

第 12 回  
助 成 研 究 報 告 会

日 時 : 2018年6月8日 (金) 13 : 00~17 : 00

場 所 : 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)  
5 階サイエンスホール



公益財団法人 発酵研究所



# プログラム

開会挨拶 公益財団法人発酵研究所理事長 (13:00~13:05)

事務局からの連絡 (13:05~13:10)

平成28年度大型研究助成<口頭発表> (13:10~14:50)

- O-1 きのご類培養形質の分類形質としての評価及びそれに基づく担子菌分類系の再検討  
前川二太郎 (鳥取大学農学部)  
座長：左子 芳彦 (京都大学大学院農学研究科教授)
- O-2 好熱性細菌が放出するウィルス様膜小胞と分泌型プロテアーゼ巨大分子複合体の関連解明そして応用への挑戦  
渡部 邦彦 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)  
座長：西山 真 (東京大学生物生産工学研究センター教授)
- O-3 真菌における一酸化窒素の合成機構・生理的役割の解明  
高木 博史 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)  
座長：西山 真 (東京大学生物生産工学研究センター教授)
- O-4 木材腐朽のシステム合成生物学への挑戦  
中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)  
座長：福田 雅夫 (中部大学応用生物学部教授)

休憩 (14:50~15:10)

平成24年度寄付講座助成<口頭発表> (15:10~16:00)

- O-5 微生物による「ものづくり」のイノベーション：微生物の潜在能力発掘・応用のための新手法の開発と実践  
尾仲 宏康 (東京大学大学院農学生命科学研究科 微生物潜在機能探索寄付講座)  
座長：永井 和夫 (東京工業大学名誉教授)

休憩・移動 (16:00~16:10)

平成28年度一般研究助成、平成27年度若手研究者助成\* (ポスター発表) (16:10~17:00)

- P-1 微細藻類に寄生するクリプト菌門の多様性の解明と培養系の確立  
鏡味麻衣子 (東邦大学理学部、現 横浜国立大学大学院環境情報研究院)
- P-2 アーバスキュラー菌根菌の*in vitro*培養方法の確立と日本産菌株の整備  
石田 孝英 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)
- P-3 群体性オオヒゲマワリ目藻類 (緑藻綱) に近縁な単細胞性藻類の系統分類学的研究  
仲田 崇志 (慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科)
- P-4 人獣共通感染症原因菌*Escherichia albertii*の遺伝子解析および表現型解析による分類  
村上 光一 (国立感染症研究所感染症疫学センター)

- P-5 東アジア地域における動物関連物質分解に関連する菌類（糞生菌類，アンモニア菌類）の研究  
吹春 俊光（千葉県立中央博物館生態環境部）
- P-6 住宅室内真菌叢におけるアレルゲンの多様性に関与する真菌の系統分類学的検討  
渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）
- P-7 ヒト口腔領域における *Veillonella* 属細菌の系統分類とバイオフィーム形成に関する生態学的研究  
眞島いづみ（北海道医療大学歯学部）
- P-8 質量分析法を用いたバクテリアのペプチドグリカンアミノ酸構造決定法の開発  
浜田 盛之（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）
- P-9 原生生物の細胞表面に共生する *Treponema* 属細菌のシングルセルゲノム解析  
雪 真弘（理化学研究所環境資源科学研究センター）
- P-10 ナノアーキアの検出と培養株確立の試み  
伊藤 隆（理化学研究所バイオリソース研究センター）
- P-11 微生物に見出した新規で多様なアミド結合形成酵素の網羅的解析と利用  
大利 徹（北海道大学大学院工学研究院）
- P-12 糸状菌テルペノイドのコンビナトリアル生合成  
一瀬 博文（九州大学大学院農学研究院）
- P-13 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構の鍵となるクエン酸トランスポーターの同定と機能解析  
二神 泰基（鹿児島大学農学部）
- P-14 分裂酵母の細胞寿命制御に学ぶ健康長寿創薬の基盤研究  
饗場 浩文（名古屋大学大学院創薬科学研究科）
- P-15 細菌のタンパク質アシル化修飾を標的とした代謝改変に関する研究  
古園さおり（東京大学生物生産工学研究センター）
- P-16 微生物による多様な金属酸化物の合成に関する研究  
山本 兼由（法政大学生命科学部）
- P-17 細菌による機能性プラズマローゲン生産の基盤となる酵素の分子機構の解明  
金子 淳（東北大学大学院農学研究科）
- P-18 *Corynebacterium glutamicum* のストレス応答性新奇遺伝子によるTCA回路鍵酵素の制御機構の解明  
川崎 寿（東京電機大学工学部）
- P-19 グリセロール資化性乳酸菌 *Enterococcus faecalis* が行う好気性乳酸発酵の発現条件の解明とそれを利用した廃棄グリセロール再資源化技術の構築  
土肥 裕希（岡山理科大学工学部）
- P-20 乳酸菌の代謝能を利用した有用機能性物質の生産とその応用に関する研究  
五十嵐康弘（富山県立大学工学部）
- P-21 植物病原卵菌 *Phytophthora infestans* のシスト発芽阻害物質の作用機序解析  
谷 修治（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

