。また、炭素固定を担うホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのフラックスがコントロール株の約 7 倍に増加しており、rGS 経路の導入により二酸化炭素の正味の排出が約 80% 減少したことを明らかにした。

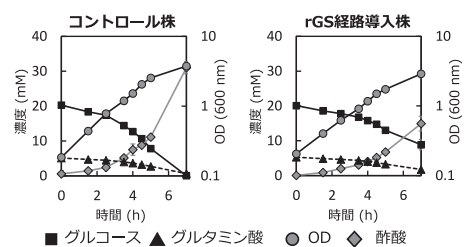


図 1 コントロール株と rGS 経路導入株の培養結果

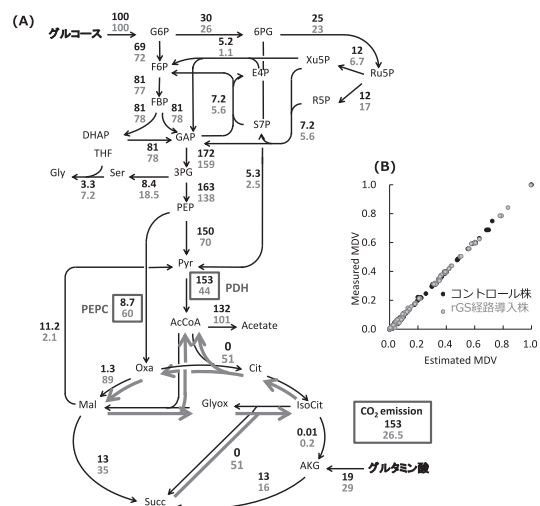


図 2 推定したコントロール株 (上段) と rGS 経路導入株 (下段) の代謝フラックス分布 (A) と実測 MDV と予測 MDV の比較 (B)。フラックスはグルコースの取り込み速度を 100 とした際の相対値を示す。

最後に、大腸菌で生産が報告されている 20 種類の有用化合物について、rGS 経路の追加で理論収率が増加するかをフラックスバランス解析により計算した。その結果、酢酸以外にもアセトンやイソプロパノールなどのアセチル CoA から合成される化合物が有望な候補として予測された。本研究により、細胞内での rGS の働き度合いが明らかになり、これを基準として更なる変更を行うことで、これらの有用化合物の生産性向上が期待される。



## ノンコーディング RNA の高い転写量と安定性を 利用した大腸菌物質生産法の開発

中 村 美紀子

**【目的】** 代謝工学を含む大腸菌による物質生産には主に IPTG 誘導や五炭糖誘導などの誘導系が使用されているが、誘導による増殖低下や代謝への負荷、誘導に反応する細胞とそうでない細胞による発現の不均一性などの問題があり、それらを解決できる恒常発現系も求められている。そこで、恒常発現プロモータの探索を行い、ソルビトールトランスポーターオペロン srlAEBD のプロモータ（以下、srlA プロモータと呼ぶ）の取得に成功した (Mol. Biotechnol., 2018)。しかし RNA-seq データにおいて、このプロモータによる mRNA 転写量は非常に少なく、タンパク質合成量との正の相関がみられず、プロモータよりも転写開始点から開始コドンまでの 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) が高発現に寄与していることが考えられた。この高発現に寄与する 5'-非翻訳領域に転写促進プロモータ配列を組み合せることができれば、srlA プロモータ以上の発現能力を持った恒常高発現プロモータが取得できると考え、転写促進プロモータ配列の取得を目指した。

**【方法】** 転写に良いプロモータ配列はもちろん RNA 量が多いものが良い。そこで、タンパク質生産に通常用いられる LB 様培地で培養した大腸菌野生株 MG1655 からトータル RNA を調製し、RNA-seq を行った。RNA-seq データでカウント数の多い上位の遺伝子について、プロモータ領域を MG1655 株から PCR で取得し、レポーター遺伝子の upstream につなげプラスミドを構築し、プロモータ活性を測定した。配列は大腸菌野生株 MG1655 (GenBank U00096) ゲノムを参照した。

**【結果・考察】** RNA-seq 法より、RNA 存在量の多い遺伝子群を明らかにした (表 1)。ノンコーディング RNA (ncRNA) の中には、コーディング RNA (cRNA) よりも桁違いにカウント数が高いものがあり、これら遺伝子群

表 1 発現量の多い遺伝子 (RNA-seq データ)

順位	ncRNA	カウント	順位	cRNA	カウント
1	ssrA	554,295	1	htpX	6,142
2	rnpB	50,976	2	ibpA	6,089
3	ssrS	27,073	3	pspA	5,717
4	csrC	3,771	4	asnA	4,567
5	rrlA	2,112	5	dnaK	4,214
6	rrlG	2,047	6	hspQ	3,676
16	csrB	933	243	gapA	310
20	rybA	687	3952	srlA	1

はプロモータ能力が高い、転写された ncRNA が分解されにくく安定である、またはその両方である可能性が高く、転写量の多い ncRNA の配列から転写能力の高いプロモータ配列と RNA を安定化させる配列が見出せるのではないかと考えた。そこで、カウント数の高かった *ssrA*, *rnpB*, *ssrS* の ncRNA プロモータの取得を試みたが形質転換体を得られなかった。高すぎる転写が異常を引き起こしたと考えられる。

そこで、上位 4~20 位までの ncRNA についてプロモータのクローニングを試みたところ、すべてのプロモータで形質転換体を得ることができ、中でも、*csrC*, *csrB*, *rybA* のプロモータを、転写能力の高い ncRNA プロモータとして取得することができた。

次に、*csrC*, *csrB*, *rybA* ncRNA プロモータについて、srlA プロモータとの発現比較を行った (図 1)。それぞれ単独の場合、SD 配列がないため発現が低かったが、srlA 5'UTR を付加すると有意に発現量が増加し、その発現量は srlA プロモータよりも高かった。また、最終 OD に有意な差はなく、増殖の遅延も観察されなかった。

一方、比較として RNA-seq データで上位 10 位まで、カウント数では 2,437 までのコーディング配列について、プロモータの発現を調べたところ、すべてタンパク質合成量は低かった。

以上の結果より、RNA 生産ツールで利用されているのみであった ncRNA プロモータが、タンパク質生産にも使用できる可能性を見出すことができた。

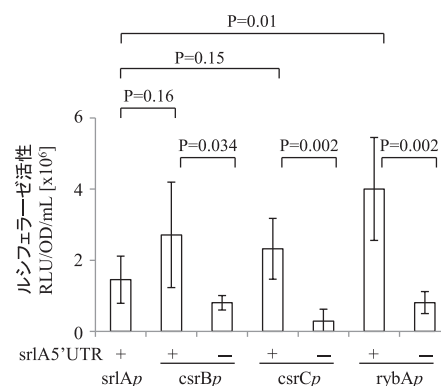


図 1 ncRNA プロモータによるルシフェラーゼタンパク質生産

## 紅色光合成細菌が生産する酵素と光・金属触媒複合系による 二酸化炭素を原料とするプラスチックモノマー合成

天 尾 豊

【目的】微生物によって完全に消費され二酸化炭素、水あるいはバイオマスなど自然の副産物のみを生じる生分解性高分子は、環境低負荷型材料として注目を浴びている。生分解性高分子の原料となるモノマーを光エネルギーと二酸化炭素から合成する方法が確立できれば、再生可能エネルギーの利用と二酸化炭素の有効利用・削減にも効果を発揮する新たな手法になりうる。本提案では、アセトン培地中で紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* (*Rb. capsulatus*) を培養することによって発現したアセトンカルボキシラーゼ (AC) と 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (HBDH) を機能性光触媒・金属錯体触媒からなる光レドックス系中の生体触媒として用い、二酸化炭素と最も簡単なケトン化合物であるアセトンを原料とした可視光エネルギーによって生分解性高分子 (ポリヒドロキシ酪酸; PHB) のモノマーとなる 3-ヒドロキシ酪酸が合成可能な新たな人工光合成技術確立を目的とした。

【方法】 Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation から購入した *Rb. capsulatus* SB1003 株を炭素源としてアセトン及び炭酸水素ナトリウムを含む培地中、可視光照射条件下で培養し AC 及び HBDH を発現させた。次に、培養株から AC 及び HBDH を含む酵素抽出液を調製した。AC 及び HBDH を含む酵素抽出液を触媒とし、ATP 及び NADH 存在下でアセトン及び炭酸水素ナトリウムからの 3-ヒドロキシ酪酸生成では、炭酸水素ナトリウム (50mM)、アセトン (2.0mM)、ATP・2Na (5.0mM)、MgCl<sub>2</sub> (5.0mM)、NADH (5.0mM) 及び AC と HBDH を含む酵素抽出液 (0.2mL) を含む 5.0mL の 500mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を 30.5℃ で反応させた。生成した 3-ヒドロキシ酪酸はイオンクロマトグラフを用いて定量した。アセトンと二酸化炭素を原料とする可視光駆動型 3-ヒドロキシ酪酸生成は図 1 に示す反応系を用いた。炭酸水素ナトリウム (50mM)、アセトン (0.5mM)、ATP・2Na (2.0mM)、MgCl<sub>2</sub> (5.0mM)、TEOA (0.20M)、ZnTPPS (50μM)、ロジウム錯体 ([Cp<sup>\*</sup>Rh(bpy)(OH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>]; Cp<sup>\*</sup>: ペンタメチルシクロペンタジエニル; bpy: 2,2'-ビピリジル) (5.0μM)、NAD<sup>+</sup> (2.0mM) 及び AC と HBDH を含む酵素抽出液 (0.2mL) を含む 5.0mL の 500mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を温度 30.5℃ で、250W ハロゲンランプを光源として可視光を照射することで反

応を開始した。加えて、炭酸水素ナトリウム非存在下で気相中の二酸化炭素を導入した反応系も検討した。

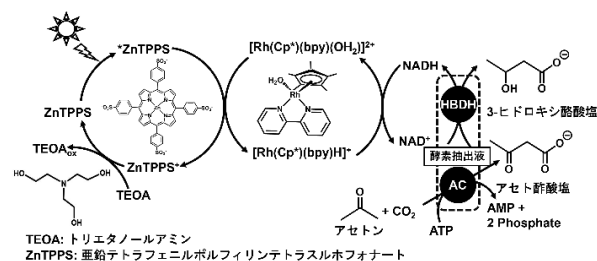


図 1 TEOA・ZnTPPS・[Cp<sup>\*</sup>Rh(bpy)(OH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>] で構成される NADH の光再生系と酵素抽出液とが連携したアセトンと二酸化炭素を原料とする 3-ヒドロキシ酪酸生成系

【結果・考察】炭酸水素ナトリウム (50mM)、アセトン (2.0mM)、ATP・2Na (5.0mM)、MgCl<sub>2</sub> (5.0mM)、NADH (5.0mM) 及び AC 及び HBDH を含む酵素抽出液 (0.2mL) を含む 5.0mL の 500mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) を 30.5℃ で反応させた結果、反応時間とともに 3-ヒドロキシ酪酸濃度が定常的に増加した。24 時間の反応で 1.94mM の 3-ヒドロキシ酪酸が生成し、アセトンに対する 3-ヒドロキシ酪酸変換率は 97% まで向上させることができた。さらに、生成した 3-ヒドロキシ酪酸の光学活性を調べたところ、D 体のみが選択的に生成していることも明らかになった。

次に、炭酸水素ナトリウム (50mM)、アセトン (0.5mM)、ATP・2Na (2.0mM)、MgCl<sub>2</sub> (5.0mM)、TEOA (0.20M)、ZnTPPS (50μM)、[Cp<sup>\*</sup>Rh(bpy)(OH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>] (5.0μM)、NAD<sup>+</sup> (2.0mM) 及び AC 及び HBDH を含む酵素抽出液 (0.2mL) を含む 5.0mL の 500mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) に可視光を照射することで反応を開始した結果、可視光照射 7 時間後における 3-ヒドロキシ酪酸生成濃度は 407μM とアセトンの 81% が最終的に 3-ヒドロキシ酪酸に変換された。加えて、炭酸水素ナトリウムの代わりに気相の二酸化炭素を原料として用いた結果、光照射 5 時間でアセトンの約 50% が 3-ヒドロキシ酪酸に変換された。この場合、気相の二酸化炭素が緩衝液によって捕捉され、炭酸水素イオンに変換されて反応に利用されている。本系は密封反応系であり、反応器内の圧力減少により 3-ヒドロキシ酪酸生成濃度が若干減少した。

## 食用昆虫の肥育における有用細菌の解析

後藤 和義

【目的】世界78億人の人口を支える大規模食糧生産に伴う環境破壊、CO<sub>2</sub>排出は重要課題である。持続可能な社会発展（SDGs）のためには低負荷な食料生産が待望されている。昆虫食は低環境負荷で効率的に高タンパク質の食料が生産可能であり急速に商用化が進んできている。中でもコオロギは飼育・繁殖の簡便さから最も商用化されている。コオロギの生産性向上には昆虫生理学を理解する必要がある。近年ヒトや家畜の腸内細菌叢の解明が進んでおり、腸内細菌叢の重要性は全身の疾患、免疫や代謝にまで及ぶことが明らかとなった。昆虫にも種に固有の腸内細菌叢が存在し、コオロギの腸内細菌叢も成長や免疫に関与すると予想される。本研究では、食用コオロギの腸内細菌から生産性向上や食の安全に寄与する有用細菌を分離し、成長補助剤として用いることを目的とした。

我々は、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) 腸管の腸内細菌叢解析の結果から、乳酸菌の一種である *Lactococcus garvieae* が、病原細菌であるサルモネラ菌 (*Salmonella. Enteritidis*) に対する定着阻止能を有していると考えた。乳酸菌選択培地を用いてコオロギ腸管懸濁液から *L. garvieae* の菌株を分離した。本菌株は *in vitro* でも *in vivo* でも *S. Enteritidis* に対し阻害能力を持つことを示した (図1)。そこで本研究では、食用コオロギの飼育における、*L. garvieae* の有用性を検討することにした。

【方法】*L. garvieae* OUH32の安全性を検討する目的で菌株のドラフトゲノム解析を行った。

コオロギの餌 (MF, オリエンタル酵母) に *L. garvieae* の生菌を湿重量で1%添加し、孵化後のコオロギに自由摂食させた。約3日毎にコオロギの体長を測定し、その変化を観察した。

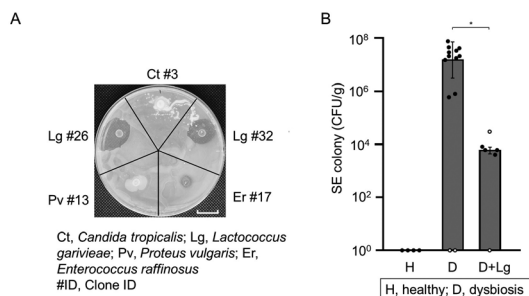


図1 コオロギ腸内から得られた菌株による *S. Enteritidis* の生育阻止円 (左). *L. garvieae* の生菌によるコオロギ腸管への *S. Enteritidis* の定着阻止効果 (右)

観察後のコオロギは、生存中に、病原体に対する抵抗性を検討した。コオロギの体内に1匹あたり10<sup>8</sup>cfuの *Pseudomonas aeruginosa* PAO1を体腔に注射し、その後の生存率について検討した。生存期間が終了したコオロギについては、100℃で乾熱乾燥し、ミルを用いて粉末材料とした。このコオロギ乾燥粉末中の栄養価については食品栄養分析を行い、有機酸の定量についてはLC/MSを用いて行った。

【結果・考察】ドラフトゲノム解析により、*L. garvieae* 分離株は病原因子や毒素遺伝子を有さず、安全性の観点から食用コオロギへの使用に適していることが示された。加えて、本株のゲノム中には複数の抗菌ペプチド遺伝子が確認された。

*L. garvieae* を添加した飼料を自由摂食させた条件下では、コオロギの体長や成長速度において対照群との差は認められなかった (図2)。一方、得られた乾燥コオロギ粉末の栄養分析では、全体のタンパク質含量が5% (±1.8%) 増加しており、虫体の栄養価向上の可能性が示された。また、有機酸の定量においては、乳酸が投与群で約1.4倍増加しており、腸内環境に対する何らかの代謝的影響を与えていることが示唆された。

*P. aeruginosa* 感染実験では、*L. garvieae* 投与の有無による生存率に有意な差は認められず、本モデルにおいては免疫増強作用は確認されなかった。

以上の結果から、*L. garvieae* は食用コオロギの腸内に定着し、乳酸産生を促すことで安全性と栄養価の一部を改善する可能性があることが示された。成長促進や感染抵抗性には明確な効果を示さなかったが、コオロギの乾燥粉末はすでに養鶏や養殖における高タンパク飼料として注目されており、今後は本菌を添加することで、より付加価値の高い飼料資源としての展開が期待される。

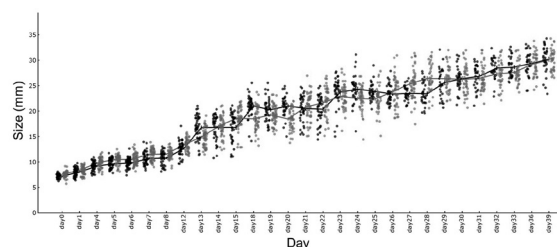


図2 コオロギの成長曲線。縦軸は体長 (mm)、横軸は孵化後日数を示す。実線は平均値、黒色の円は通常食、灰色の円は生きた乳酸菌 (*L. garvieae*) をそれぞれ摂食した群を示す。

## 線虫共生細菌が生産する微生物シグナル分子の探索とその機能解析

今井 優

**【目的】** *Xenorhabdus* 属や *Photorhabdus* 属細菌などの線虫共生細菌は多様な生理活性物質を生産することが知られている。その多くは抗菌活性を指標に発見された抗生物質であるが、これら細菌は抗生物質以外にも様々な有用化合物を生産している可能性がある。もしこれらの線虫共生細菌から、他の微生物の表現型（二次代謝や生育など）に影響を及ぼすシグナル分子を発見できれば、物質生産の現場における生産量の調節や、マイクロバイオームにおける特定微生物の生育促進など、産業的にも価値ある化合物の開発につながると考えられる。以上を背景に本研究では、線虫共生細菌から微生物シグナル分子の探索を試みた。