- P-22 細胞性粘菌由来の低分子化合物DIFをリードとした新規抗菌剤の開発  
久保原 禪 (順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科)
- P-23 乳酸菌由来リボソームによる細胞のリプログラミング機構  
太田 訓正 (熊本大学大学院生命科学研究部)
- P-24 絶対寄生性の植物病原糸状菌が分泌する宿主細胞壁分解酵素群の新規発見とセルロース系バイオマス糖化酵素高機能化に向けた基礎的研究  
八丈野 孝 (愛媛大学農学部)
- P-25 シロアリおよび糸状菌由来の植物バイオマス分解酵素の性質解明とそれらを利用したバイオマス分解系構築の試み  
有岡 学 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- P-26 難培養性*Dehalococcoides*属細菌の*Sulfurospirillum*属細菌による新規増殖促進メカニズムの解明  
内野 佳仁 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)
- P-27 カリウム輸送タンパクの人工進化によるセシウム蓄積微生物の創出  
加藤創一郎 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
- P-28 好熱菌の未知代謝経路の同定とグリセロールから有用光学活性物質を生産する新たな微生物発酵法の開発  
亀谷 将史 (東京工業大学地球生命研究所、現 東京大学大学院農学生命科学研究科)
- P-29 新規ポリマー生産のための均一なゴム低分子化システムの構築「ゴム廃棄物の再資源化を目指して」  
笠井 大輔 (長岡技術科学大学工学研究院)
- P-30 効率的な物質変換を行う低温菌シンプル触媒の構築に関する研究  
田島 誉久 (広島大学大学院先端物質科学研究科)
- P-31 リグニンからの基幹化合物生産の高効率化に必要なリグニン系フェノール類トランスポーターの解明  
政井 英司 (長岡技術科学大学大学院工学研究科)
- P-32 海底下泥炭層からの未培養リグニン開裂微生物の獲得と構造生物学に基づくスーパー酵素創生によるC6-C3芳香族バイオプラスチックモノマー生産系の開発  
秦田 勇二 (海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センター、現 埼玉工業大学工学部)
- P-33 代謝改変赤色酵母を用いる未利用バイオマスからのアスタキサンチン・キシリトールの同時発酵生産プロセスの開発  
堀内 淳一 (京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)
- P-34 放線菌における二次代謝遺伝子を指標とした新たな分類基準の構築に関する研究  
春成円十朗\* (富山県立大学工学部)

懇親会 (17:00~19:00)





## 要旨(大型研究助成)





## きのこ類培養形質の分類形質としての評価及びそれに基づく担子菌分類体系の再検討

前川 二太郎 (鳥取大学農学部)

### [背景・目的]

きのこ類の多くは担子菌門ハラタケ亜門に所属する菌類であり、主に有性世代（テレオモルフ）の形態形質に基づいて分類がなされてきた。本研究ではきのこ類培養菌糸体に形成される無性世代（アナモルフ）等に焦点を当て、培養形質と分類群との関係性を解析することにより、培養菌糸体に見られるアナモルフ等の分類形質としての評価を行なうことを主要な目的とした。

### [方法]

鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター（FMRC）保存菌株の培養菌糸体を供試して培養菌糸体の培養特性を調査するとともに、分離源標本の形態観察および分子系統解析により、系統的位置を決定した。また、FMRC 保有種以外の種についても、文献調査により、培養特性情報を入手した。

### [結果・考察]

ハラタケ亜門に所属する 3 綱 21 目 81 科 442 属 1,420 種の培養菌糸体性状に基づき、アナモルフ等の形成能について解析を行った。その結果、アナモルフ形成能の調査に供試した 1,187 種のうち 82 種が出芽型分生子を形成し、アカキクラゲ目においては供試したすべての属種がシンポジオ型の形成様式を示した。*Spiniger* 型分生子は系統的に異なる目の特定の属で形成され、加えて形態的差異が属間において認められた。また、アネロ型分生子も系統的に異なる特定の属で観察された。一方、分節型分生子の形成は 179 種において観察され、分生子離脱様式は科あるいは属によって異なり、破裂型あるいは開裂型の何れかを示した。ハラタケ目シメジ科に所属する *Ossicaulis* 属種は同科の他属とともに離脱様式は開裂型であるが、本属分生子の大きさは他属種のそれらとは有意に異なっていた。また、テレオモルフの形態的差異が見出せない種間において、培養菌糸体における分生子形成の有無によって、種の判別が可能な分類群も認められた。これらの結果は、培養菌糸体におけるアナモルフの形成の有無、形成様式、形態等が科、属あるいは種の判別に有用であることを示唆する。あわせて培養菌糸体の他の特徴についても分類形質としての評価を行った。

## 好熱性細菌が放出するウイルス様膜小胞と分泌型プロテアーゼ巨大分子複合体の関連解明そして応用への挑戦

渡部 邦彦 (京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

### [背景・目的]

有馬温泉源から単離した好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、産業廃棄物であるトリ羽毛を効率よく分解する。この細菌が、細胞ではなくウイルスに類似した脂質二重層構造の「膜小胞」(membrane vesicle) を細胞表層から細胞外に放出することを、トリ羽毛分解に関わるプロテアーゼ研究の過程で発見した。本研究では、H328 株が細胞表層から放出する「膜小胞」の構造と生合成機構の実体解明を行い、膜小胞に共存するトリ羽毛分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の分子基盤および関連性解明に挑戦した。

### [方法]

トリ羽毛分解に関わる H328 株由来のプロテアーゼをプロテオーム解析とゲノム解析から特定した。膜小胞の解析は電子顕微鏡解析 (TEM) と蛍光基質 DiI による簡便な検出法により行った。シャペロン/プロテアーゼ遺伝子 *degP* に着目し、培養過程における細胞形態と量的関係を解析した。H328 株でのプロテアーゼ遺伝子や *degP* 遺伝子の破壊は、独自に開発した相同組換え法により行った。これら組換え体酵素タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、膜小胞とプロテアーゼ巨大分子複合体の構成タンパク質相関解明、局在性追究 (免疫電顕解析) を行った。

### [結果・考察]

膜小胞が H328 株細胞表面から産生されることを TEM から示した。次に、トリ羽毛に関わるプロテアーゼを、プロテオーム解析とゲノム解析からセリンプロテアーゼ Protein B (MrH\_0844) と同定し、オペロンとして構成する Protein A と共に、免疫電顕解析を用いて膜小胞での局在性を確かめた。一方、膜小胞の簡便な検出法として、蛍光基質 DiI を用いた方法を確立し、ストレスタンパク質遺伝子でもある *degP* の破壊が、膜小胞の増加につながることを明らかにした。加えて、膜小胞に提示できるタンパク質遺伝子をゲノム解析から絞り込み、酵素タンパク質のキャリアーやバイオリクターとしての応用だけでなく、ドラッグデリバリーシステムのバイオツールとして応用の可能性を示す。

## 真菌における一酸化窒素の合成機構・生理的役割の解明

高木 博史 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

### [背景・目的]

一酸化窒素 (NO) はシグナル分子として血圧調節、感染・炎症など様々な生命現象に関与し、哺乳類ではアルギニンから NO 合成酵素 (NOS) により生成する。一方、高等生物のモデルである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ゲノム上に哺乳類 NOS のオルソログが存在せず、NO 研究は進んでいない。我々は、酵母において NO が Tah18 タンパク質依存的な NOS 活性により生成し、銅代謝に関する転写因子 Mac1 の活性化を介して高温耐性に寄与することを見出した。本研究では、酵母における NO の合成機構と生理的役割を解明するとともに、NO が酵母の発酵力や病原真菌の表現型に及ぼす影響についても解析を行った。

### [方 法]

プルダウンアッセイにより同定した Tah18 と相互作用するタンパク質、アルギニン酸化に関わると推定される酵素に着目し、機能を解析した。また、ビオチンスイッチ法を用い、NO により S-ニトロソ化されるタンパク質の同定を試みた。さらに、既知の NO 代謝関連タンパク質や同定したタンパク質の遺伝子発現改変株を作製し、NO 量の測定や表現型、発酵・生理特性などの解析を行った。