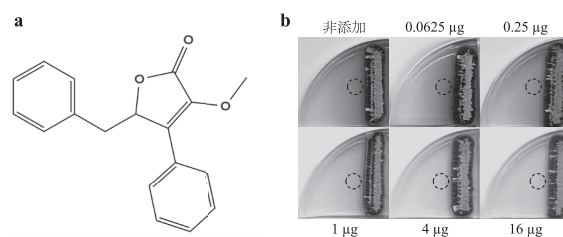
**【方法】** ベルマントレイ法により環境中から線虫を回収し、これらの体内から線虫共生細菌を分離した（合計251菌株）。さらに、カルチャーコレクションなどから分譲を受けた *Xenorhabdus* 属および *Photorhabdus* 属細菌も、スクリーニングの供試菌株として使用した。本研究では、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を検定菌とし、同菌が生産する青色色素性抗生物質アクチノロージンの生産性を指標に微生物シグナル分子の影響を評価した。具体的には、線虫共生細菌と *S. coelicolor* A3(2) を同一寒天培地上で共培養し、アクチノロージンの生産量の増減を観察した。アクチノロージン生産の調節が認められた線虫共生細菌については、有機溶媒（酢酸エチルまたはメタノール）により寒天培地から活性物質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー分析（HPLC）により精製を行った。

**【結果・考察】** 208菌株の線虫共生細菌（本研究で分離した細菌119菌株および分譲株89菌株）と *S. coelicolor* A3(2) をMR5寒天培地上で8日間共培養し、アクチノロージン生産への影響を評価した。その結果、10菌株（4.8%）でアクチノロージン生産の向上が、43菌株（20.7%）でその低下が確認された。本研究ではまず、アクチノロージン生産の誘導が認められた線虫共生細菌をMR5寒天培地で培養後、有機溶媒を用いて培養抽出物を調製した。これを乾固後、*S. coelicolor* A3(2) を接種したMR5寒天培地上にスポットしたが、アクチノロージン生産の向上は確認されなかった。そのため、これら細菌が生産するアクチノロージン生産誘導物質は、有機溶媒により失活する高次構造を持つタンパク質であるか、有機溶媒に溶解しない極性化合物であることが示唆

された。本研究室では、タンパク質や極性化合物の精製が技術的に困難であったことから、アクチノロージン生産を抑制する化合物の単離へと方針を転換した。本研究では *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338, *Xenorhabdus stockiae* DSM 17904 および *Xenorhabdus mauleonii* DSM 17908 などが、共培養により *S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産を再現性よく低減させることを見出している。そこで *X. szentirmaii* DSM 16338 の培養物中から有機溶媒による活性物質の抽出を試みたところ、酢酸エチル抽出物中にアクチノロージン生産を低下させる化合物（化合物A）が存在することを見出した。HPLC分析により活性物質を単離し、質量分析に供したところ、同化合物の分子量が280であることが判った。天然物データベースによる検索から、この化合物が *X. szentirmaii* が生産する Xenofuranone A であることが示唆された（図1a）。現在、核磁気共鳴分析により、化合物Aが Xenofuranone A であるか否かの確認を進めている。

また、化合物Aによる *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝産物生産への影響を詳細に調べるため、0.0625  $\mu$ g から16  $\mu$ g までの範囲でMR5寒天培地上に化合物Aをスポットし、*S. coelicolor* A3(2) を12日間培養した。その結果、化合物Aは最大量（16  $\mu$ g）においても *S. coelicolor* A3(2) の生育を阻害しない一方で、1  $\mu$ g の低量でアクチノロージン生産を低減する効果を示すことが確認された（図1b）。

今後は、RNAシーケンス解析を通じて、*S. coelicolor* A3(2) において、化合物Aの存在下で発現量が変動する遺伝子群を特定し、化合物Aによるアクチノロージン生産の調節メカニズムを明らかにしていく。



**図1** *X. szentirmaii* DSM 16338 が生産する化合物Aによる *S. coelicolor* A3(2) のアクチノロージン生産の抑制。  
**a**; Xenofuranone A の構造。 **b**; MR5寒天培地上における化合物Aによるアクチノロージン生産抑制効果。

## 微生物を用いた物質生産能向上を指向した大腸菌における タンパク質過剰発現耐性機構の解明

中 川 明

**【目的】** 微生物を用いた発酵生産は、化学合成法では難しい化合物を生産することができるため、古くより発展してきた。実際にタンパク質を過剰発現した微生物を用いた有用物質生産は多岐に渡って研究されており、多くの企業でも実用化されている。申請者は、これまでの研究から、殆どのタンパク質を過剰発現させても、程度の差はあるものの、菌が死滅することを見出した。逆に考えると、タンパク質を過剰に発現しても死ににくい大腸菌を創生できれば、現在の物質生産量を劇的に向上させる、いわば微生物を用いた物質生産の概念を根底から覆すようなテクノロジーを生み出すことができると考えられる。そこで、本研究では、過剰にタンパク質を発現させても死滅しにくくなる大腸菌を創生し、物質生産能を根本的に高めることを目的として、申請者が取得したタンパク質過剰発現耐性菌の解析を行う。

**【方法】** *Escherichia coli* BL21 (DE3) 由来のタンパク質過剰発現耐性菌の特性を調べるために、NGSにより、変異箇所の同定を試みた。イルミナシーケンス2回、ナノポアシーケンスを1回、更にはデータ解析も外注で行ったが、変異は発見できなかった。そこで、RNAseqを行ったところ、ppGppが蓄積しているようなプロファイルを得られたことから、ppGpp亢進状態を模倣するため、野生株でのppGpp合成酵素RelAの過剰発現での表現型を解析した。

**【結果・考察】** 空ベクターであるpCDF23を保持した野生株は、IPTG含有培地で培養を開始すると、図1の野生株に示す通り、著しい生育の開始の遅延が見られる。この遅延が起こらなくなる変異株をトランスポゾンmutagenesisにより取得した。すなわち、トランスポゾンで作用させた菌株を培養し、野生株の培養液よりも早く生育するような変異株である。本変異株にドーパデカルボキシラーゼをT7プロモーターにより過剰発現させたところ、タンパク質発現量も野生株とほぼ同等であった。この変異株は、トランスポゾン除去してもこの形質は維持されたことから、トランスポゾン導入による変異はこの表現型に直接は関与していなかった。よって、本菌株は、耐性菌取得の過程で得られた変異によるものであることが強く示唆され、その変異の同定を試みた。

ゲノムシーケンスの結果、変異が発見できなかった。同時に本研究室の保有するBL21 (DE3) 野生株、す

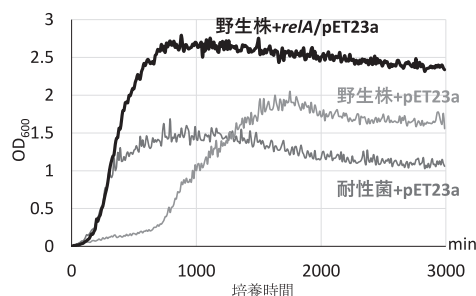


図1 耐性菌と野生株のIPTG存在下での生育及びrelA過剰発現の効果

なわちタンパク質過剰発現耐性菌の親株についてもシーケンスを行ったが、KEGGデータベースに比べ、3つのナンセンス変異が確認された。この変異は耐性菌にも当然継承されており、これを検出できていることから、本タンパク質過剰発現耐性菌は、単純な点変異ではない変異によるものと推察される。現在、rDNA等の細かいシーケンスを確認中である。

続いて、RNAseqによるトランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、野生株に比べ、多くのアミノ酸合成系、転写因子やリボソームタンパク質、複製関連遺伝子の発現が抑制され、様々なストレス応答に寄与する*elaB*、リボソームの複合体形成に関与する*rmf*、脂質合成系FadRレギュロン、その他種々のストレス応答に関与する遺伝子群の発現上昇が観察された。この結果は、微生物で重要なppGppというアラモンによって制御される様式と多く一致しており、本タンパク質過剰発現耐性菌において、ppGppが野生株に比べて蓄積していると考えられた。そこで、野生株にppGpp合成酵素RelAをpET23aにクローニングし、T7プロモーターによって過剰発現させたところ、タンパク質過剰発現時の生育が耐性菌と同等であることが見出された(図1)。現在、ppGppの測定系の確立を検討しており、実際のppGpp濃度をもってその可能性を評価する予定である。

ppGppは通常生育を抑える働きを持っており、このようなポジティブな働きは殆ど前例がない。ppGppは多くの微生物にとって必須の化合物であり、このようなポジティブな働きの解明は、学術的に非常に重要である。今後は、ppGppの量の制御やその下流の原因遺伝子を特定し、メカニズムの解明を遂行する。

## クオラムセンシングを活用したアナモックス群集形成の迅速・安定化と温室効果ガス抑制型排水処理法への適用

西村 文武

**【目的】** 本研究では、アナモックス細菌(以下、Anammox)の初期集積培養の高速化と環境ストレスに対するレジリエンス向上を目指し、近年知見が収集されつつあるクオラムセンシング(QS)を活用した微生物群集形成の迅速化および活性向上のための検討を行った。具体的には、A処理場のAnammox反応槽からのオートインデューサー(AI)の検出、検出されたAIおよび文献調査より抽出したAI混合添加による初期集積培養の検討、回分式実験によるAnammox活性化に有効なAIの選定実験、選定したAI添加によってAnammoxの再活性化が行えるかどうかの検討を行った。

**【方法】** A処理場のAnammox反応槽より採泥したグラニュール汚泥からAIを抽出し、固相抽出法(Oaisi, HLB)により精製した。汚泥中のAIは酵素による分解を避けるため、Protease Inhibitor C (PIC; Sigma-Aldrich)とProtease Inhibitor P (PIP; Roche)を添加してホモジナイズし、水試料、汚泥試料ともに固相抽出法にて精製した。AI種の同定は、京都大学桂キャンパスにある、液体クロマトグラフィー-イオンモビリティ型四重極飛行時間型質量分析計(LC/IM-QToF-MS, Agilent製)を用いて行った。また、A処理場から検出されたAIおよび文献調査より抽出したAI(表1)の混合添加による初期集積培養の検討(実験1)、回分式実験によるAnammox活性化に有効なAIの選定実験(実験2)、選定したAI添加によってAnammoxの再活性化が行えるかどうかの検討(実験3)を行った。

**【結果・考察】** 実験1ではB浄化センターの硝化槽から採取した汚泥を担持させた不織布を透明塩ビパイプ(177mL)に入れた上流式リアクターを準備し、AI添加(表1のAIそれぞれ2μM混合添加)とAI無添加系で70日間通水実験を行った。その結果、AI添加系では、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>は最大81%、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>は最大で100%の除去率を示したが、その後36%まで低下した。なお、AI添加系ではNO<sub>3</sub><sup>-</sup>は検出されなかった。無添加系では、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>2</sub><sup>-</sup>ともに100%の除去率が得られ、AI添加系よりも高い除去率を示した。AI添加なしでは、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が49日目で降検出された。これらの結果からAI添加系では硝化槽内から得た活性汚泥からの集積培養系において、Anammox以外の共存微生物によるAIの消費やAIの混

合添加による活性阻害が起きたことが考えられる。

表1 添加したAI

AI	化学構造
C6-HSL (ToFで検出)	
C8-HSL (文献より抽出)	
3-oxo-C6-HSL (文献より抽出)	
3-oxo-C8-HSL (文献より抽出)	
3-oxo-C16-HSL (ToFで検出)	

実験2ではグラニュール汚泥に対して、AI添加あり(表1に示すAIを2μMとなるように単一で添加)となし条件で12時間の回分式実験(n=3)を行った。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N除去率は、AI添加なしで37.1%、AI添加でC6-HSLで41.6~53.8%となった。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N除去率は、AI添加なしで33.8%、AI添加で31.8%、から50.9%となった。全体的にAI添加系の方がNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NやNO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nの除去率が良く、C6-HSL、3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C6-HSLがAnammox活性を向上させるAI種であることがわかった。実験3では上記AIのうち2種(C6-HSL、3-oxo-C6-HSL)を処理性能の低下しているAnammox上流式リアクター(HRT:24時間、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N1除去率10%)に2μMで8日間連続通水したところ、AI添加なしでは15%、C6-HSLで20%、3-oxo-C6-HSLで21%となり、比較的短期間で除去率を回復できる可能性があることを示した。

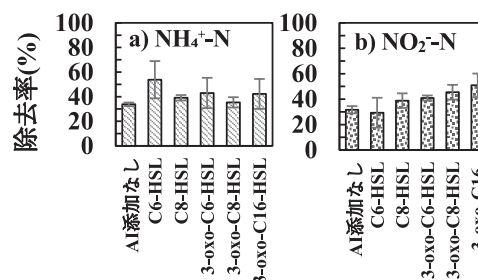


図1 回分式実験におけるa) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nおよびb) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Nの除去率(実験2)

## 2023 年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2023 年 4 月～2025 年 3 月

## 日本産 *Cytospora* 属菌の分類学的再検討および種多様性の解明

服部 友香子

【目的】 *Cytospora* 属菌 (Cytosporaceae, Diaporthales) は、樹木の枝や幹に永年性のがんしゅ症状を引き起こす植物病原菌である。日本国内では、本属菌による病害として、りんご腐らん病、キリ腐らん病、サクラやナナカマドの胴枯病が知られ、東北や北海道などの地域で被害が多発している。これまでに本属菌は世界で600種以上記録されており、現在中国を中心にDNA塩基配列を用いた分子系統解析による分類学的所属の再編が進められている。本属の学名は、現行の命名規約において先名権を持つ無性時代の学名 *Cytospora* が用いられるようになったが、我が国では未だに有性時代の学名 *Valsa* が使用されているだけでなく、日本を原記載地とする種に関しては、いくつかはタイプ標本の所在が不明であり、それらの分類学的位置付けについて100年以上再検討されていない。本研究では、日本産 *Cytospora* 属菌の分類学的所属の整理と種多様性の解明を目的とし、種によっては、再記載のためのタイプ標本とするためのサンプルの収集を行うとともに、それらの形態的特徴の観察、多遺伝子座を用いた分子系統解析を行い、日本産 *Cytospora* 属菌の分類学整理を行なった。

【方法】 2022年から2023年にかけて、*Cytospora* 属による樹木の枝枯・胴枯性病害の探索および採取を行なった。採取したサンプルからは、単孢子分離法あるいは組織分離法にて菌株を分離した。分離菌株はPDA培地上で培養し、菌叢および菌体の形態学的特徴の観察を行った。さらに、日本産 *Cytospora* 属菌の分子系統学的位置の解明のため、新たに得られた分離菌株と合わせて、森林総合研究所が所有する保存菌株を用いて分子系統解析を行なった。各供試菌株からは全DNA抽出を行い、PCR法によりrDNA ITS, LSU, act, tef1, tub2, rpb2の各領域を増幅した後、オートシーケンサーで塩基配列情報を取得した。得られた日本産株の配列と既知種の公開された塩基配列情報を用いて、データマトリックスを作成した。その後、Modeltest-NGにより各配列に対する最適な進化モデルを選択し、RAxML-NGを用いて最尤系統樹を作成した。各ノードは、1,000回反復のブートストラップ検定にて評価した。また、北海道大学総合博物館にて、日本を原記載とする *Valsa* 属菌のタイプ標本の探索を行った。

【結果・考察】 これまで報告の多かった北日本地域を中心として、北海道(道北・道央・道南)、青森、岩手(盛岡、

八幡平)、山形、宮城、茨城(北茨城、つくば)、群馬、東京、長野、愛知、和歌山、奈良、島根、鹿児島県の調査地において、ナナカマド、サクラ、リンゴ、スギ、キリの *Cytospora* 属による枝枯・胴枯性病害のサンプルを採取した。これらのサンプルからの分離菌株と保存菌株を合わせた日本産 *Cytospora* 属菌株80株の分子系統解析の結果、ITS系統樹上で日本菌株はそれぞれ独立した16クレードに分かれ、その内7クレードは、既知種 *C. ceratosperma*, *C. discoastoma*, *C. germanica*, *C. japonica*, *C. mali*, *C. platycladi*, *V. paulowniae* と考えられた。残りの9クレードは既知種を含まない新規の独立クレードと推測され、日本産 *Cytospora* 属菌は多様な種を含むことが明らかになった。また、北海道大学総合博物館にて、宮部金吾博士や逸見武雄博士らが採取した *Valsa* 属菌の標本を多数発見した。これらの標本には、新たな標本番号(SAPA)を付与いただいた(SAPA300-352, 1260-1265)。その中には、キリ腐らん病菌 *V. paulowniae* (図1)の記載時に観察されたタイプと考えられる標本(SAPA300-313)も含まれていた。これらのタイプと考えられる標本および新たに採取されたキリ腐らん病標本の形態的特徴の観察・比較の結果、日本原産種である *V. paulowniae* は、*Cytospora* への転属が必要であることが明らかとなったため、レクトタイプおよびエピタイプの指定、転属処理を行なった(Hattori et al. 2024)。本研究により、日本産 *Cytospora* 属菌の分子系統学的位置が明らかになり、一部の種については分類学的整理が進んだ。その一方で、タイプ標本が現存しない分類学的所属の再検討が必要な日本原記載種や、本研究で発見された未記載種が残された。これらについてはさらなる調査、検討が必要である。

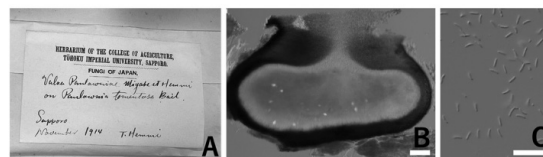


図1 *C. paulowniae*. A SAPA 標本, B 分生子果, C 分生子. Bars B 100 $\mu$ m, C 20 $\mu$ m.

【謝辞】 本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、標本探索にご協力いただきました北海道大学総合博物館 小林孝人博士に深く感謝申し上げます。



## 「海獣の粘液」を用いた海洋細菌の分離培養技術の構築

中 島 悠

【目的】イルカの口腔微生物叢は、腸内細菌や海水、他の海獣の微生物叢とは大きく異なる。これまでのメタゲノム解析をベースにした研究により、希少な系統の中には周辺に動物由来の再構築ゲノム (MAG) が全くなく、イルカ口腔由来のものが独立して存在するものもある。イルカの口腔には、他の哺乳類にはない特殊な粘液が分泌されることが知られており、これが特殊な微生物叢形成の鍵になると考え、口腔や粘液、海水試料の網羅的な遺伝子解析や FISH、成分分析などを通して、海獣の粘液が新規の分離培養技術の基盤とすることを目的とした。

【方法】口腔粘液の安定的かつ充分量のサンプリングができなかったため、口腔や腸内細菌、飼育水槽のデータ解析から特殊な系統の分布を明らかにすることとした。鳥羽水族館にて飼育されているイロワケイルカ、スナメリ1個体ずつの口腔スワブサンプル、ジュゴン1個体由来の糞便サンプルからDNA抽出を行い、MGI社DNBSEQシーケンサーにて配列の解読を行なった。ジュゴン糞便は、餌の主要成分がアマモの日(アマモ食1~3)とロメインレタスの日(レタス食)の合計4サンプルを解析した。また、上記2種のイルカに加え、大洗水族館にて取得済みの別種イルカ(バンドウイルカ・カマイルカ・オキゴンドウ)のデータも合わせて解析を実施した。また、シーケンスリードを得られた再構築ゲノム (Metagenome-assembled Genome: MAG) にマッピングし、相対存在量の推定を行なった。

【結果・考察】得られた配列をアセンブル、ピニングし、GTDB-Tk v.2によって分類群のアサインを行なった。各海獣から得られた medium-quality 以上の MAG は、表1の通りである。このうち、属以上で分類群が当たらなかったものを新規 MAG とした。

表1 新たに海獣メタゲノムから得られた MAG

サンプル名	合計 MAG	新規 MAG
イロワケイルカ	17	2
スナメリ	42	7
ジュゴン (アマモ食1)	55	4
ジュゴン (アマモ食2)	54	5
ジュゴン (アマモ食3)	81	6
ジュゴン (レタス食)	56	6

これらの系統解析の結果、細菌共生性の細菌である CPR (Candidate Phyla Radiation; *Minisyncocota* 門) のうちイロワケイルカから1つ、スナメリから2つの MAG を得た。予察的な解析として行っていた3種のイルカにおいては、合計7つの MAG を得ていたものの、それらとは網レベルで異なっていた。この内、*Saccharimonadia* と呼ばれる

未培養な綱はこれまでの研究で自然環境クレードと動物共生クレードが存在し、共生菌への移入は進化的に2回とされていた。しかし、本研究による詳細な解析により、少なくとも3回の移入があった可能性が示された。また、*Saccharimonadia* 以外の綱においても、近縁系統に動物共生が存在しない MAG を得ており、従来考えられていたよりも多く動物共生への移入が起こっていると考えられる。

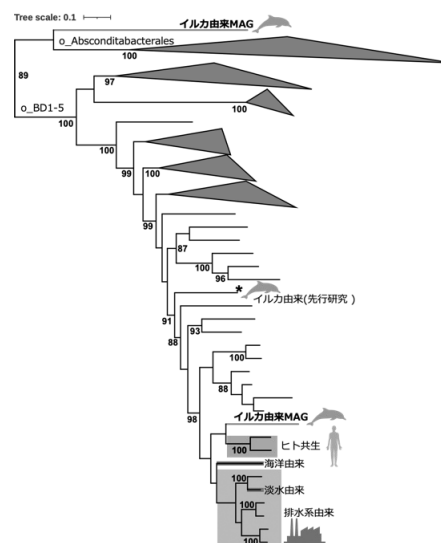


図1 CPR (Minisyncocota 門) の未培養綱JAEDAM01系統のゲノム系統樹

また、スナメリ・イロワケイルカから得られた BD1-5 と呼ばれる暫定的な目に属する MAG は、既知の系統 (図1, \*印) とは別属のものが得られた。さらに BD1-5 やその姉妹群にあたる Absconditabacterales 目と、目レベルで異なる可能性のある MAG を得た。これらの MAG を用いて、ジュゴンのメタゲノムリードをマッピングしたところ、一致するリードはほぼ0%であった (~10リード/1800万リード)。

公開されている海洋メタゲノムの MAG が周辺にないことから、自然環境中における存在量は非常に少ないとみられるものの、水族館の飼育海水のアンプリコンシーケンスを用いた解析によると、当該系統は0.1%程度存在している可能性がある。つまり、イルカ口腔およびその飼育環境では自然環境中に比べて当該系統が一定以上放出されていることを示している。今後、通常の海水との差分として飼育海水の時系列的な解析や、口腔内への侵入経路のさらなる検討(母乳・胎便など)も行い、口腔や粘液による特殊系統の集積という作業仮説を明らかにする。

## 二枚貝に生息する新規海洋性マイコプラズマの単離と分類体系の再構築

水谷 雪乃

**【目的】**細胞壁を持たず、非常に小さな細胞サイズとゲノムサイズを特徴とするマイコプラズマ (*Mycoplasma*) は、これまで主に陸生動物から単離されてきたが、近年海洋生物からも検出・単離されている。特に二枚貝サルボウガイの中腸腺 (Mizutani et al. 2025) や、スコットランドの養殖産またはノルウェーの野生アトランティックサーモンの腸内 (Cheaib et al. 2021, Rasmussen et al. 2023) など様々な海洋生物から検出されている。また2019年にはRamírezらによって、イカヤタコから新種の *Mycoplasma* が単離された。我々はこれまでに海洋生物由来 *Mycoplasma* の 16S rDNA を用いた系統解析の結果、海洋生物由来のものは既存種とは異なる配列をもつことが示唆されたことから、本研究では二枚貝に生息している新奇 *Mycoplasma* 属細菌の単離とその分類学的位置づけを明らかにすることを目指した。

**【方法】**アコヤガイ 3 個体 (2023 年 10 月, 三重県), マガキ 84 個体 (2024 年 2 月, 兵庫県), ハマグリ 42 個体 (2024 年 6 月, 三重県), サルボウガイ 18 個体 (2024 年 9 月, 佐賀県), ヤマトシジミ 45 個体 (2024 年 2 月, 三重県), アサリ 93 個体 (2024 年 7 月, 福岡県) からリンパ液または内臓のホモジナイズサンプルを採取し DNA を抽出した。Ramírezら (2019) の方法を参考にし, 0.1 μm フィルターでろ過したリンパ液も培地成分として利用して *Mycoplasma* 属細菌の単離を試みた。またリンパ液から得られた細菌および培養サンプルに対する, *Mycoplasma* 属特異的 nested-PCR 法により本細菌の有無を確認した。*Mycoplasma* の存在が示唆されたサンプルについてメタゲノム解析を行い, 宿主ゲノムの除去, プロファイリング (MetaPhlan4), アセンブル (Megahit), 各種ビンニング, 品質チェック (CheckM2), 分類 (BAT) により Metagenome-Assembled Genomes (MAGs) を獲得した。さらに系統解析 (PhyloPhlan4) およびオーソログ解析 (OrthoFinder) を行った。

**【結果・考察】**培養を挟まないリンパ液からの直接抽出では, サルボウガイ, アサリ, ハマグリから *Mycoplasma* が検出された。培養実験では, アサリとハマグリからマイコプラズマが検出されたが, 平板培地での単離には至らなかった。メタゲノム解析では, ハマグリを除く全てのリンパ液サンプルで DNA 濃度が基準値に達しなかったため, 中腸腺サンプルを使用した。中腸腺

サンプルでは 90% 以上が宿主ゲノムとして除去される中, 複数の MAGs が得られた (表 1)。特にサルボウガイ

表 1 二枚貝由来 MAGs の品質評価と分類学的位置づけ

サンプル	完全度	混入率	近縁種 (類似度)
ハマグリ 1	21%	0%	<i>Haemophilus</i> (83%)
ハマグリ 2	72%	6.0%	Pasteurellaceae (88%)
アサリ 1	7.8%	0%	Bacteria (40%)
サルボウガイ 1	55.6%	1.4%	Lactobacillales (45%)
サルボウガイ 2	65.4%	0.2%	Bacteroidetes (36%)
サルボウガイ 3	54.3%	5.6%	<i>Mycoplasma</i> (56%)
サルボウガイ 4	64.7%	9.9%	<i>Mycoplasma</i> (35%)

イの中腸腺サンプルからは, ゲノムの完全度は低いものの, *Mycoplasma* に分類されるゲノム情報が得られ, 系統解析の結果, サルボウガイ由来の MAGs はイカヤタコから単離された *Mycoplasma todarodis* や *Mycoplasma marinum* とクラスターを形成した (図 1)。このグループは

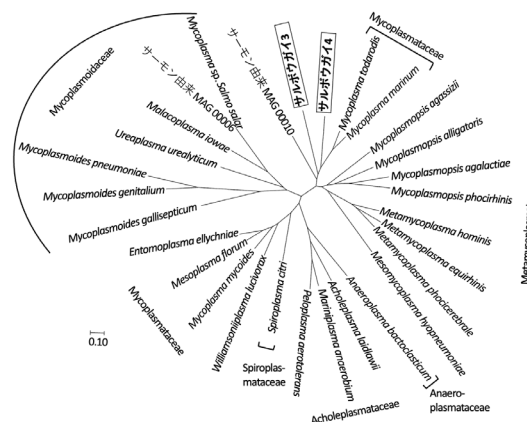


図 1 PhyloPhlan4 による海洋生物由来マイコプラズマとその近縁種の系統解析結果。

現在 *Mycoplasma* 属に分類されているが, Metamycoplasmataceae の新属, もしくは新しい科になる可能性が示唆された。オーソログ解析では, 海洋生物由来の株に特異的な遺伝子が 424 タイプ存在し, それらには糖質化に関する遺伝子や貝類の糖貯蔵に利用されるグリコーゲン分解に関する遺伝子が含まれていた。一方で, アンモニアからグルタミンを合成する遺伝子も含まれており, 海洋由来の本細菌群は宿主に対して益にも害にもなりうる代謝的二面性を示していることが示唆された。

# 新規菌根菌 Fine Root Endophytes の分離によるモデル菌株の確立

吉野 花奈美

**【目的】** 本研究では、新規の菌根菌である Fine Root Endophytes (以下, FRE) のモデル菌株の選抜を目指す上で不可欠な, FRE の多様性の解明と分離培養方法の検討を目的とした。特に, FRE は植物への窒素供給力や湛水耐性が高いため, 栽培に多くの窒素を必要とし, 水田で栽培されるイネを研究対象とした。

**【方法】** まず, FRE の水田における多様性を解明するため, つくば市および宇都宮市の水田で, 継時的にイネ 4 品種の根をそれぞれ採取し, DNA を抽出した。つくば市で採取した IR64 および Kinandang Patong (以下 KP) については DNA 抽出後, FRE が属する Endogonomycetes 綱のリボソーム DNA 特異的プライマーの PCR を行い, Endogonomycetes 綱の配列を検出した。Endogonomycetes 綱の配列を検出した IR64 (5 サンプル) と KP (9 サンプル), 宇都宮市で採取したマツリバレ (6 サンプル) とコシヒカリ (6 サンプル) のリボソーム DNA を増幅し, Amplicon-seq による群集組成解析を行った。次に, 水田のイネの根やミカヅキゼニゴケから FRE を分離培養するため, 培地や次亜塩素酸カルシウム水溶液による分離源の表面殺菌方法を検討した。ミカヅキゼニゴケは菌が感染していないと考えられる無性芽から葉状体形成まで培養し, イネの根と共培養することで FRE を 2 次感染させた後, 分離培養することを目指した。

**【結果・考察】** 特異的プライマーにより IR64 と KP の両方で生育ステージの長期 (分けつ期から登熟期) に渡って, Endogonomycetes 綱の配列が検出された。一方, 地上部を刈り取った後の根からはほとんど Endogonomycetes 綱の配列が検出されなかった。これらのことから Endogonomycetes 綱がイネの生育に関わっている可能性が示唆された。Amplicon-seq では菌類のユニバーサルプライマーで増幅したため, Endogonomycetes 綱が属する Mucoromycota 門の他に子囊菌門や担子菌門, アーバスキュラー菌根菌を形成する Glomeromycota 門の菌類も検出された。全菌類中での Endogonomycetes 綱の相対存在量の平均は IR64 で 0.6%, KP で 7.8%, コシヒカリで 55.2%, マツリバレで 79.1% と差が大きかった。この差は採取地や DNA 抽出方法の違いによると思われる。Endogonomycetes 綱と Glomeromycota 門の配列のみ抜き出した相対存在量を図 1 に示す。ただし, 全菌類中での Endogonomycetes 綱の相対存在量の平均に差があるため, 系統間での割合の比較はできなかった。コシヒカリとマツリバレからはそれぞれ 6 サンプル中, 2 と 4 サンプルのみ Endogonomycetes 綱が検出された。イネ 4 品種すべてで Endogonomycetes 綱の Unemaeales 目が共通して検出され, Unemaeales 目が水田に広く分布している可能性が示唆された。さらに, コシヒカリとマツリバレからは Glomeromycota 門が検出されなかったことから, 水田のイネの根においては Glomeromycota 門に属する AMF よりも Endogonomycetes 綱に属する FRE が優占している可能性が示唆された。次に Unemaeales 目が検出された水田のイネの根から FRE の分離培養を試みた。予備試験として Endogonomycetes 綱に属する *Sphaerocreas pubescens* を複数の培地で培養した結果, Modified Norkrans' C (MNC) 培地で培養可能であった。また, 顕微鏡観察からイネの根の表皮に FRE と推測される菌糸を確認した。そこで, 次亜塩素酸カルシウム水溶液を使用して表面殺菌した根を MNC 培地に接種し, FRE の分離を試みた。その結果, 短時間や低濃度の表面殺菌であってもほとんど菌が分離できなかった。この原因として表面殺菌により表皮付近の菌が死滅することが考えられた。そこで, イネの根を培土に埋め, その上にミカヅキゼニゴケの葉状体を接種した。ミカヅキゼニゴケの葉状体は根よりも厚い構造をしているため, 表面殺菌後も葉状体から菌が分離できると考えられ, 現在, 培養を継続中である。

プル中, 2 と 4 サンプルのみ Endogonomycetes 綱が検出された。イネ 4 品種すべてで Endogonomycetes 綱の Unemaeales 目が共通して検出され, Unemaeales 目が水田に広く分布している可能性が示唆された。さらに, コシヒカリとマツリバレからは Glomeromycota 門が検出されなかったことから, 水田のイネの根においては Glomeromycota 門に属する AMF よりも Endogonomycetes 綱に属する FRE が優占している可能性が示唆された。次に Unemaeales 目が検出された水田のイネの根から FRE の分離培養を試みた。予備試験として Endogonomycetes 綱に属する *Sphaerocreas pubescens* を複数の培地で培養した結果, Modified Norkrans' C (MNC) 培地で培養可能であった。また, 顕微鏡観察からイネの根の表皮に FRE と推測される菌糸を確認した。そこで, 次亜塩素酸カルシウム水溶液を使用して表面殺菌した根を MNC 培地に接種し, FRE の分離を試みた。その結果, 短時間や低濃度の表面殺菌であってもほとんど菌が分離できなかった。この原因として表面殺菌により表皮付近の菌が死滅することが考えられた。そこで, イネの根を培土に埋め, その上にミカヅキゼニゴケの葉状体を接種した。ミカヅキゼニゴケの葉状体は根よりも厚い構造をしているため, 表面殺菌後も葉状体から菌が分離できると考えられ, 現在, 培養を継続中である。

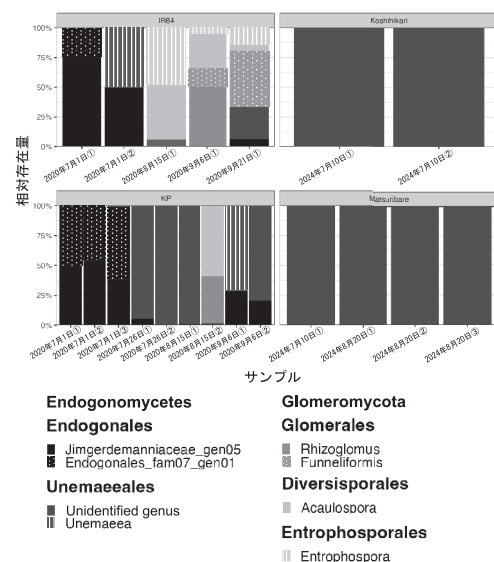


図 1 水田のイネの根における Endogonomycetes と Glomeromycota の相対存在量

## ムコール症原因真菌における細胞内共生細菌の保有実態とその多様性、および宿主伝搬性の解明

高島 勇介

**【目的】**糸状菌の細胞内共生細菌“エンドバクテリア”がムコール症原因真菌に及ぼす影響として、*Rhizopus* 属菌の病原性向上や抗菌薬アムホテリシンBへの感受性低下が報告されている。しかし、その保有実態および多様性の把握は十分ではない。本研究では、ムコール症感染予防・治療に関わる研究基盤形成のため、エンドバクテリア保有実態・多様性の把握、その宿主間伝搬性の解明および病理研究リソースの確保を目的とした。

**【方法】**複数の国内外の菌株保存機関（CBS, IFM, MAFF, およびNBRC）からの分譲により入手、または野外試料より分離したケカビ目17属220菌株（表1）について、16S rRNA 遺伝子特異的ユニバーサルプライマー（27F/1492R）を用いたPCRによるエンドバクテリアの検出を試みた。また、菌糸破砕液をメンブレンフィルターで濾過した細菌画分を調製し（図1C）、BCYE $\alpha$ 寒天培地で培養することでエンドバクテリアを分離した。得られた培養株について、ナノポアおよびイルミナシーケンサーを用いてゲノム決定し、Average Nucleotide Identity（ANI）を算出した。代謝経路の比較にはblastKOALAおよびKEGG mapperを用いた。