### [結果・考察]

通常、Tah18 依存的な NOS 活性は Dre2 タンパク質との結合により抑制されているが、過酸化水素、高温など酸化的条件下では Dre2 から遊離した Tah18 がアルギニン酸化に関与するタンパク質に電子を伝達し、NOS 活性が発現するという新規な NO 合成機構を提唱した。アルギニン酸化に関わるタンパク質については、ヘム依存性酸化酵素の中から発現抑制や阻害剤添加の実験により候補を絞り込んだ。また、NOS 活性に必要な NADPH の生成に関わる酵素を初めて同定し、解析を進めている。さらに、Tah18 の哺乳類オルソログ Ndor1 が酵母の NO 合成に関与することを見出し、新規な NO 合成機構が真核生物に広く保存されている可能性を示した。一方、高濃度の過酸化水素処理に伴い Tah18 依存的な NO 合成が細胞死を誘導することから、NO の二面性 (細胞保護・細胞毒性) も明らかになった。また、ビオチンスイッチ法を確立し、NO 処理後に特異的に検出されるタンパク質を多数同定した。応用面では、NO 耐性に寄与する遺伝子の破壊により発酵力が増加する傾向にあり、NO 量との関連が注目される。病原真菌では、*Candida* 属の多剤耐性株や *Aspergillus fumigatus* の臨床株の中に、NO 量または NO 耐性の低いものが存在し、NO と病原性との関連が強く示唆された。

## 木材腐朽のシステム合成生物学への挑戦

中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)

### [背景・目的]

木材腐朽菌（主に担子菌の一部）は、多糖とリグニンが複雑に混ざり合って構成される木質バイオマスを効率的に生分解可能な主要な生物であり、地球上の炭素循環において重要な役割を担っている。この木材腐朽は、多数の因子が連携して達成される固液反応である。本研究の最終目標は、今まで木材腐朽菌でほとんど不可能だった遺伝学的アプローチを通して、この複雑な木材腐朽機構に重要な因子類を把握し、腐朽機構の改変および下等生物への移植(合成生物学)を達成することである。本発表では、白色腐朽菌(木質中のリグニンを分解可能) ヒラタケを用いた順遺伝学および逆遺伝学によって、リグニン分解に影響を与える因子を同定したことを報告する。

### [方 法]

ヒラタケの遺伝子変異および破壊株を、ブナ木粉培地上（30-60 メッシュで、木粉比6% の小麦ふすまを含む）で培養した後、脱脂処理を行った。腐朽木粉培地中の残存リグニンの定量は、Klason 法に従って行った。

### [結果・考察]

リグニン分解活性（木粉培地中のリグニン分解能力）不全の原因変異を同定したが、転写制御関連がほとんどであった。そこで、比較 RNA-seq 解析を行い、変異体で共通して転写減少する遺伝子を絞り込んだところ、リグニン分解に関与する可能性が考えられる菌体外酵素をコードする遺伝子が多数含まれていた。これらの遺伝子に関して、単独および多重遺伝子破壊を行なったが、リグニン分解活性が顕著に減少した株は見つからなかった。RNA-seq データに基づいて、さらに効率的な多重遺伝子破壊を可能にする必要性が考えられたため、白色腐朽菌複数種におけるゲノム編集法を確立した。次に、木質中でリグニンとキシラン側鎖が共有結合していることを踏まえて、推定上のキシラン分解酵素であり、白色腐朽菌におおよそ特徴的な GH11 酵素遺伝子（ヒラタケのゲノム上には 2 種類存在する）の破壊を行なった。結果、片方の遺伝子破壊株において、リグニン分解能力の減少が見られた。上記の結果を踏まえて、リグニン分解活性に必要な因子群のさらなる同定および同定した因子の異種発現を通して、木材腐朽能力の付与および改変を可能にする方策を検討している。



## 要旨(寄付講座助成)





## 微生物による「ものづくり」のイノベーション： 微生物の潜在能力発掘・応用のための新手法の開発と実践

尾 伸 宏 康（東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在機能探索寄付講座）

### [背景・目的]

ゲノム解読技術の進展は、微生物のもつ「多種多様な低分子化合物の生合成能力」が我々の想像を超えて高いことを明らかにした。例えば、放線菌ではこれまでに明らかになっている二次代謝産物よりはるかに多い二次代謝生合成遺伝子群がゲノム内に存在している。このような微生物に隠された能力を発掘して「ものづくり」に応用するための新しい手法の開発が求められている。そこで、微生物潜在機能探索寄付講座では、新しい概念に基づく微生物培養を出発点としたスクリーニングによって、新規化合物を取得するとともに、新たに見出した新規生合成酵素群をコンビナトリアル生合成に応用することを目指した。