**【結果・考察】**PCR増幅により、220菌株中53菌株から細菌が検出された（表1）。そのうち52菌株は*Rhizopus* 属菌であり、IFMに保存されていた*Rhizopus* 属菌4菌株も含んでいたことから国内臨床菌株にエンドバクテリアが存在することが明らかになった。BLAST検索の結果、*Rhizopus* 属菌から検出されたのはすべて*Mycetohabitans* 属細菌であった。一方、残りの*Saksenaea* 属菌では、宿主の分類学的検討を行い、*S. boninensis*として記載し、新規エンドバクテリア（SakBRE）の培養に成功した（図1）。

*Rhizopus* 属菌を宿主とするエンドバクテリア18菌株の培養株を確立した。また、*Mycetohabitans* 属細菌（11菌株）およびSakBRE（1菌株）について、完全ゲノムを決定した。既知ゲノムを含めてANIを算出した結果、95%の閾値で*Mycetohabitans* 属細菌は6系統に分かれ、本研究で得た培養株は、6系統中2系統に位置し、IFM菌株由来培養株も同2系統に含まれていた。このことは系統的に単一ではない*Mycetohabitans* 属細菌が国内臨床*Rhizopus* 属菌株に存在することを示していた。

SakBREの比較ゲノム解析の結果、システイン合成に関わる遺伝子は保持している一方で、硫黄源の取り込みに必要な硫酸/チオ硫酸トランスポーター遺伝子を欠いていた。また、システインを含まないBCYE $\alpha$ 寒天培地

では生育が制限されたことからSakBREは宿主細胞内のシステインに依存していると考えられる。これらの結果は、ケカビ目内の異なる属の宿主に共生するエンドバクテリアが、それぞれ異なるシステイン代謝を進化させてきたことを示し、代謝の違いが宿主依存性や特異性に関与する可能性を示唆していた。本研究により、エンドバクテリア保有糸状菌およびエンドバクテリア培養株の研究リソース計27菌株（主にNARO ジーンバンクに寄託）が整備され、ムコール症原因真菌の感染にエンドバクテリアが及ぼす影響の検証が今後可能になった。

表1 供試菌株数およびエンドバクテリア検出菌株数

属名	供試菌株数	検出菌株数
<i>Actinomucor</i>	5	0
<i>Calcarisporiella</i>	4	0
<i>Circinella</i>	8	0
<i>Cokeromyces</i>	1	0
<i>Cunninghamella</i>	6	0
<i>Ellisomyces</i>	1	0
<i>Fennellomyces</i>	1	0
<i>Gilbertella</i>	2	0
<i>Hyphomucor</i>	2	0
<i>Lichtheimia</i>	7	0
<i>Mucor</i>	24	0
<i>Mycotypha</i>	2	0
<i>Rhizomucor</i>	11	0
<b><i>Rhizopus</i></b>	<b>132</b>	<b>52</b>
<i>Saksenaea</i>	1	1
<i>Syncephalastrum</i>	12	0
<i>Thamnostylum</i>	1	0
合計	220	53

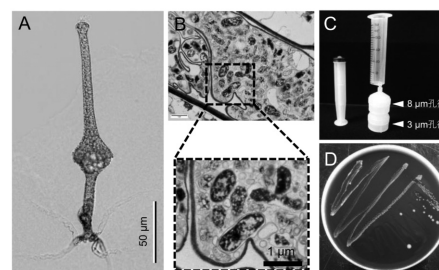


図1 小笠原諸島母島のリターより分離された新種*Saksenaea boninensis*の形態(A)。本種菌糸内エンドバクテリアの透過型電子顕微鏡観察像(B)。菌糸破砕液をメンブレンフィルター(C)で濾過した細菌画分をBCYE $\alpha$ 寒天培地で培養して得たSakBRE培養株(D)。

# 活性硫黄シグナルを考慮した新たなレドックスシグナル伝達概念の構築

清水 隆之

【目的】全ての生物は、レドックス（酸化還元）反応に基づいてエネルギーや生体高分子を産生している。これは、「いかにレドックス状態を保ちながら生命活動を行うか」が生命現象の本質であることを示している。私は、「活性硫黄」によるレドックス制御システムから生命現象を理解することを目指している。

活性硫黄は、分子内に過剰な硫黄原子が付加されたポリスルフィド化合物で、求核性と求電子性の両方の性質を有するレドックス活性に富んだ分子である（図1）。

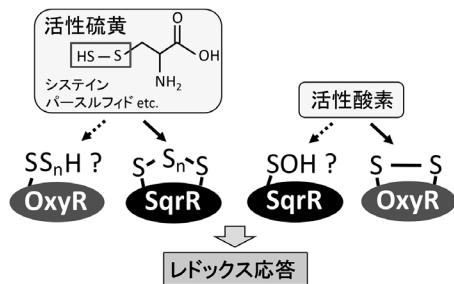


図1 活性硫黄とROSによるレドックス応答モデル

私はこれまでに、硫化水素要求性の紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* から、活性硫黄応答性の転写因子 SqrR を同定し、SqrR のシステイン残基が活性硫黄によってポリスルフィド修飾を受けることで転写活性制御がなされることを発見した。このシステインの酸化還元状態に基づいた応答機構は、活性酸素（ROS）の応答機構と類似しており、両者には化学的・進化的に深いかわりがあると推測された。実際に私は、SqrR と ROS 応答因子 OxyR による転写制御が、*R. capsulatus* において一部冗長的であることを見出している。

本研究では、SqrR と OxyR に着目して、活性硫黄と ROS に応答した転写制御機構を解析することで、新たなレドックスシグナル制御機構の提唱を目指した（図1）。

【方法】レドックス応答における活性硫黄と ROS の影響を包括的に理解するために、活性硫黄応答の制御因子 SqrR および ROS 応答の制御因子 OxyR に着目して、トランスクリプトーム解析を行った。*R. capsulatus* (SB1003, 研究室保有株) の野生株, *sqrR* 欠損株, *oxyR* 欠損株, *sqrRoxY* 二重欠損株に対して、培養液に硫化水素ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) あるいは過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を添加し、添

加前後の転写物量の変化を RNA-seq によって解析した。

さらに、SqrR と OxyR に依存した活性硫黄・ROS に応答した転写制御機構を解明するために、トランスクリプトーム解析で特徴的な変化が見られた3つの遺伝子に着目して、*sqrR* と *oxyR* のシステイン点変異株を用いて、活性硫黄と ROS に応答した転写物量変化を精査した。

【結果・考察】トランスクリプトーム解析の結果、SqrR と OxyR は活性硫黄と ROS の両方に応答するが、各制御因子による特異的な制御と、両制御因子による協調的な制御が広く存在することが明らかになった（図2）。つまり、本応答には特異性と冗長性があることが示唆された。

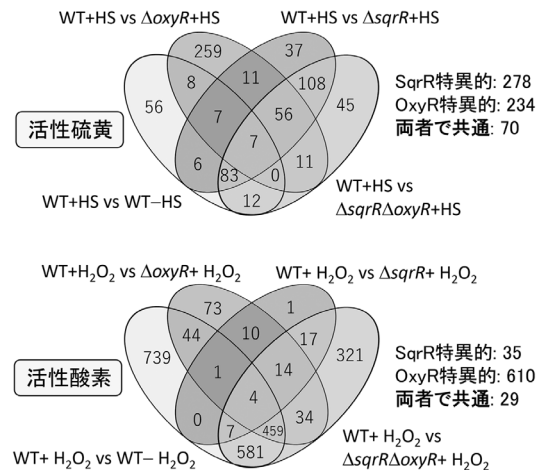


図2 活性硫黄・ROS に応答した転写物量解析

SqrR は活性硫黄をシステイン残基のポリスルフィド修飾で検知し、OxyR は ROS システイン残基の酸化で検知することがわかっている。そこで、システイン点変異株を用いて、活性硫黄・ROS に応答した転写物量変化を精査することで、各応答で重要なシステイン残基を同定した。興味深いことに、SqrR による ROS 応答、OxyR による活性硫黄応答では、システイン残基の寄与が少ない、あるいは応答に関係ないことがわかった。これは当初予想していたシステイン残基の修飾とは異なる分子機構で活性硫黄や ROS に応答している可能性を示唆する。

以上より、活性硫黄と ROS によるレドックス応答を明確化したが、その分子機構には、システイン残基の修飾とは異なる未知のしくみの可能性が見出された。

## ミトコンドリアにおけるタンパク質膜挿入プロセッシングの解明

竹田 弘法

**【目的】** ミトコンドリアはATPを合成するエネルギー工場として機能する。ミトコンドリアが正常に機能するためには、サイトゾルで合成されたタンパク質が、ミトコンドリア内の適切な区画に配送されなければならない。SAM (Sorting and Assembly Machinery) 複合体はタンパク質をβバレル構造へと整形すると同時に、ミトコンドリア膜に挿入するタンパク質挿入装置である。申請者はこれまでに、SAM複合体の電顕構造を決定し、SAM複合体による基質結合と膜リリースの分子メカニズムを解明した(図1)。しかし、どのようなプロセスで反応が進行するのかは依然として不明である。SAM複合体はこの極めて複雑な反応を、いかにして可能にしているのか。本研究では、この謎を解明するために、様々な状態にあるTom40 (Translocator of Outer Membrane 40)を含むSAM複合の立体構造をクライオ電子顕微鏡により決定することで、SAM複合体による基質Tom40の膜挿入プロセスの全貌を解明する。

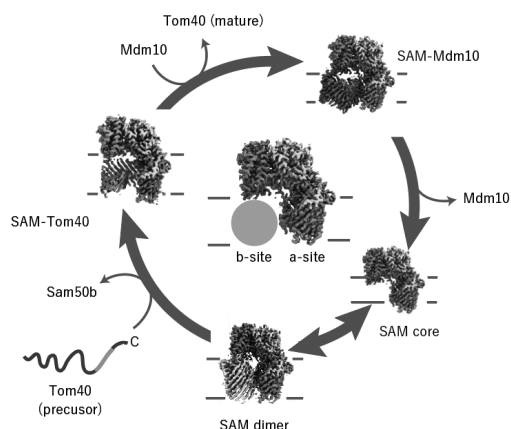


図1 SAM複合体による基質交換反応

**【方法】** 酵母細胞 (*Saccharomyces cerevisiae*) から単離したミトコンドリアを、界面活性剤ジギトニンにより可溶化し、アフィニティー精製およびゲル濾過精製を行った。クライオ電子顕微鏡によって、精製SAM-Tom40超複合体の単粒子解析を行い、3Dクライオマップを基にタンパク質構造を決定する。得られたSAM-Tom40超複合体の立体構造から、①Tom40のβバレル構造はどのように形成されているか、②その間にSAM複合体はどのようにしてTom40の折りたたみを触媒するのかについて考察することで、SAM複合体による基質タンパク

質の膜挿入メカニズムを解明する。

**【結果・考察】** 我々は、SAM複合体が補助装置Mdm10 (Mitochondrial Distribution of Morphology 10) と協働して、Sam50・膜挿入されたTom40・Mdm10を入れ替えながら、基質タンパク質の膜挿入と膜リリースの反応サイクルが駆動することを証明した (H. Takeda *et al.*, *Nature* 2021)。しかし、依然としてSAM複合体が基質タンパク質をβバレル構造へと整形しつつ、膜へ挿入するメカニズムは未だ不明であった。我々は、SAM複合体に結合して固定化される基質Tom40変異体 (G354A) を同定し、SAM複合体とともに大量発現させ、精製を試みた。その結果、SAM-Tom40超複合体を精製することができた。続いて、クライオ電顕による構造解析に進んだところ、SAM-Tom40超複合体の構造を決定することに成功した。この構造では、Sam50のラテラルゲートが大きく開き、ここにTom40のβストランドが入り込み、SAM複合体とTom40で形成されるハイブリッドβバレル構造を形成することによって、SAM複合体は基質Tom40を膜挿入することを解明した(図2)。

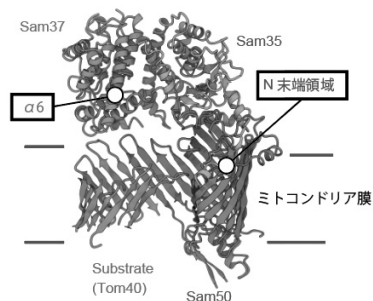


図2 SAM-Tom40超複合体のクライオ電顕構造

次なる展開として、一部が挿入されているTom40が、どのようなプロセスで膜挿入されるのかを明らかにすべく、新しい課題に挑戦した。Tom40の膜挿入に直接関与しているSam50のN末端に様々な長さのTom40断片を融合させ、融合型SAM-Tom40超複合体の精製および構造解析に着手した。その結果、4つの異なる融合型SAM-Tom40超複合体の精製に成功し、現在、クライオ電顕による構造解析に着手している。これらの複数のSAM-Tom40超複合体の立体構造を統合することによって、SAM複合体がTom40をどのようなプロセスで膜挿入するのか、その分子メカニズムを原子レベルで解明していきたい。

## 放線菌—糸状菌間相互作用の理解と物質探索への展開

二宮章洋

【目的】糸状菌は多様な二次代謝産物を産生することから、有用物質の探索源として利用されてきた。近年、糸状菌の潜在的な二次代謝を刺激する簡便な手法として、共培養法がしばしば用いられる。共培養によってどのような分子メカニズムを通して二次代謝が活性化するか明らかになれば、それを再現することによって人為的な二次代謝の制御が可能になると期待される。しかしながら、先行研究の多くは新規物質の発見に主眼を置いており、二次代謝活性化のメカニズムについては未解明の部分が多い。

先行研究によって、放線菌 *Streptomyces rapamycinicus* との相互作用が2種の *Aspergillus* 属糸状菌の二次代謝を活性化することが明らかになっており、両者の物理的接触が二次代謝活性化に必要であると提唱されていた。これに対して、著者らは放線菌 *S. rapamycinicus* の培養上清が *A. nidulans* の二次代謝を誘導する活性を有することを示す実験結果を得ていた。そこで申請者は、放線菌 *S. rapamycinicus* が産生する二次代謝誘導シグナルを明らかにすること、および、当該シグナルを利用して様々な *Aspergillus* 属糸状菌から有用物質を探索し、新規物質を発見することを当初の目的とした。

【方法】放線菌 *S. rapamycinicus* ATCC 29253 株を ISP 1 培地を用いて液体培養し、培養抽出物を、糸状菌 *A. nidulans* FGSC A4 株の二次代謝誘導活性を指標として分画した。ただし、二次代謝活性化の確認は、*A. nidulans* のオルセリン酸生合成遺伝子 (*orsA*) の発現を RT-qPCR によって定量する、当該遺伝子によって生合成される二次代謝産物 (オルセリン酸等) の産生を LC-MS によって検出する、あるいは色素産生を目視で確認することによっておこなった。また、分画には、ODS フラッシュクロマトグラフィー、および逆相 HPLC を用いた。

また、有用物質探索には日本およびブラジル沖の海底堆積物や地殻等から分離された、6種 (*A. creber*, *A. sydowii*, *A. protuberus*, *A. amoenus*, *A. jensenii*, および *A. cvjetkovicii*) 27 株の *Aspergillus* 属糸状菌を用いた。当該真菌株は過去に JAMSTEC において分離されたものである。最小液体培地を用いて糸状菌を振盪培養した後、放線菌を ISP 1 培地で培養した培養液を加え、共培養を実施した。培養液の抽出物について、LC-MS を用いた二次代謝プロファイルの解析、および、グラム陽性

細菌 *Kocuria rhizophila* に対する抗菌試験を実施し、活性物質を単離した。

【結果・考察】放線菌 *S. rapamycinicus* の培養上清、熱処理した培養上清、および凍結乾燥した培養物のメタノール抽出物のそれぞれを *A. nidulans* に加えて培養し、*orsA* 遺伝子の発現量を定量したところ、いずれの場合も未処理の場合と比べて *orsA* の発現量が上昇した。この結果から、二次代謝を誘導するシグナルがメタノールに可溶性低分子化合物であることが示唆された。そこで培養抽出物を ODS フラッシュクロマトグラフィーによって、5, 30, 60, および 100% メタノール画分に分け、*A. nidulans* に加えて培養したところ、100% メタノール画分のみが色素産生を誘導した。さらに当該画分を、水-アセトニトリルを移動相として用いた逆相 HPLC によって分画し、活性を示す画分を得た。最近、Bergerらにより、*S. rapamycinicus* が産生し *Aspergillus* の二次代謝を誘導する物質として polaramycin B というマクロライドが同定された。著者らが得た画分に含まれる活性成分が当該物質であるか、確認を進めている。

また、*S. rapamycinicus* を海洋由来6種27株の *Aspergillus* 属糸状菌と共培養した結果、27株中16株において、共培養による物質産生の誘導あるいは促進が示唆された。また、27株中1株 (*A. protuberus* V48 株) において、単独培養よりも共培養の抽出物の方が高い抗菌活性を示すことを示唆する結果を得た。そこで、*S. rapamycinicus* と *A. protuberus* V48 株の共培養物から抗菌活性物質を単離し、NMR と MS データを基に化学構造を決定したところ、当該物質を既知のアントラキノンである versicolorone と同定した。Versicolorone の単独培養と共培養における産生量を、LC-MS によって分析し比較したところ、両者に顕著な差は見られなかった。Versicolorone とは異なる抗菌物質が、共培養によって抽出物の抗菌活性が増大する現象の原因であると推測している。また、放線菌と *A. amoenus* V13 株の共培養物から、共培養特異的に産生される化合物を単離し、化学構造の解析を進めている。

本研究により、放線菌 *S. rapamycinicus* がある程度幅広い *Aspergillus* 属糸状菌の二次代謝に影響を与えることが示唆された。二次代謝誘導物質の同定を進めるとともに、当該物質を用いた物質探索を進めたいと考えている。

## 肺炎球菌ホスホマイシン耐性に関与するピルビン酸キナーゼの機能解析

田口厚志

**【目的】** 解糖系の最終反応を担う酵素であるピルビン酸キナーゼは、ホスホエノールピルビン酸とヌクレオシド三リン酸からピルビン酸とヌクレオシド三リン酸を生成する。好気呼吸系を持たない肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* において、ピルビン酸キナーゼは生育に必須であり、細胞壁合成を阻害する抗菌薬ホスホマイシンに対する耐性に関与することが明らかとなった。本研究では、肺炎球菌の代謝系制御に重要な役割を果たすピルビン酸キナーゼの機能構造解析を行うことで、活性制御機構の解明とピルビン酸キナーゼを標的とする阻害剤開発の基盤構築を目指した。

**【方法】** N末端に6xHisタグを付加した肺炎球菌ピルビン酸キナーゼを大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現させ、Ni-NTAアフィニティカラムとゲル濾過カラムを用いて精製した。精製されたピルビン酸キナーゼの活性は、産生物であるピルビン酸が乳酸脱水素酵素の働きにより乳酸に変換される過程で用いられる NADH の減少量を、340nm における吸光度の変化で定量することにより測定した。また、ピルビン酸キナーゼの基質・エフェクター認識機構を調べるため、蒸気拡散法により得られた共結晶サンプルを用いた X 線結晶構造解析を行った。

**【結果・考察】** 本研究では、アロステリック酵素である肺炎球菌ピルビン酸キナーゼの活性制御機構を解明するため、まずエフェクター分子の同定を行った。エフェクター分子候補である解糖系中間体のグルコース-6-リン酸 (G6P) とフルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) の添加による活性変化を調べた結果、後者を添加した際に大きな活性上昇が見られたことから、肺炎球菌ピルビン酸キナーゼはフルクトース-1,6-ビスリン酸によりアロステリックな活性制御が行われることが明らかとなった (図 1A)。次に、エフェクター認識機構を可視化するために、肺炎球菌ピルビン酸キナーゼとフルクトース-1,6-ビスリン酸の共結晶化を試み、共結晶構造を 1.8 Å の分解能で決定することに成功した。フルクトース-1,6-ビスリン酸はホモ四量体構造をとる肺炎球菌ピルビン酸キナーゼの C ドメイン境界付近に結合しており、他生物種のピルビン酸キナーゼのエフェクター結合領域とは異なる領域に結合していることが判明した (図 1B)。また、エフェクター結合構造を元にしたアミノ酸配列解析と変異体の機能解析により、エフェクター結合領域の 4 残基 (Lys408, His411, Glu488, Arg491) がフルクトース-1,6-ビスリ

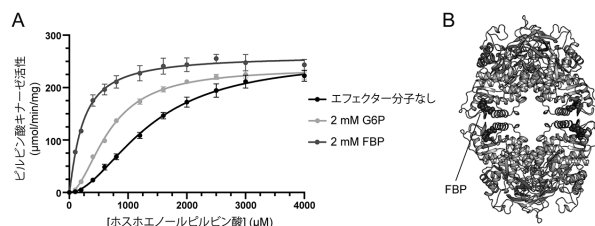


図 1 (A) 肺炎球菌ピルビン酸キナーゼの活性評価. (B) FBP 結合型肺炎球菌ピルビン酸キナーゼの結晶構造.

ン酸に対する選択性に関与することを明らかにした。

一般的にピルビン酸キナーゼはピルビン酸とともに ATP を産生するとされているが、ATP 以外のヌクレオシド三リン酸も産生することができる。そこで、肺炎球菌ピルビン酸キナーゼのヌクレオチド選択性についても、構造生物学アプローチを用いて調べた。ADP, GDP, UDP との共結晶構造を取得し、ヌクレオチド結合領域の構造解析を進めた結果、肺炎球菌ピルビン酸キナーゼは GDP や UDP の塩基部分と Aα2 ヘリックス上の残基群 (Glu64, Gln65, Arg68) を介して多くの相互作用を持つ一方、ADP の塩基部分とはほとんど相互作用を持たないことが明らかとなった (図 2)。また、活性評価においても GTP および UTP 合成能が ATP 合成能と比較して高かったことから、菌体内ではピルビン酸キナーゼが主に GTP 合成と UTP 合成を担うことが示唆された。

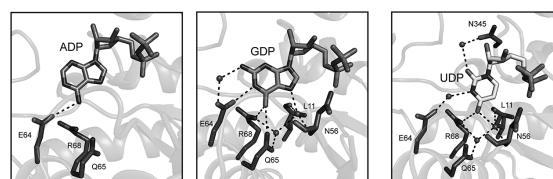


図 2 肺炎球菌ピルビン酸キナーゼの活性部位における各種ヌクレオチド塩基部分との相互作用.

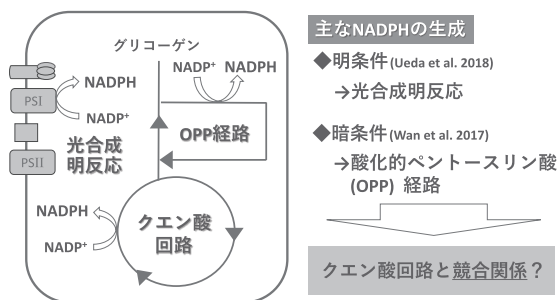
本研究では、肺炎球菌ピルビン酸キナーゼのアロステリック制御機構とヌクレオチド認識機構を分子レベルで解明することができた。近年多剤耐性化が課題となっている肺炎球菌に対する新規抗菌薬の標的候補として、生育に必須である肺炎球菌ピルビン酸キナーゼは魅力的であり、本研究で得られた構造情報はピルビン酸キナーゼ阻害剤の開発に寄与することが期待できる。



## ラン藻のクエン酸回路の流れを決める生化学的要因の解明

伊 東 昇 紀

【目的】本研究では、ラン藻のクエン酸回路の流れを決める要因を明らかにすることを目的とした。ラン藻は、酸素の発生を伴う光合成をする細菌の総称である。中でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以降 *Synechocystis*) は、増殖が速く、遺伝子改変が容易であることからモデル種として利用されている。海洋汚染や石油の枯渇などが問題視される近年では、*Synechocystis* を用いて二酸化炭素から有機酸などの汎用化学品をつくる物質生産が注目されている。*Synechocystis* は、代謝経路の1つ「クエン酸回路」を介して様々な有機酸を生産する。しかし、クエン酸回路の炭素の流れは、他の代謝経路と比較して弱い。そのため、その流れが弱い原因を明らかにし、改善していくことが、さらなる増産に向けた課題の1つとなっている。以前の研究で、申請者らは、ラン藻のクエン酸回路が、還元力として「NADPH」を生成するという特異な性質をもつことを明らかにした(図1)。一方、ラン藻の生体内において、NADPHは、主に光合成明反応と酸化的ペントースリン酸(OPP)経路によって生成されている(図1)。ラン藻では、好気呼吸で必要なNADPHもOPP経路が賄っている。そのため、クエン酸回路は、これらの他の系と競合関係にあり、このことが、炭素の流れが弱いことに関係している可能性がある(図1)。本研究では、多角的な解析により、この仮説を検証した。



【方法】*Synechocystis* のOPP経路において、第一段階の反応を触媒するグルコース-6-リン酸脱水素酵素(Zwf)の欠損株を作製した。野生株とZwfの欠損株を、光合成をしない暗条件下でBG11培地を用いて培養した。培養後に細胞を回収し、細胞内のNADPH量やATP量、呼吸活性を測定した。細胞内のNADPH量は同仁化学研究所(熊本, 日本)のNADP/NADPH Assay Kit-WSTを

用いて測定し、ATP量は、アブカム(ケンブリッジ, UK)のATP assay kitを用いて測定した。呼吸活性は、Arisakaらのプロトコルに従ってHansatech社(キングズ・リン, UK)を用いて行った。また、クエン酸回路の酵素の発現量の違いを確認するために、遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析は、ライフテクノロジー社(東京, 日本)のStepOne Plusを用いてリアルタイムPCRにより行った。

【結果・考察】Zwfの欠損株は、野生株と同等のNADPH量、ATP量、呼吸活性を示した。このことは、Zwfの欠損株が、光合成とOPP経路なしで、NADPHを生成できていることを示している。また、遺伝子発現解析の結果、Zwfの欠損株では、クエン酸回路の酵素遺伝子のうち、4種類の遺伝子で発現の増加が確認できた(図2)。このことは、Zwfの欠損株において、クエン酸回路の反応が、不足するNADPHを補ったことを意味している。Zwfの欠損株において、発現が最も増加した遺伝子が、2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼをコードする*kgd*遺伝子であった(図2)。*Synechocystis*のクエン酸回路の酵素のカイネティックパラメータを比較した結果、2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼは、1分子当たりの活性(代謝回転数)が最も低いことが分かった。そのため、クエン酸回路の律速段階の解消につながった可能性がある。

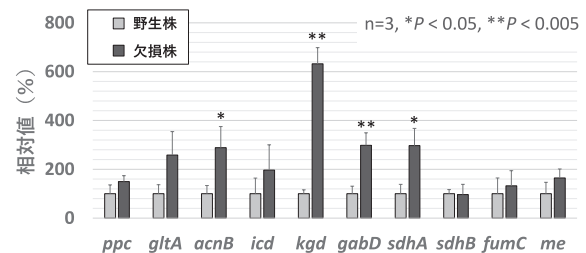


図2 クエン酸回路の酵素遺伝子の発現量の比較

これらの結果は、*Synechocystis* のクエン酸回路の流れが弱い原因が、他の代謝とのNADPH生成における競合であることを強く示唆している。また、クエン酸回路の酵素遺伝子の発現の増加は、それらの発現を制御する転写因子やシグマ因子の存在を示唆しており、それらを発見することで、培養条件によらずクエン酸回路の流れを自在に調節することが可能になると考えられる。今後は、これらの知見を活かした物質生産やNADP<sup>+</sup>合成のクエン酸回路への影響の解明などを進めていく。

## グラム陰性細菌が環境中の鉄を感知する分子メカニズム

横山 達彦

**【目的】**鉄は必須元素であるが、環境中で細菌が利用できる鉄はごく微量しか存在しない。ゆえに、細菌は外界の鉄を細胞内に取り込むシステム（鉄獲得系）を高度に進化させて来た。細菌は効率よく外界の鉄を取り込むために、外界の鉄の存在を「感知」することで、鉄獲得系を構成する遺伝子群の発現を活性化することができる。本研究では、その分子メカニズムの解明を目指した。

本研究で対象とした鉄獲得系は、大腸菌が有する Fec system である。Fec system は鉄クエン酸錯体を取り込む系であり、グラム陰性細菌に広く保存されている。鉄クエン酸錯体は外膜トランスポーター FecA によってトラップされ、分子モーターである Ton motor が FecA の構造変化を誘起することで、ペリプラズムまで輸送される。FecA は鉄クエン酸錯体のレセプターとしても働き、鉄クエン酸錯体のシグナルを、一回膜貫通タンパク質 FecR を介して、 $\sigma$  因子である FecI に伝達し、Fec system を構成する遺伝子群の発現を誘導する。しかし、そのシグナル伝達の分子機構は、長年に亘って謎に包まれてきた。

我々は最近、FecR が連続的な切断を経て FecI を活性化することを報告した (Yokoyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2021)。FecR はまず、シグナル非依存的に自己切断し (1段階目切断)、N 末端側断片 NTD と C 末端側断片 CTD に分離する。次に、シグナルにตอบสนองして NTD が切断され (2段階目切断)、更にその断片は RseP プロテアーゼによって切断される (3段階目切断)。こうして最終的に生じた断片が FecI を活性化する。しかし、FecR が如何にして FecA からシグナルを受け取り、如何にして 2段階目切断が誘導されるのかという、シグナル伝達の要とも言うべき分子メカニズムは依然として不明であった。そこで本研究では、この機構の解明を目指した。

**【方法】**FecR の N 末端及び C 末端にタグを付加したモデル基質を *Escherichia coli* K-12 株で発現させ、イムノブロットングによりその切断を評価した。FecR, FecA, Ton motor の構造は AlphaFold3 によって予測した。

**【結果・考察】**まず、CTD の細胞内動態を解析した結果、CTD は細胞質で自己切断した後も NTD と会合しており、NTD が Tat pathway を介して膜挿入されると同時に、CTD もペリプラズムに「ヒッチハイク」輸送されることが明らかとなった。次に、CTD 領域を欠失させた FecR 変異体の細胞内動態を解析し、CTD が NTD の受ける 2段階目切断を抑制していることを明らかにした。これらの結果から我々は、CTD が NTD と会合することで、NTD を保護し、NTD の 2段階目切断を阻害しているのではないかと、そしてシグナルにตอบสนองして

CTD が NTD から解離することで、その切断が誘導されるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、CTD と NTD にシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合によって両断片を固定して解離を妨げたところ、確かに NTD の切断は抑制され (図 1)、仮説が支持された。最後に、CTD が NTD からシグナル依存的に解離する分子機構を解析した。我々は

CTD が FecA と相互作用し、Ton motor の生み出した機械的な力が FecA を介して CTD に伝達されることで、CTD が NTD から解離するのではないかと考えた。FecR-NTD/FecR-CTD/FecA/Ton motor からなる複合体の構造を予測し、CTD と FecA の推定相互作用部位に変異を導入したところ、NTD のシグナル依存的な切断が阻害された。この結果は先の仮説を支持するものである。

以上の結果を統合し、Fec system におけるシグナル伝達メカニズムのモデルを提唱する (図 2)。FecR はグラム陰性細菌に広く保存されていることから、本研究で明らかにしたシグナル伝達機構は、他のグラム陰性細菌にも共通して存在する可能性が高い。

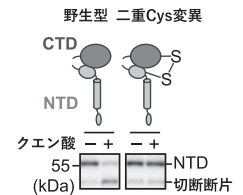


図 1 FecR NTD の切断解析

NTD と CTD をジスルフィド結合により固定すると、シグナルにตอบสนองした NTD の切断が阻害された。

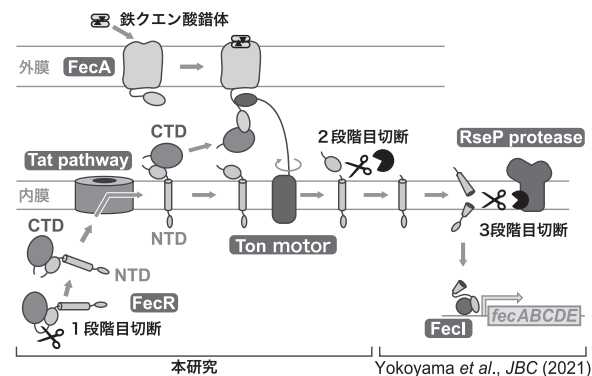


図 2 グラム陰性細菌が外界の鉄を感知する分子機構 (i) FecR は、NTD と CTD に分離された状態で、Tat pathway を介して内膜に挿入される。 (ii) FecA が鉄クエン酸錯体を認識する。 (iii) Ton motor が生み出した機械的な力が、FecA を介して CTD に伝達され、CTD が NTD から解離する。 (iv) NTD の 2段階目切断と、続く 3段階目切断が誘導される。 (v) 最終的に生じた断片が FecI を活性化する。

## iTRAQ 解析を基盤とする肺炎球菌侵襲化機構の解明

平 山 悟

【目的】肺炎による国内の死者は、年間約 13.6 万人に及ぶ。肺炎を引き起こす病原細菌の中でも *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) は分離頻度が最も高いため、臨床上で特に重要視されている。肺炎球菌の感染関連因子を明らかにするため、感染モデルマウスの肺胞洗浄液を採取し、サンプル間の相対定量解析が可能な網羅的プロテオミクス (iTRAQ 解析) を実施した (図 1)。検出した肺炎球菌タンパク質は、感染時に宿主内で発現していることから、感染への関与が強く示唆される。検出タンパク質群には、これまでに病原因子としての報告例のないものが多く含まれていたが、Eno, Gap, Tuf はプラスミノゲン結合タンパク質 (plasminogen-binding proteins, PlgBPs) として報告されている。また、筆者は TpiA, ClpC, UvrC が PlgBPs であることを明らかにしてきた。肺炎球菌 (D39 株) のタンパク質 1,911 種のうち、上述の解析で 15 種を検出し、その中の 6 種が Plg 結合能を有する事実は、本機能の重要性を示唆する。肺炎球菌が宿主に感染し、組織や血流に侵入するためには、宿主の Plg をリクルートすることが有効であると考えられる。Plg はタンパク質分解活性のあるプラスミンに変換され、細胞外マトリックスをはじめとする宿主分子の分解に活用される。本研究は、iTRAQ 解析で検出したタンパク質群について、Plg 結合能を中心に機能解析し、肺炎球菌の侵襲化に関与する因子を詳らかにすることを目的とした。

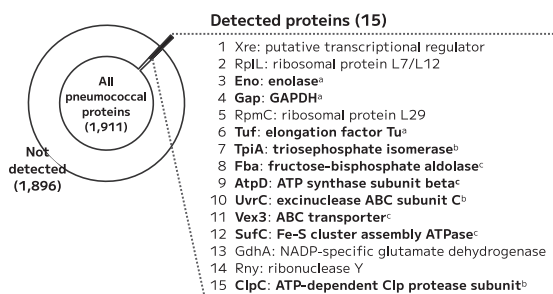


図 1 iTRAQ 解析で検出した肺炎球菌タンパク質 (a 既知の PlgBPs, b 筆者が過去に見出した PlgBPs, c 本研究で見出した新規 PlgBPs)

【方法】*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 または *Escherichia coli* BL21 を用いた発現系により各タンパク