### [結果・考察]

#### 1. 複合培養：微生物相互作用を利用した放線菌二次代謝活性化

土壌微生物である放線菌は多様な二次代謝産物を生産することが知られており、その一部は抗生物質などの医薬品として人類の健康に多大な貢献をしてきた。*Streptomyces* 属放線菌は 1 株あたり 40 個前後の二次代謝生合成遺伝子群を有することがゲノム解析より明らかとなったが、それに対して実際に生産が確認される二次代謝産物は数個程度とその数には大きな乖離がある。その理由の一つとして、自然環境中と実験室での純粋培養中での生育環境の違いが考えられる。そこで我々は微生物間相互作用が二次代謝に与える影響に着目し、ミコール酸を細胞表層に有する微生物 (MACB: Mycolic Acid Containing Bacteria) が放線菌に刺激を与えることにより純粋培養時には生産しない二次代謝を共培養特異的に行う現象を発見し、複合培養法と命名した。複合培養は放線菌と MACB が物理的接触を受けることにより二次代謝が活性化される。その作用機構の解析について、これまでに明らかにしたことを紹介したい。

#### 2. 複合培養による新規二次代謝産物の発見

約 9 割の放線菌において、複合培養法により二次代謝が変化することが明らかとなった。そこで、複合培養法を自然環境から分離した放線菌に適用することにより、純粋培養では生産しない二次代謝産物の探索を行った。これまでに 8 種類の放線菌より 23 種類の新規二次代謝産物を発見した。発見された化合物の生物活性や化学構造は多岐にわたり、多様な二次代謝の活性化が複合培養を用いることにより可能になることを示した。

### 3. ゴードスポリンの作用機構；新規作用機構を有する抗生物質の開発に向けて

ゴードスポリン (GS) は放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 の生産する二次代謝産物であり、SRP (シグナル認識粒子) に結合する。SRP は翻訳中のタンパク質の N 末に存在するシグナル配列を認識して結合し、膜に存在する SRP 受容体まで運ぶことによって、膜タンパクや分泌タンパク質の局在化を担っている重要な分子である。SRP を介する機構は全ての生物が有する重要な仕組みであり、SRP が機能しなくなると生物は生育できない。GS は SRP に直接結合することが証明された世界で初めての化合物であり、新規作用機構を有する抗生物質の開発におけるリード化合物になることが期待される。また、SRP は生物種ごとに構成タンパク質のアミノ酸配列が異なり、ゴードスポリンは放線菌の SRP にしか作用しないことが明らかとなっている。このように SRP は生物に必須であるにもかかわらず、生物種ごとに少しずつ構成タンパク質の構造が異なるため、病原菌 SRP に選択的に結合する化合物が発見できれば、新規作用機構を有する抗生物質のリード化合物となりうる。今回、実際に放線菌 SRP にのみ特異的に結合し、生育阻害を引き起こす GS が発見できたことから、同じような仕組みで病原菌に対して特異的に結合して生育阻害を引き起こす新規作用機構を有する抗生物質の創製が期待される。

### 4. RiPPs 生合成：中分子創薬へ向けた新規 RiPP アナログの効率的な合成システムの確立

天然物創薬においてペプチド系化合物は重要な地位を占めており、それらペプチド骨格の生合成には、リボゾーム翻訳系を使うものと非リボゾーム翻訳系で合成されるものの二種類がある。前者は総称して RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides) と呼ばれ、天然物中で大きなウエイトを占めている。RiPPs 生合成においては、リボゾーム翻訳系によって鋳型 DNA より合成されたペプチド骨格のアミノ酸が様々な修飾反応を受けることによって、活性を持つ化合物へと変換される。RiPPs はその前駆体ペプチドが遺伝子情報として存在するために、その構造遺伝子配列の塩基置換によって容易に前駆体ペプチドのアミノ酸配列を変えることができ、その結果、多様なアナログ体を創出することができる。本寄付講座では、RiPPs のうち直鎖アゾール環含有ペプチドに分類される GS の生合成をモデル系として用いて、試験管内にテンプレート DNA を入れるだけで形質転換等の煩雑な操作無しに、天然ペプチド抗生物質である GS を合成できる系を確立した。本系は *in vitro* 無細胞翻訳系によって前駆体ペプチドを翻訳合成し、その後 GS 生合成に必要な 6 個の翻訳後修飾酵素が関わる 4 段階の生合成反応 (アゾール環形成、デヒドロアラニン形成、リーダペプチド切断、N 末アセチル化) を順次行う事で実現した。本系では、投入する DNA の塩基配列を変えるとそれに応じた GS アナログが簡便に合成できる。さらには今回の *in vitro* 反応の結果に基づき、有望な候補ペプチドを放線菌を使って *in vivo* 系で大量調製できることも実証した。本システム (GS-FIT システム) を用いることで、RiPPs 系天然ペプチドをベースにした創薬開発の加速が期待できる。





## 要旨(一般研究助成)



## 微細藻類に寄生するクリプト菌門の多様性の解明と培養系の確立

鏡味 麻衣子（東邦大学理学部、現 横浜国立大学大学院環境情報研究院）

クリプト菌門 (Cryptomycota) は 2011 年に提唱された新しい分類群で、菌類の進化を探る上でも重要な系統群である。DNA 解析では多くの湖沼や海洋などにおいて普遍的に検出されるものの、その多くは観察や単離培養はされておらず、存在形態や生態は殆ど明らかになっていない。本研究ではクリプト菌類の中でも微細藻類に寄生する種類に焦点をあて、Single Spore PCR 法により多様性を解明することを目的とした。印旛沼およびドイツの Stechlin 湖から採取した湖水から、珪藻、緑藻、藍藻など多様な藻類に付着した菌類をピックアップし、その菌類から直接 DNA を抽出し解析した。サンガー法で解析した結果、多くはツボカビであったが、印旛沼の珪藻 *Aulacoseira* 2 種からクリプト菌が検出された。Stechlin 湖の珪藻 *Fragilaria* について、次世代シーケンサーを用いて解析した結果、寄生性ツボカビに加えクリプト菌も検出された。検出されたクリプト菌は *Rozella* 属に近縁であり、藻類自体よりは藻類に寄生するツボカビに寄生する可能性が高い。クリプト菌を培養するために、藻類との 2 者培養系の確立を試みたが、うまくいかなかった。クリプト菌がツボカビに寄生しているのであれば、藻類とツボカビとクリプト菌の 3 者培養系を確立する必要がある。

## アーバスキュラー菌根菌の *in vitro* 培養方法の確立と日本産菌株の整備

石田 孝英（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌は多くの陸上植物の土壤養分吸収を担う重要な共生菌であるが、従来のポット栽培による継代ではクロスコンタミネーションが起きやすく、バクテリア・腐生菌の混入も不可避である。そこで本研究では、毛状根を用いた *in vitro* 培養により日本産 AM 菌の無菌培養株を収集することを目的とした。

全国 20 カ所から 100 以上の土壌を採取し、現在までにそれらの一部について i) サンプル土壌からの胞子と根の採取、ii) 野外土壌を屋内でポット栽培したあとの (新鮮) 胞子の採取、iii) すでにポット栽培で分離されている AM 菌株の胞子採取を行い、表面殺菌の後ゲランガム培地上で発芽を試みた。i, ii の方法から得られた胞子は多くの場合、発芽率が非常に低く、発芽した場合でも毛状根への感染や継代培養が困難であった。iii では 16 株を試みた結果、胞子の発芽率は高いもので 49% あったが、発芽しない菌株も多数あり、*in vitro* での継代培養が成功したものは 1 株だった。

その他、AM 菌の宿主となる毛状根を、ニンジン・イモカタバミ・ジャガイモから自作した。これらのホストとしての性能を MUCL-GINCO の毛状根 3 系統と比較した結果とアルギニンビーズ包埋による AM 菌胞子の凍結保存方法について報告する。