質の組換え体を作製した。Plg と各組換え体との相互作用を far-western blotting および表面プラズモン共鳴法で解析した。また、Plg は宿主の組織型 Plg 活性化因子 (tissue Plg activator, tPA) によってプラスミンに変換されるが、この反応に及ぼす影響についてプラスミン特異的発色基質 S-2251 を用いて解析した。さらに、肺炎球菌の野生型および  $\Delta$ lytA 株 (自己溶菌酵素欠失株) から菌体表層画分を抽出し、western blotting により SufC を検出した。【結果・考察】iTRAQ 解析の検出タンパク質群のうち、新たに Fba, AtpD, Vex3, SufC の 4 種に Plg 結合能を見出した。これらはヒト Plg に結合し、tPA によるプラスミンへの変換を添加量依存的に、有意に促進した。また、肺炎球菌  $\Delta$ lytA 株の菌体表層画分から検出された SufC 量は、野生株のものより少なかった。SufC は分泌シグナルを有しない細胞内タンパク質であるが、肺炎球菌の自己溶菌により菌体外へ放出され、菌体表層にも局在することが示唆された。上述の 4 種の中では Fba, AtpD も SufC と同様に分泌シグナルを持たないが、このような複数の細胞内タンパク質が、菌体外ではムーンライティング機能として Plg 結合能を発揮すると推察される (図 2)。

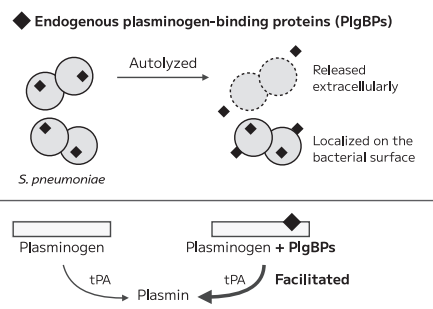


図 2 菌体内の PlgBPs は溶菌に伴い菌体外に放出され表層にも局在する / PlgBPs は Plg に結合しプラスミンへの変換を促進する

本研究では、新たに 4 種の PlgBPs を見出した。iTRAQ 解析の検出タンパク質群 15 種のうち、10 種に Plg 結合能が認められたことから、肺炎球菌の感染における Plg 結合能の重要性が強調された。図 1 に含まれない既知のものを加えると、肺炎球菌 PlgBPs は 16 種に上る。筆者はこれらの発現特性に関する解析を進めており、PlgBPs の包括的理解に向けた知見の蓄積を図っている。

## 霊長類の食性に応じたビフィズス菌のユニークな糖代謝機構の解明： ビフィズス菌の適応進化の理解に向けて

佐々木 優 紀

【目的】 ビフィズス菌は数千万年もの長きに亘り霊長類と共生・共進化してきた細菌として知られ、ヒトのみならず幅広い霊長類の腸管内に棲息している。近年のゲノム解析の結果から、これらのビフィズス菌は異なる宿主霊長類の食性に適応してきたこと、すなわち、宿主の食餌成分に含まれる難消化性糖質を利用するために、多様な糖質分解酵素のレパートリーを有し、各宿主環境に適応させてきたことが推察されている。

そこで本研究では、樹木からの滲出物（ガム）を頻繁に摂取するというユニークな食性を有するマーモセット科霊長類（コモンマーモセット属およびタマリノ属を含む）に着目した。興味深いことに、これら霊長類は他の霊長類と比べてビフィズス菌の占有率が高く、食性とビフィズス菌の関連性が強く示唆されている。本研究課題はこれらの霊長類由来のビフィズス菌におけるガム由来糖質の分解能を評価し、これまで殆ど解明されていない「非ヒト霊長類の食性に応じたビフィズス菌の糖代謝機構」の分子基盤の理解を目指した。

【方法】 霊長類が摂取するガムの多くは、II型アラビノガラクトサン（AG）多糖を主成分とすることが知られている。本研究ではII型AG構造を有するガムとして最も広く研究されているセネガル種アラビアガムを用いた。アラビアガム資化性は、11種の霊長類から単離されたビフィズス菌40種41株を用いて嫌気下で培養を行い、48時間後の600nmの吸光度（ $A_{600}$ ）を測定した。資化性菌における増殖関連遺伝子を同定するために、公開されているゲノム情報を用いてdbCANによる糖質関連酵素のアノテーションを行い、既知酵素との相同性に基づき候補遺伝子を絞り込んだ。候補となる糖質加水分解酵素遺伝子については大腸菌発現系を用いて組換え体を作製し、性状解析を行った。さらに、酵素および輸送体遺伝子について二重相同組換え法により欠損株を作製し、genotype-phenotype マッチングを行った。

【結果・考察】 アラビアガムの培養試験の結果、ガム食性を有するワタボウシタマリノから単離された *Bifidobacterium aerophilum* JCM 30941<sup>T</sup> が最も良好な生育を示した。そこで、アラビアガム上での生育に関わる糖質加水分解酵素（GH）の探索を行ったところ、GHファミリー43サブファミリー24（GH43\_24）に属する酵素（以下、BaGH43\_24と記載）が候補として挙げられた。本ファミリーに属する酵素が他の細菌種において

II型AGへ作用することが報告されていたためである。そこでBaGH43\_24の組換え酵素を調製し、活性を評価したところ、アラビアガムの $\beta$ -1,3-ガラクトサン主鎖に対して作用を示し、重合度4から7のオリゴ糖を遊離することが確認された。BaGH43\_24は、そのポリペプチド鎖に2つの触媒ドメインを有しており、各触媒ドメインの活性を解析したところ、糖鎖内部から切断するエンド型と糖鎖末端から切断するエキソ型の異なる分解様式を併せ持つ $\beta$ -1,3-ガラクトナーゼであった。本酵素の高い分解活性はこの二機能性に由来するものと考えられる。また本酵素および輸送体の遺伝子欠損株を用いた試験により、遊離したオリゴ糖を取込むABC輸送体（AGオリゴ糖-結合タンパク質として以下、AGO-BPと記載）も同定することに成功し、これらがアラビアガム上の生育に必須であることが示された（図1）。

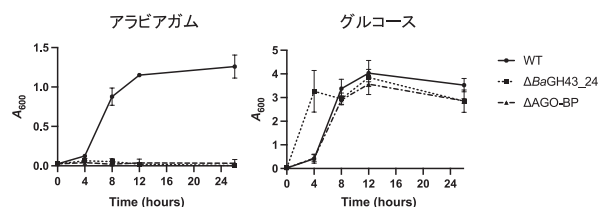


図1 *B. aerophilum* 野生株 (WT) および各遺伝子欠損株の生育

本研究では、新たなアラビアガム分解・輸送経路の解明に成功し、ガム食性霊長類において食性に応じたビフィズス菌の効率的な分解機構の存在を示した（図2）。今後は本菌や新規の経路に関わる酵素および輸送体遺伝子の分布を網羅的に解析することで、本経路の存在がガム食性霊長類に棲息するビフィズス菌にとって有利に働いているかについて迫っていきたい。

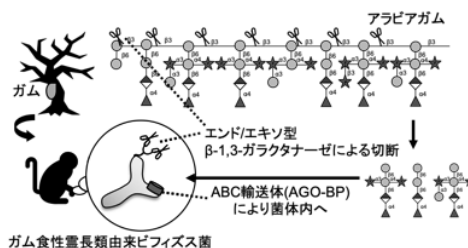


図2 *B. aerophilum* におけるアラビアガム利用経路の模式図

## リボソーム RNA を利用した環境適応機構の解明

佐藤 悠

【目的】16S rRNA 遺伝子は、細菌やアーキアを含む原核生物の系統分類や生物種の同定において、最も広く利用されてきた分子マーカーの一つである。その保存性と進化速度のバランスが分類に適しているとされるが、一部の原核生物ではゲノム上に塩基配列の異なる複数種の16S rRNA 遺伝子をもつ“16S多型”を示しており、従来の分類手法に混乱をもたらす原因ともなっている。特に、高度好塩性アーキアの中には、約5%以上（約75塩基）の配列差を持つ複数の16S rRNA を有する分類群が報告されているが、それぞれのrRNAの生理的役割や、なぜ複数保持されるのかといった進化的意義はほとんど明らかにされていない。

申請者はこれまでに、高度好塩性アーキア *Haloarcula* 属菌株がもつ2種類の16S rRNAのうちG+C含量が約2%高い16S rRNAが高温条件下での速い増殖に不可欠であることを解明し、16S多型が環境適応に関与する可能性を示唆してきた。本研究ではさらに16S多型の影響を調べるために、他の好塩性アーキア *Halomicrobium* 属に着目した。*Halomicrobium* 属では、複数種の16S rRNA 遺伝子間でG+C含量の差は1%程度であるという特徴がある。本研究では、これら2属の菌株が保有する16S rRNAの配列差がどのように生理機能に反映されているか、特に温度や塩濃度といった環境条件との関係性を調べることを目的とした。

【方法】*Halomicrobium* 属に属する3種 (*Hmc. mukohataei* JCM 9738, *Hmc. salinisoli* JCM 30837, *Hmc. zhouii* JCM 17095) のゲノムデータベースを用いて、16S rRNA 配列の比較解析を実施した。代表株である *Hmc. mukohataei* を用いて、温度 [20, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C] および塩濃度 [15, 20, 25, 30% (w/v) NaCl] を変化させた条件下で培養実験を行った。培養は3連で行い、対数増殖期の細胞からRNAを抽出した後、各16S rRNA配列に特異的なプライマーを用いたRT-qPCRを実施し、発現比率を調べた。各rRNAオペロンの機能的役割を明らかにするため、*Halomicrobium* 属菌株変異株の作製を試みた。一方、比較対象として解析した *Haloarcula* 属の一方のrRNAオペロンを欠損した株に対して、低温（15°C）下での培養試験を行った。

【結果・考察】配列解析により、*Halomicrobium* 属における2種の16S rRNAの部分的な塩基配列は全体で約7-9%異なっており、差異の多くはリボソーム機能に関

与するセントラルドメイン（ヘリックス21, 22, 26）に集中していた。この領域はリボソームの形成や機能において重要とされ、リボソームタンパク質の結合強度が高温適応にも関係するとされている。この構造的差異が、環境条件に応じた機能的分化に寄与する可能性が高い。

RT-qPCRの結果、温度条件の変化に応じて2種の16S rRNAの発現比率は変動した。例えば、2種類の16S rRNA 遺伝子を有する *Hmc. mukohataei* において50°Cではそれ以下の温度と比較して片方の16S rRNAの転写量が約1.1倍となっていた（有意差あり）。一方、塩濃度の変化に対する応答は限定的であり、各条件下における発現比率には大きな変動は見られなかった。これは、塩濃度よりも温度が16S rRNAの選択的発現制御において主要な環境因子であることを示している。また、*Halomicrobium* 属が持つ複数種の16S rRNAは単なる遺伝的冗長性ではなく、少なくとも1種類は異なる環境応答に関連している可能性が示唆された。

*Halomicrobium* 属の変異株の作製は現時点では成功しておらず、今後、遺伝子導入効率や選抜マーカーの最適化が必要である。一方、比較対象として行った *Haloarcula* 属のrRNA欠損株を低温（15°C）で培養した結果、G+C含量の低いrRNAのみを持つ株がG+C含量の低いrRNAのみをもつ株よりもわずかに速く増殖した（図）。この知見は、配列やG+C含量がリボソームの安定性や翻訳効率に影響し、低温適応にも影響を及ぼすことを裏付けるものである。これらの知見は、極限環境に生息する微生物の進化的適応戦略を理解する上で極めて重要であり、16S rRNAが単なる分類マーカーにとどまらず、生理的役割を持つ機能分子であることを示している。

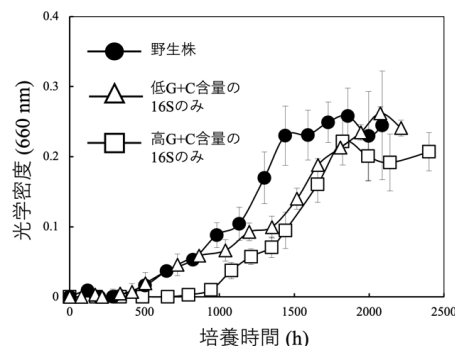


図 *Haloarcula hispanica* の15°Cでの増殖試験

## *Cryptococcus* 属真菌の病原性因子「莢膜多糖」の 生合成を担う糖転移酵素の探索

門 岡 千 尋

**【目的】** 病原性担子菌酵母 *Cryptococcus neoformans* は細胞壁の最外層に莢膜多糖を産生する。この莢膜は、グルクロノキシロマンナン (GXM) とグルクロノキシロマンノガラクトタン (GXMGal) と呼ばれる2つの多糖で構成されている (図1)。これら莢膜多糖は宿主の免疫系の回避を通して、本菌における最も重要な病原性因子であると考えられているが、その生合成に関する知見はそれほど多くはない。本研究では、*C. neoformans* における莢膜多糖の生合成に関与する新規糖転移酵素の探索を目的とした。

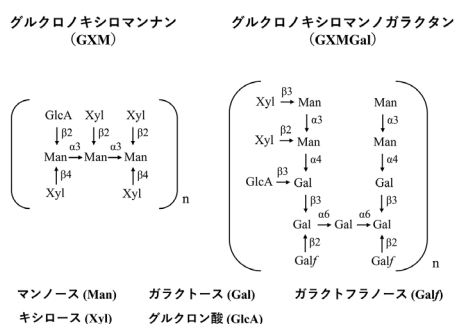


図1 莢膜多糖の構造

**【方法】** これまでの知見から、莢膜生合成の場合はゴルジ体であることが示唆されている。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にはホモログが存在せず、*C. neoformans* var. *grubii* H99株にのみ存在するゴルジ体に局在が予測されるII型膜タンパク質をリストアップした結果、30種の候補タンパク質を選抜した。これら候補タンパク質について、大腸菌 SHuffle T7 Express を宿主として異種発現させ、可溶性発現に成功したものについては、各種4-メチルウンベリフェリル (4MU) 化糖および各種糖スクレオチドと反応させ、HPLCを用いて糖転移活性を測定することで新規糖転移酵素の同定を目指した。

**【結果・考察】** 30種の候補タンパク質について解析した結果、4MU-β-ガラクトース (Gal) と GDP-マンノース (Man) と反応させた際に反応産物を生成する新規酵素を発見し、Cgm1 (Cryptococcal Galactoside Mannosyltransferase 1) と名付けた (図2)。Cgm1は真菌がもつGT32ファミリーに属する糖転移酵素とわずかに相同性を示すものの、そのホモログは担子菌酵母を含む一部の真菌にしか存在しておらず、他の真菌のGT32ファミリーの糖転移酵素とは明確に異なるクレードに分類された。

次に、*C. neoformans* var. *grubii* H99株においてCGMI

遺伝子の破壊株を構築し (*cgm1Δ*)、その表現型を観察した結果、*cgm1Δ*は37℃において生育が顕著に遅延する温度感受性の表現型を示した (図2)。また、*cgm1Δ*から莢膜画分を精製し、<sup>13</sup>C-NMR解析に供した結果、*cgm1Δ*ではGXMGalのガラクトマンナン側鎖が消失もしくは減少していることが明らかになった。このことから、Cgm1はGXMGalのガラクトマンナン側鎖の生合成に関与する新規β-ガラクトシドα-(1→4)-Man転移酵素であることが明らかになった。さらに、*cgm1Δ*をマウスに感染させ、病原性の変化を解析した結果、*cgm1Δ*を感染させたマウスでは感染後7日目および14日目の肺内生菌数が野生株と比較して有意に少ないことが明らかになった。肺を破碎し、マウスによるサイトカイン産生について解析した結果、病原体の排除に重要なインターフェロン-γ (IFN-γ) の産生量が*cgm1Δ*を感染させたマウスにおいて9倍に増加することが明らかになった。*C. neoformans* に対する免疫応答においてはヘルパー細胞の1種であるTh1細胞によるIFN-γ産生が重要な役割を果たす。*C. neoformans* の中でも特に強毒株として知られるH99株では、この獲得免疫において重要なTh1細胞によるIFN-γ産生が誘導されないことが知られている。そのため、H99株由来の*cgm1Δ*を感染させたマウスではIFN-γが産生されるという我々の知見は非常に興味深い。*cgm1Δ*の糖鎖構造の解析と併せて考察すると、GXMGalのガラクトマンナン側鎖はIFN-γの産生抑制に重要な役割を担っており、強毒株が示す宿主の獲得免疫に対する抵抗性に関与する可能性が示唆される。Cgm1のホモログはヒトを含む動物には存在しないため、Cgm1の酵素活性の阻害剤を探索することでクリプトコッカス症に対する新たな抗真菌薬が開発できる可能性がある。加えて、野生株と*cgm1Δ*が産生するGXMGalの比較解析を行うことで、真菌が生産する多糖によるユニークな獲得免疫抑制機構を明らかにすることができると考えている。

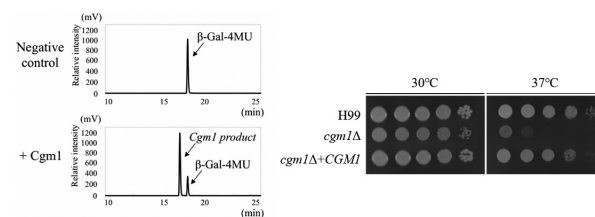


図2 Cgm1の糖転移活性と遺伝子破壊株の表現型

## 糸状菌のリン脂質制御を介した気中菌糸形成メカニズムの解明

岩 間 亮

【目的】糸状菌 *Aspergillus oryzae* は、各種分解酵素の細胞外分泌能の高さから、様々な発酵産業と密接に結びついている。糸状菌は分生子が発芽して菌糸生長を行った後、気中へと菌糸を伸ばして分生子形成器官を構築し、分生子を産生する。分生子は菌株の安定的な維持に重要であるが、気中菌糸から分生子形成器官に至る形成機構の詳細は不明な点が多い。本研究では、生体膜組成が糸状菌の分化に与える影響に着目し、糸状菌の気中菌糸形成機構を理解することを目的とした。