## 群体性オオヒゲマワリ目藻類（緑藻綱）に近縁な単細胞性藻類の系統分類学的研究

仲田 崇志（慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科）

オオヒゲマワリ目（緑藻綱）の中でもテトラバエナ科（*Tetrabaenaceae*）、ヒラタヒゲマワリ科（*Goniaceae*）、オオヒゲマワリ科（*Volvocaceae*）からなる系統群（TGV 系統群）には様々な進化段階の群体性藻類が知られており、群体性進化のモデル系統群となっている。*Euchlamydomonas* 型の葉緑体（杯状で底部に単一のピレノイドを伴う）を持つ *Chlamydomonas* および *Vitreochlamys* に属する種の一部が TGV 系統群に近縁であることは知られるが、姉妹群は特定されていない。そこで本研究では *Euchlamydomonas* 型の葉緑体を持つ系統不明の培養株を取り寄せ、あるいは新たに単離し、18S rRNA 遺伝子系統から TGV 系統群の近縁種を新たに 13 系統（計 32 系統）見出した。この内培養株が入手できなかった 3 系統を除く 29 系統と TGV 系統群について、葉緑体 5 遺伝子を加えた 6 遺伝子系統解析を行った。その結果、単細胞性 29 系統群は 6 系統にまとめられ、TGV 系統群の姉妹群の候補を絞り込むことができた。光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いた観察によると、各系統群間にはほとんど形態的な差がなく、群体性に関連する形質がごく短期間に成立したことが示唆された。また培養株の収集過程で興味深い未記載種をいくつか見出したため、併せて報告したい。

## 人獣共通感染症原因菌 *Escherichia albertii* の遺伝子解析および表現型解析による分類

村上 光一（国立感染症研究所感染症疫学センター）

ヒトに消化器症状を惹起する *Escherichia albertii* は 2 種類の生物型に分類されているが、この生物型に含まれない菌株が多数存在し、同定が困難となっている。遺伝子型（PFGE 型）の異なる *E. albertii* 107 株及び基準株及び標準株を加えた全 111 株について、生化学性状等 80 性状により型別した。その結果、81 のプロファイルに分類された。野生株で生物型 1 あるいは 2 を示す菌株はなかった。生物型 1 および 2 の菌株のみが示し、他の菌株が示さなかった性状はインドール反応の結果あるいはリジン脱炭酸反応の結果以外にはなく、生化学性状において大きな乖離が生物型間であるわけではなかった。しかし、臨床検査における利便性を考え生物型 3 を設けるのが適切であると考えられる。この場合、リジン脱炭酸試験、インドール試験、白糖・乳糖からのガスの産生、運動性、硫化水素産生性、クエン酸利用能により分類することが実用的であると考えられた。また、40 菌株について次世代シーケンサーを用い 111 遺伝子に着目し型別した結果、系統的に、G1-G5 に分類された。

## 東アジア地域における動物関連物質分解に関連する菌類（糞生菌類、アンモニア菌類）の研究

吹春 俊光（千葉県立中央博物館生態環境部）

糞生菌類：欧州などでは詳しく調査されているがアジアではほとんど未調査である。本研究ではヒトヨタケ類とチャワソウタケ類の糞生菌類を、国内（千葉、京都、沖縄）と国外（ベトナム）で調査した。◇国内：日本産糞生ヒトヨタケ類は従来 13 種が知られていた。今回、千葉県、京都府、沖縄県で採集したシカ糞等から日本産種 3 種（*Coprinellus pusillulus*、*C. pellucidus*、*Parasola misera*）を含む 7 種のヒトヨタケ類を採集した。またイリオモテヤマネコ糞から日本新産の *Ascobolus crenulatus*、*A. lineolatus*、*A. fushanus* の 3 種を採集した。◇国外：ベトナムからは 6 種の糞生ヒトヨタケ類が知られていた。今回の調査で、ベトナム新産 3 種、新種と思われる 3 種を含む、合計 8 種のヒトヨタケ類を分離した。

アンモニア菌類：未記載種（*Panaeolina* sp. 3, Sagara 1975）の発生が期待された北海道において調査区を設置し目的の菌を分離することができた。本報告会では今回採集したそれぞれの種の形態や分子系統の詳細を紹介する予定である。

## 住宅室内真菌叢におけるアレルゲンの多様性に関する真菌の系統分類学的検討

渡辺 麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

東北および九州地方に建設された築年数 1～50 年の木造一戸建て計 20 戸を対象として、室内のハウスダストおよび空気に含まれる床付着真菌および空中浮遊真菌の分類およびアレルゲン遺伝子アミノ酸配列の解析を行った。