【方法】生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は親水性頭部と疎水性尾部から構成され、特に頭部の構造によりホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) など大別される (図1)。 *A. oryzae* RIB40において、PEからPCの変換に関わる酵素の欠失株 ( $\Delta pemA$  株または  $\Delta pemB$  株) を作製し、PCの合成をコリンを材料とする Kennedy 経路のみに依存するようにした。この株を、コリンを含まない培地からコリンを様々な濃度で含む培地にシフトすることで、その変化を糸状菌の分化、脂質組成、転写変動の観点から解析した。

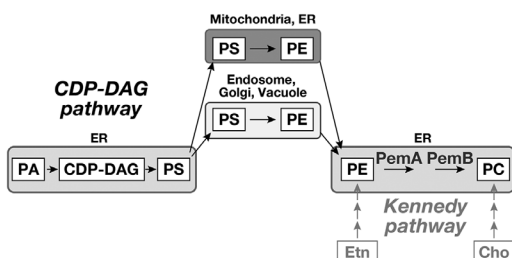


図1 真菌類のリン脂質合成経路。 *A. oryzae* において、PEからPCの変換に関わる酵素として PemaA、PemBがある。Cho; コリン, Etn; エタノールアミン。

【結果・考察】まず、PEとPCの量的関係と気中菌糸形成の関係を詳細に解析するため、コリンを1000, 100, 20, 5 $\mu$ Mで含む培地で  $\Delta pemA$  株または  $\Delta pemB$  株を培養した。コリン濃度が低下するにつれて、気中菌糸形成が大きく低下することが示された (図2)。これら2つの株で共通して、コリン濃度の低下とPC量の低下が大きく相関することも示された。上記の実験系において、  $\Delta pemA$  株を5 $\mu$ Mのコリンを含む最少培地で培養することで、基底菌糸のみが伸長することが示された。この菌

体を1mMコリンを含む最少培地にシフトさせることにより、一斉に気中菌糸形成を誘導させることができた。シフト後の菌糸を経時的に観察したところ、1時間ですでに僅かに気中菌糸が形成されており、6時間ではコロニー上で肉眼でも気中菌糸形成が確認できた。逆に、1mMコリンから5 $\mu$ Mコリンへと培地をシフトすると、新たに形成される菌糸部分には気中菌糸が形成されないことも示された。また、これらの実験条件で得られた主要リン脂質組成の解析から、気中菌糸には脂肪酸鎖が長いリン脂質を多く含むことも示された。

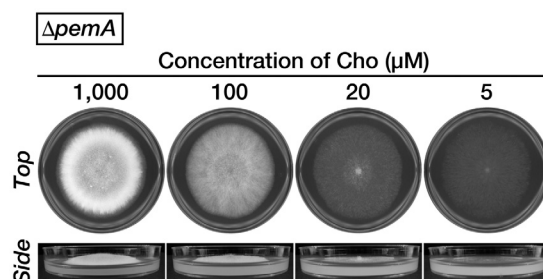


図2 各コリン濃度における  $\Delta pemA$  株の生育

次に、5 $\mu$ Mコリンから1mMコリンへとシフトする実験系において、シフト前、シフト後1時間、6時間の菌体からRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。それぞれの時間で大きく特徴の異なる転写パターンとなることが示されるとともに、  $\Delta pemA$  株のそれぞれの時間の転写パターンのいずれもが、気中菌糸を形成できる野生型株と大きく異なることが示された。単純な  $\Delta pemA$  株と野生型株での比較からは見出せなかった遺伝子群として、ステロール合成系に関わると推定される AO090009000362、タンパク質翻訳系に関わると推定される AO090005001072、推定転写因子をコードする AO090003001351 などが見出されている。

本研究から気中菌糸の形成には十分量のPCが必要なが示された。また、十分量のPCが合成されれば、すぐにダイナミックな転写ネットワークの変化が生じ、気中菌糸形成が開始されることが示唆された。本実験系で選択されてきた変動遺伝子は野生型株との比較では絞りきれない遺伝子群であり、今後の解析で気中菌糸形成メカニズムの分子メカニズム解明に繋がると期待される。

## リグニン由来芳香族化合物への耐性に関わる薬剤排出ポンプの機能解析

樋口 雄大

【目的】 アセトバニロン (AV) はリグニンの酸化分解によって生じるアセトフェノン類の1つであり、アセトフェノン類は細菌に対して抗菌性を示すことが報告されている。我々はこれまでに、AVを唯一の炭素源として良好に増殖する *Pseudomonas* sp. MHK4 株を単離した。本株を、AVを含む培地で培養しRNA-Seq解析を実施したところ、推定の major facilitator superfamily (MFS) type tripartite efflux pump 遺伝子 (*acpXYZ*) の発現量が増加していた。このことからMHK4株が細胞内に取り込まれたAVをAcpXYZにより排出することで、細胞内へのAVの過剰な蓄積を防ぎAV耐性を向上させていることが推測された(図1)。そこで本研究では、*acpXYZ*の機能とMHK4株における役割を解明することを目的とした。

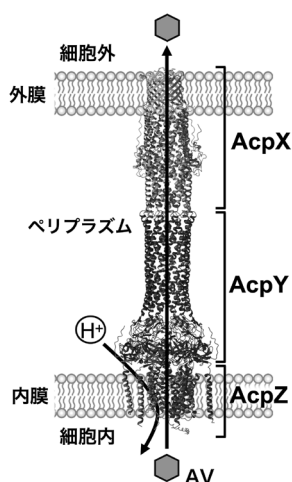


図1 AcpXYZによる推定のAV排出機構。

【方法】 AV変換能を欠損させたMHK4株の*acpXYZ*を相同組換えにより破壊した。得られた*acpXYZ*破壊株およびその相補株を、AVとピルビン酸を含む培地で培養し増殖能を評価した。大腸菌を宿主としてGFPとHisタグを融合したAcpZを生産し、Ni-NTAアフィニティークラムにより粗精製した。粗精製後GFPとHisタグを切断し、ゲルろ過カラムによりAcpZを精製した。得られた精製AcpZを用いて、示唆走査蛍光測定によりAV、フェルラ酸、バニリン酸、バニリンおよびグルコースとの相互作用解析を行った。*acpZ*の直上流に存在する推定のLysR type transcriptional regulator 遺伝子 (*acpR2*) を相同組換えにより破壊した。得られた破壊株をAV存在下で培養し、RNAを抽出して、qRT-PCR解析により*acpX*、*acpY*、*acpZ*の発現量を測定した。またAV変換能

を欠損させたMHK4株をAV存在下または非存在下で培養し、RNAを抽出して同様に*acpX*、*acpY*、*acpZ*の発現量を測定した。

【結果・考察】 AV変換能を欠損させたMHK4株の*acpXYZ*を破壊し、AVとピルビン酸を含む培地で培養して増殖能を評価した結果、増殖速度の低下が示された。また*acpXYZ*破壊株の染色体DNA上に*acpXYZ*を挿入した遺伝子相補株を用いて同様に増殖能を評価した結果、増殖能の回復が示された。以上の結果から、MHK4株のAV耐性の向上に*acpXYZ*が関与することが示唆された。

次にAcpXYZが実際にAVの排出に関わるかを調べるために、基質の認識に直接関わりと推定される内膜タンパク質AcpZの組換えタンパク質を精製し、示唆走査蛍光測定によりAVとの相互作用解析を実施した。その結果、AVの存在下でAcpZの $T_m$ 値が約3℃上昇した(図2)。また同様にフェルラ酸、バニリン酸、バニリンおよびグルコースを基質としたところ、グルコース以外の化合物の存在下で $T_m$ 値が4~18℃上昇したことから、AcpZがグルコース以外の化合物と相互作用することが示唆された(図2)。*acpZ*の直上流には推定のLysR type transcriptional regulator 遺伝子 (*acpR2*) が存在したことから、*acpR2*が*acpXYZ*の転写制御に関与することが予測された。そこで*acpR2*破壊株を作製して*acpXYZ*の発現量を調べた結果、*acpXYZ*の発現量の低下が示された。以上のことから、AcpR2により*acpXYZ*の転写が正に制御されることが明らかになった。またAV変換能を欠損させたMHK4株の破壊株を用いた発現解析により、AVが*acpXYZ*の転写の主要な誘導物質であることが示された。

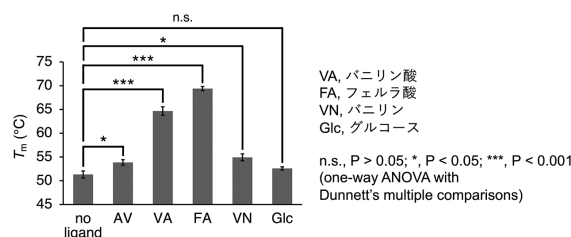


図2 AcpZと各基質の相互作用解析。

以上より、AVの存在下においてAcpR2により*acpXYZ*の転写が誘導され、AcpXYZによってAVが細胞外に排出されることでMHK4株のAV耐性が向上することが強く示唆された。またAcpZはフェルラ酸、バニリン酸、バニリンとも相互作用することが示唆されたことから、AcpXYZはこれらの基質も排出することが推定された。



## スギヒラタケ由来毒性タンパク質の構造機能解析

鎌田 健一

【目的】 *Pleurocybella porrigens* (スギヒラタケ) は、かつて日本で食用とされていたが、2004年に多発した急性脳症の原因とされ、毒性が問題視されるようになった。本研究では、スギヒラタケ由来のレクチンPPL (*Pleurocybella porrigens* Lectin) に注目し、その構造と機能を明らかにすることを目的とした。PPLはこれまでも毒性発現に関与する可能性が示唆されていたが、構造や糖鎖結合特性については十分に解明されていなかった。そこで本研究では、PPLの大腸菌発現・精製を行い、X線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡(cryo-EM)による立体構造解析を実施するとともに、糖鎖結合特異性や溶液中での複合体形成について詳細に検討することで、PPLの機能メカニズムを明らかにすることを旨とした。

【方法】 PPL遺伝子は、大腸菌発現用にコドン最適化され、pET28ベクターにクローニングされた。BL21(DE3)株で発現誘導を行い、Ni-NTAアフィニティクロマトグラフィー、Hisタグ除去、ゲル濾過クロマトグラフィーを経て高純度のPPLを調製した。糖鎖結合能は蛍光標識PPLを用いたグリカンアレイ解析によって評価した(固定化糖鎖28種類使用)。グリカンアレイ解析によって明らかになった結合特異性からより詳細な結合親和性を、等温滴定型カロリメトリー(ITC)により定量的に測定した。また、結晶化条件をスクリーニングし、GalNAc共結晶を得て、X線結晶解析(2.0Å分解能)を実施した。さらに、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行い、PPL六量体構造の3.2Å分解能での再構築を試みた。加えて、PPLの溶液中での状態を解析するため、超遠心分析(AUC)および動的光散乱(DLS)測定を行った。

【結果・考察】 大腸菌により高発現されたPPLは、数ステップの精製操作で高純度に調製できた。グリカンアレイ解析の結果、PPLはTn抗原(GalNAc)および血液型H型III糖鎖に強く結合することが判明した(図1)。ITC測定の結果、GalNAcに対する親和性が最も高く( $K_d=0.21\text{mM}$ )、ガラクトースおよびラクトースへの結合も観察されたが、グルコースとは結合しなかった。PPLのTrp35残基をSerに置換した変異体では、GalNAcおよびgalactoseに対する結合能が失われ、Trp35による疎水的な支持が結合に重要であることが示唆された。結晶構造解析により、PPLはβ-トレフォイル

型の立体構造を持つR型レクチンに特徴的な構造を持つことが明らかとなった。一方でPPLは、これまでに報告されていない六量体リング構造の複合体を形成していることが明らかとなった。結合糖であるGalNAcは、各モノマーのαサブドメインに結合しており、主に水素結合(Ser24, Asp20, Asn42)と疎水的相互作用(Trp35)によって認識されていた。Cryo-EMによる単粒子解析でも、X線結晶構造と一致する六量体リングが観察され、3.24Å分解能でマップを再構築できた(図2)。AUCおよびDLS測定からも、溶液中で安定した六量体構造を維持していることが確認された。これらの結果は現在、論文投稿中である。

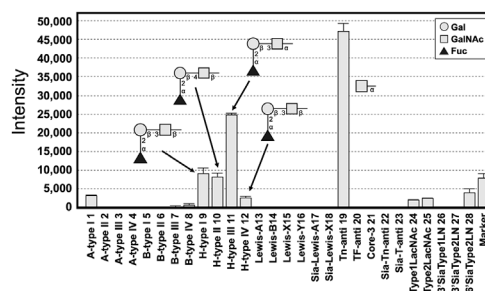


図1 PPLのグリカンアレイ解析

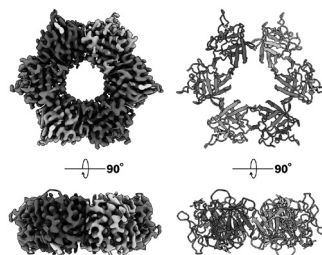
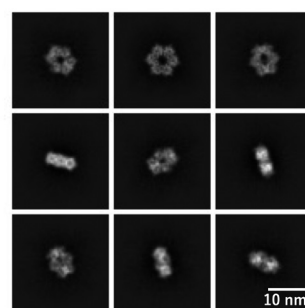


図2 PPLの二次元平均クラス像(上)と再構築した立体構造(下)

## 2023年度学会・研究部会助成の研究報告

助成期間：2023年4月～2025年3月

# 日本微生物資源学会における微生物の分類に関する支援活動について

矢口 貴志

## 【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に資するため、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などを目的としている。2015年日本微生物系統分類研究会の当学会への合流を機に「微生物系統分類部会」を設置し、微生物分類学に関する当学会の学術活動の方策や将来計画についての議論等を行ってきた。公益財団法人発酵研究所2023年度学会・研究部会助成をいただき、微生物系統分類部会を中心に、微生物分類学を志す若手研究者および関連研究者の支援と人材育成および微生物分類学分野の活性化を目的とした活動を実施した。



図1 国際学会参加の様子。A. The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2024. B. 15th European Nitrogen Fixation Conference (15 ENFC). C. 17th European Conference on Fungal Genetics (ECFG 17).

### 1. 学会参加，論文発表への支援

学会やシンポジウム等における「分離・分類・保存」に関する研究発表に対し、渡航費や参加費等の支援を行った。

E-mail: yaguchi@chiba-u.jp (学会宛のメールでも可)

役職：日本微生物資源学会長

支援の対象は、当学会の大会・シンポジウム等で発表実績のある成果，または今後成果発表をすることを条件とし、会員・非会員は問わないこととした。当学会ホームページやメール配信にて広く案内し、申請に対して系統分類部会メンバー等による審議を経て支援対象とした。

学会発表については、2年間で国際学会4件、国内学会5件、計9件の学会発表を、学生、ポスドク研究員らに支援した(表1)。また、3件の論文発表について、若手研究者に支援した(表2)。

表1 学会参加支援

氏名 (所属)	学会
川北鈴香 (静岡大)	BAGE CO2023
西原重理沙 (理研)	15 ENFC
久富 敦 (理研)	IUMS 2024
内田百岳 (千葉大)	ECFG 17
館坂珠季 (千葉大)	日本菌学会第68回大会
山本彩加 (都立大)	日本微生物資源学会第30回大会
渡辺郁也 (東農大)	日本微生物生態学会第37回大会
松岡ほかか (北大)	日本藻類学会第49回大会
秋山結友 (北大)	日本藻類学会第49回大会

表2 論文発表支援

氏名 (所属)	発表論文
森 史 (環境研)	Microb Resour Syst. 39: 77-87, 2023.
柴山洋翔 (NBRC)	Microorganisms. 12: 1769, 2024
野崎久義 (東京大)	PLoS One. 19: e0310549, 2024.

### 2. 技術研修への支援

当学会は、一般の個人会員の他、微生物株コレクションの保存管理・提供事業を実施する機関会員を有することを特徴としている。機関会員には微生物の分類や保存技術を有する研究者、技術者が在籍している。この技術を広く普及させることを目的に、技術研修への支援を実施した。2024年11月13日(千葉)と12月4日(つくば)に千葉大学真菌医学研究センターと理化学研究所バイオリソース研究センターとの共同開催による「MALD-TOF MSを用いた酵母・糸状菌の迅速同定の技術研修」に支援を行った(助成番号: SMS 2023-03, 図2)。この技術研修には当初の募集人員を大きく上回る応募があり12名に枠を拡大して実施された。研修後のアンケートでは内

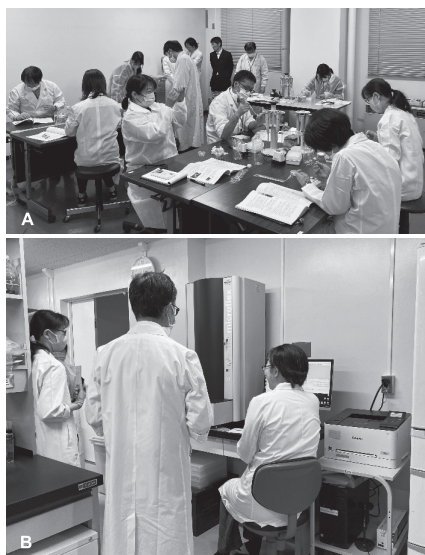


図2 MALD-TOF MS技術研修の様子。A. 測定サンプルの前処理。B. MALD-TOF MSによる測定。

容的に満足、技術的に得るものが多かったなど大変好評であった。参加者の1名には当会誌に研修報告を寄稿いただいた (Microb. Resour. Syst. 40:55-56, 2024に掲載)。

### 3. シンポジウムの開催支援

本助成によって、2023年6月、本学会第29回大会に合わせ、「微生物の分離・培養を考える」と題してシンポジウムを開催した。ゲノム情報解析の発展に伴い、微生物の培養を介さなくても自然界の微生物叢の多様性やその機能予測が可能となっているが、本シンポジウムでは、微生物資源分野の中心課題である分離・培養について正面から向き合い、その重要性を再確認する企画とした。

2023年9月、本学会前会長である大熊盛也氏が監修した「微生物資源の整備と利活用の戦略」が出版された。そこで、2024年3月に微生物保存機関のリソース収集の方針、保存・整備状況、そしてリソースを活用した研究成果を紹介し、今後の微生物保存機関の方向性、存在意義を考える機会とした。

2022年、国際原核生物命名規約の改訂、培養が困難で正式な発表ができない原核生物に対する候補名の取り扱い、また規約とは別に未培養系統群を含むゲノム情報に基づいて命名するためのSeqCodeなど細菌分類は急速に変化している。そこで、2025年3月、細菌やアーキアを含む原核生物のみならず、糸状菌や酵母などに代表される真核生物において最新の状況を紹介します。今後の微生物分類を見つめ直すきっかけとなる企画を行った。

それぞれのシンポジウムの詳細については、以下のよう当会誌にて報告を行った。



図3 日本微生物資源学会 公益財団法人発酵研究所公開シンポジウム開催の様子。A. 「微生物リソースの整備とその利活用：現状と今後の展望」(2024年3月開催)。B. 「ゲノム時代の微生物分類学を考える」(2025年3月開催)。

- ・大熊盛也, 坂本光央. 2023年シンポジウム「微生物の分離・培養を考える」Microb. Resour. Syst. 39: 110-112, 2023.
- ・坂本光央, 飯田哲也, 石田達也, 河地正伸, 高島昌子, 宮下美香, 村松由貴, 矢口貴志. 公開シンポジウム「微生物リソース整備とその利活用：現状と今後の展望」Microb. Resour. Syst. 40: 57-60, 2024.
- ・坂本光央, 青木敬太, 飯田哲也, 石田達也, 宮下美香, 村松由貴, 矢口貴志. 公開シンポジウム「ゲノム時代の微生物分類学を考える」Microb. Resour. Syst. 41, 2025 (1号掲載予定)。

### 4. 学会誌論文のJ-STAGEへの掲載

過去に学会誌に掲載された論文や総説など(25巻1号~39巻2号)をJ-STAGEに掲載し、微生物の分類や保存に関する情報発信を行った。

公益財団法人発酵研究所2023年度学会・研究部会助成をいただき、当学会の系統分類部会を中心とした微生物分類学に関する研究発表の支援と若手人材の育成、技術研修の支援、保存機関活動の啓発、微生物分類学分野の活性化を目的としたシンポジウム等の活動を行うことができ、今後の当学会の発展に大きく寄与するものと考えます。ここに当学会を代表し、心より感謝申し上げます。

## 公益社団法人 日本生物工学会 未培養微生物（微生物ダークマター） 資源工学研究部会の研究推進活動について（第2報）

青 柳 秀 紀

### はじめに

生物工学は、微生物をはじめ、動物・植物細胞などの生物の機能を活用し、食糧、医療、環境、エネルギーなど、私達の生活を取り巻く、種々の問題の解決に挑戦する学問領域である。公益社団法人 日本生物工学会は生物工学に関する学理及びその応用の研究についての発表および連絡、知識の交換、情報の提供などを行う場となることにより、生物工学に関する研究の進歩普及を図り、もってわが国の学術の発展に寄与することを目的としている（生物をより深く理解し、その機能を活かして豊かで安全な生活と持続可能な社会の実現に貢献する）。本学会には多様な研究部会が活発に活動している（[https://www.sbj.or.jp/division/?doing\\_wp\\_cron=1749898545.5159111022949218750000](https://www.sbj.or.jp/division/?doing_wp_cron=1749898545.5159111022949218750000)）。未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会（<https://www.sbj.or.jp/division/mdarkmatter.html>）もその中の一つである。従来の微生物培養法では自然界の微生物の1%程度しか培養ができていない。残された99%の未培養微生物（Microbial dark matter）資源は、国内外で学術、産業面の利活用が期待され、網羅的なゲノム解析などが活発に行われている。しかしながら、塩基配列だけでは分からない微生物の機能解明や利用を考えた場合、生物工学的視点から、ダークマター微生物の解析、探索、分離・単離、培養、評価、保存、利用に関連する新規技術開発や、ビッグデータとの連携が必須である。このような現状を踏まえ本研究部会が設立され、ダークマター微生物に関連する研究、基盤技術開発、利用の活性化を目指し活動中である（公益財団法人発酵研究所 2021年度学会・研究部会助成採択：青柳 秀紀：IFO research communications, 37, 183-185, 2023）。

上述の活動を基盤に、2023年度学会・研究部会助成に申請・採択され、下記の活動を行った。

### 【活動内容および成果】

#### 1. 研究部会支援型の公募制度による研究助成

2021年度学会・研究部会助成に採択された際、本学会ではじめて研究部会支援型の公募制度を確立・実施した。2023度も2021年度に確立した研究部会支援型の公募制度に則り、「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（異分野・融合領域、産官学連携のシーズとなる研究も含む）」を生物工学会の正会員から公募し、審査を行った。その結果、下記4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することで、一定の成果が得られた。下記に実施した助成課題の概要を紹介する。

(1) 今井 優（信州大学 先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所、現：信州大学 アクア・リジェネレーション機構）：抗生物質探索研究への応用に向けた線虫共生細菌ライブラリーの構築

【研究成果の概要】本研究では、線虫共生細菌全体を未利用の微生物資源として捉え、環境中から線虫共生細菌を単離し、抗生物質探索研究への応用に向けたライブラリーの構築を目指した。ベルマントレイ法により環境中から線虫を回収し、次亜塩素酸ナトリウムにより線虫表面を殺菌した。線虫を破碎し、共生細菌を溶出後、寒天培地に塗布し、培養後、出現したコロニーの16S rRNA遺伝子をシーケンス解析し、ライブラリー化した（237菌株の線虫共生細菌を分離）。分離した多様な線虫共生細菌と、これまでに分譲を受けた多様な *Photorhabdus* 属や *Xenorhabdus* 属の細菌を様々な液体培地で培養し、培養抽出物を調製した。抗菌スペクトルが狭い化合物（抗生物質）が求められていることから、これら培養抽出物を複数の病原菌に対する抗菌活性試験に供し、そのスペクトルを評価した結果、特定の病原菌（またはグループ）に選択的な活性を示す試料を複数見出した。グラム陰性細菌は、外膜や薬剤排出ポンプを有しており、同菌に抗菌活性を示す化合物は少ない。そのため本研究

---

E-mail: aoyagi.hideki.ge@iu.tsukuba.ac.jp  
役職：日本生物工学会 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

では、*Escherichia coli* に選択的な抗菌活性を示す化合物の生産が認められた線虫共生細菌に着目し、HPLC分析により、粗精製した活性画分を取得し、各種細菌に対する抗菌活性を調べたところ、同化合物が*E. coli* に対して極めて強い活性を示すことを見出した。

(2) 坂元 仁 (大阪公立大学 研究推進機構) : 固体培養ストレス感受性大腸菌変異株を用いた寒天培地中の増殖阻害メカニズムの解明

【研究成果の概要】大腸菌の過酸化水素ストレス応答の転写調節因子 OyxR の欠損株を用いた研究の過程で、偶然、市販の寒天培地 (寒天) には、大腸菌 OyxR 欠損株のコロニーの形成の阻害が生じるものと、阻害が生じないものが存在していることを見出した。そこで、大腸菌 OyxR 欠損株のコロニーの形成の阻害が生じる寒天を、(a) アルカリ洗浄、(b) エタノール洗浄、(c) キレート剤洗浄、(d) 重金属の解毒薬添加、等をおこない、それぞれの処理がコロニーの形成に及ぼす影響を比較した。また、コロニーの形成が阻害されない寒天への各種のミネラル添加実験や原子吸光分析などを実施し、種々検討した結果、寒天に含まれている微量成分の亜鉛が大腸菌 OyxR 欠損株の死滅に関与していることが示唆された。また、適切なキレート剤による寒天の洗浄、抗酸化剤や金属キレート剤の添加により、寒天培地上で生じる大腸菌 OyxR 欠損株の死滅を抑制できることが示唆された。これらの処理を行った寒天と未処理の寒天を用いて寒天培地を作成し、環境試料を播種・培養した結果、培養化される細菌集団が異なった。以上の成果を学会発表 (1 件) した。

(3) 辻 雅晴 (旭川工業高等専門学校, 現: 長岡技術科学大学 技術科学イノベーション系) : 2 槽式透析培養装置を用いた新規南極産菌類の獲得への挑戦

【研究成果の概要】本研究では、2 槽式透析培養装置 (別府フラスコ) の第 1 槽に生理食塩水で懸濁した昭和基地周辺の試料を入れ、第 2 槽には、A. ポテトデキストロース (PD) 液体培地、B. YpD 液体培地、C. 滅菌済み南極産試料抽出液、の各溶液を入れて任意の条件で培養を試みた。得られた培養液を PD 寒天培地に塗布し、10℃で 3 週間培養し、出現したコロニーを継代培養することで菌株を取得し、菌類のマーカー遺伝子を利用し、種分類を行った。その結果、PD 液体培地では、61 株の菌類が培養でき、担子菌類 10 種、子のう菌類 4 種に分類できた。YpD 液体培地では 71 株の菌類が培養でき、担子菌類 6 種、子のう菌類 2 種に分類できた。71 株のうち、担子菌類の *Vishniacozyma* 属と *Mrakia* 属が約 60% を占めていた。滅菌済み南極産試料抽出液では、合計 94 株の菌類が培養でき、担子菌類 5 種、子のう菌類 12 種に分類できた。以上の結果から、2 槽式透析培養装置を利用した菌類の培養は新たな菌類の獲得に有効であると考えられる。以上の成果は、学会発表 1 件、解説 1 件として公表した。

(4) 堀之内 貴明 (産業技術総合研究所 人工知能研究センター, 現 理化学研究所 生命機能科学研究センター) : アームロボットを用いた未培養微生物の実験自動化システムの開発に関する調査研究

【研究成果の概要】寒天培地からの微生物のコロニーピッキングは未培養微生物分野をはじめとする微生物研究の基本操作である。コロニーのピッキングは、人による長時間の単純作業を要し、研究実施上のボトルネックの一つだが、既存の自動化設備は非常に高価で、一部の研究者しか恩恵を受けられていない。本研究では単腕ロボットやビジョンセンサーなど機械工業分野の最先端の自動化技術を援用し、安価な自動コロニーピッキングシステムの開発を試みた。開発した自動コロニーピッキングシステムは、a) 単腕ロボット本体、b) グリッパー、c) コロニーが形成された寒天培地、d) 懸濁用培地が分注されたマイクロプレート、e) コロニーピック用の爪楊枝保管容器、で構成される。本システムはクリーンベンチや嫌気チャンバー内などに容易に設置できる。単腕ロボットとして DOBOT MG400 を選定し、ロボットのグリッパー先端に装着するフィンガーは独自に設計し、3D プリンタで造形した。2023 年度に装置選定とハードウェア設計を行い、2024 年度は実験に必要な動き (コロニーピック用の爪楊枝の把持やコロニーの刺突など) を実行するロボットアームの座標と軌道を設定し、動作スクリプトを実装した。動作スクリプトの実行と座標や動作速度などのパラメーター調整をし、動作の成功率の向上を試みた。この動作調整の方法論を検討する過程で、他の実験動作の検証にも利用可能な形で一般化することに成功した。以上の成果は、学術論文 1 件、学会発表 1 件として公表した。

## 2. 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 (第 2 回)」の開催

[https://www.sbj.or.jp/event/division\\_dark\\_matter\\_20250329.html](https://www.sbj.or.jp/event/division_dark_matter_20250329.html)

上述の研究助成を受けた 3 名の若手研究者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 (第 2 回)」を主催・開催した (2025 年 3 月 29 日, 御茶ノ水 ソラシティカンファレンスセンター 完全対面開催, 51 名参加)。本シンポジウムでは、口腔内の未培養微生物 (ダークマター微生物) の培養、生理学的特性や病原性の解析に関する研究を精力的に展開している Prof. Xuesong He (ADA Forsyth Institute, USA) による Plenary Lecture を実施した (図 1)。

また、2 件の招待講演、研究助成採択者による研究成果発表、3 名の研究助成採択者が協力して企画したミニシンポジウムを開催した。演者と演題を下記に記載する。  
Plenary Lecture: Shedding light on microbial dark matter:

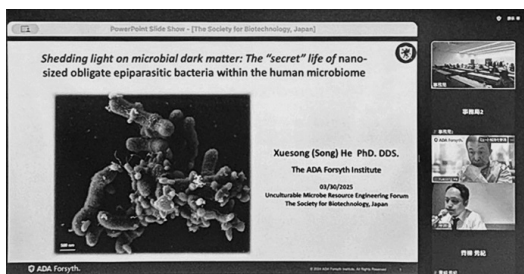


図1 Prof. Xuesong HeによるPlenary Lecture.

The “secret” life of nanosized obligate epiparasitic bacteria within the human microbiome (ADA Forsyth Institute, USA) Xuesong He

招待講演：

講演1. 楊 英男（筑波大学 生命環境系）：バイオマス変換を促進するための光刺激嫌気性バイオプロセスの開発  
講演2. 厚見 悠（SyntheticGestalt [株]）：未培養微生物の培養化を目指したタンパク質言語モデルによる全ゲノム機能アノテーション、および展望と課題

2023学会・研究部会助成 成果発表

今井 優（信州大学）、辻 雅晴（旭川工業高等学校）、坂元 仁（大阪公立大学／関西大学）

ミニシンポジウム

講演1. 小西 正朗（北見工業大学）：人工知能を活用した微生物培地のデザイン

講演2. 木村 善一郎（呉工業高等専門学校）：全原核生物を原理的に標的とし得る「一般解」としての微生物分離技法開発

講演3. 井口 晃徳（新潟薬科大学）：嫌気性廃水処理プロセスに生息する機能上重要な未培養微生物の分離培養と有効利用の可能性

本シンポジウムには、産官学の研究者や学生が参加し、対面開催ならではの活発な議論と新たな人的ネットワークが形成できた。

3. 第75回 日本生物工学会大会シンポジウム「データ駆動型研究が導く未培養微生物（微生物ダークマター）の開拓と展望」の開催

[https://www.sbj.or.jp/2023/symposium/program\\_3s-ea.html](https://www.sbj.or.jp/2023/symposium/program_3s-ea.html)

第75回日本生物工学会大会でシンポジウム「データ駆動型研究が導く未培養微生物（微生物ダークマター）の開拓と展望」（2023年9月5日、対面、184名参加）を本学会の研究部会 バイオインフォマティクス相談部会と連携して開催した。シンポジウムでは、近年の大規模計測や情報解析技術の革新が、これまでの仮説検証型の研究スタイルに加え、新たにデータ駆動型の研究スタ

イルが、未培養微生物分野にも導入され、将来の新たな局面を迎える可能性に焦点を当て、大規模計測とデータサイエンスを基盤としたデータ駆動型研究による未培養微生物の開拓や機能解明に取り組む気鋭の研究者を学会内外より招聘し、最先端の研究成果の紹介と討論を行った。演者と演題を下記に記載する。

講演1：○ 岩崎 渉<sup>1,2,3,4,5</sup>（<sup>1</sup>東大院・新領域、<sup>2</sup>東大院・理、<sup>3</sup>東大・大海研、<sup>4</sup>東大・定量研、<sup>5</sup>東大・微生物イノベ連携研）：データ駆動型アプローチによるダークマター微生物解析

講演2：○ 森 宙史（遺伝研）：マイクロバイオーム研究を先導するハブとなる統合データベース Microbiome Datahub の開発

講演3：○ 成廣 隆（産総研・生物プロセス）：廃水処理微生物群の生態と機能をメタゲノム情報から解き明かす  
講演4：○ 高畑 陽（大成建設）：バイオレメディエーションにおける未培養微生物の活用

4. 第76回日本生物工学会大会（創立100周年記念大会）シンポジウム「未培養微生物（微生物ダークマター）研究のフロンティア」の開催

[https://www.sbj.or.jp/2024/symposium/program\\_3s-ca.html](https://www.sbj.or.jp/2024/symposium/program_3s-ca.html)

第76回日本生物工学会大会でシンポジウム「未培養微生物（微生物ダークマター）研究のフロンティア」（2024年9月10日、対面、260名参加）をバイオインフォマティクス相談部会と連携して開催し、最先端の研究成果の紹介と討論を行った。演者と演題を下記に記載する。

講演1：○ 飯野 隆夫、大熊 盛也（理研 BRC-JCM）：培養技術によって明らかとなった新種の硝酸還元菌による金属鉄腐食

講演2：○ 市川 俊輔<sup>1</sup>、本間 宣行<sup>2</sup>、石毛 真行<sup>2</sup>（<sup>1</sup>三重大、<sup>2</sup>オンチップ・バイオテクノロジーズ）：微生物培養・生理活性化化合物探索におけるマイクロドロプレット技術の活用

講演3：○ 布浦 拓郎（海洋研究開発機構）：環境ゲノム情報からの新奇酵素機能の探索

講演4：○ 神谷 幸太郎（SyntheticGestalt [株]）：AIによる価値ある発見と発明

パネルディスカッションでは、未培養微生物の開拓に関わる様々な分野の研究者が、海外で自動化等による大規模研究が展開されている状況に対して我が国がどう立ち向かうべきか、現状の課題や将来の展望についての討論が活発に行われた。

以上の様に、2023年度学会・研究部会助成により、当該分野の活性化、認知度向上、研究・技術開発の推進、人的ネットワークの拡大、若手研究者育成など、次に繋がる成果を出すことができた。心より感謝申し上げます。

発酵研究所助成研究報告集 第39号【非売品】

2025年12月10日 印刷

2025年12月20日 発行

編集委員長 左子芳彦

編集委員 片倉啓雄, 河村好章, 小林哲夫, 清水 昌

発行人 樽井直樹

発行所 公益財団法人発酵研究所  
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06 - 6300 - 6555

FAX. 06 - 6300 - 6814

印刷所 日本印刷出版株式会社

大阪市福島区玉川4丁目7-13