その結果、築年数が古い住宅では総真菌数が比較的高く、かつ *Cladosporium* 属菌の占める割合が高いこと、新しい住宅では *Aspergillus* 属菌および *Eurotium* 属菌の割合が高い傾向にあることが示された。また、アレルギーリスクの高い *Aspergillus* 属菌種の検出傾向を比較したところ、築年数に関わりなく、最もアレルギー性の高い真菌である *A. fumigatus* はほとんど検出されず、*Aspergillus Section Restricti* および *Eurotium* 属菌が優制的に検出される住宅の頻度が高かった。そこで、これら *A. fumigatus* および高検出菌種の分離菌株を用いて、アレルゲン遺伝子 Asp\_v\_13 のアミノ酸配列を決定し、比較解析を行った。その結果、配列共通性は高く、*A. fumigatus* 以外の多様な *Aspergillus* 属菌も高いアレルギー性を有する可能性が示唆された。

## ヒト口腔領域における *Veillonella* 属細菌の系統分類と バイオフィーム形成に関する生態学的研究

眞島 いづみ (北海道医療大学歯学部)

*Veillonella* 属細菌は、ヒト口腔等から高頻度に分離される偏性嫌気性グラム陰性球菌である。歯科の二大疾患であるう蝕と歯周病の原因は口腔バイオフィームであり、その初期形成期に *Veillonella* 属細菌が重要な役割を担うことが示唆されてきたが、培養や菌種の判別が困難である等の理由から、その詳細な研究が進められてこなかった。

本発表では、ヒト口腔より分離、確立した *Veillonella* 属新菌種、*Veillonella infantium* (JCM 31738<sup>T</sup>=ATCC TSD-88<sup>T</sup>) (Mashima *et al.*, IJSEM, in press, 2018) について報告する。更に以前我々の研究室で分離、確立したヒト口腔由来の *Veillonella tobetsuensis* の培養上清から同定された、細菌間情報伝達物質である Autoinducer-2 (AI-2) と Cyclo (-L-leu-L-pro) の口腔バイオフィーム初期形成抑制作用について考察する。

## 質量分析法を用いたバクテリアのペプチドグリカンアミノ酸構造決定法の 開発

浜田 盛之 (製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター)

ペプチドグリカン(ペグ)は細菌の細胞壁の主要構成成分であり、そのアミノ酸構造によって定義されるペプチドグリカンタイプ (Schleifer & Kandler, 1972) は、グラム陽性細菌における属レベルの指標として広く用いられている。しかし、Schleifer & Kandler (1972) の手法は二次元 TLC によるもので、分析・同定には熟練とノウハウが必要なため、現状は特定のグループしか実施できない。そこで本研究では、簡便なアミノ酸構造決定法を開発することを目的とした。まず、ペプチドグリカンの加水分解条件を検討したところ、4N 塩酸で 100℃45 分間加水分解した際にジペプチドやトリペプチドが多く残存することを見出した。次に検出法を検討したところ、加水分解物中のアミノ酸やペプチドを 3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメートで誘導体化した後、逆相系カラムを使用した LC-MS で分離・検出可能なことが明らかとなった。詳細構造が決定されている *Cellulomonas flavigena* NBRC 3775<sup>T</sup> と *Oerskovia turbata* NBRC 15015<sup>T</sup> をモデルに分析を行ったところ、既報の構造と一致するペプチドが検出され、本手法がアミノ酸構造決定において有効であることが示唆された。



## 原生生物の細胞表面に共生する *Treponema* 属細菌の シングルセルゲノム解析

雪 真弘 (理化学研究所環境資源科学研究センター)

シロアリ腸内に共生する原生生物には、その細胞内、細胞表面に細菌が共生し、多重共生系を構築している。本研究では、*Treponema* 属原生生物細胞表面共生細菌のゲノムをシングルセルゲノム解析技術を駆使し解読することによって、共生系における役割を解明することを目的とした。原生生物 *Pyrsonympha* の細胞表面には、3種類の *Treponema* 属細菌 (Cluster I、Cluster IIA、IIB) が共生しており、シングルセルゲノム解析により各細菌のゲノム解読を行った。その結果、ゲノム完全性が Cluster I 92.8%、Cluster IIA 85.6%、Cluster IIB 43.9% のドラフトゲノム配列が得られた。アノテーション解析から、Cluster I は還元的酢酸生成関連遺伝子を有しており、二酸化炭素と水素から酢酸を生成し、エネルギー源としてシロアリに供給している可能性が示された。Cluster IIA は多種多様な糖質加水分解酵素遺伝子を有していたことから、宿主原生生物と協調して木材分解を行っており、分解で生じた遊離糖を Cluster I、Cluster IIB が取り込んでいる可能性が考えられた。これまでの結果から、原生生物細胞表面上で3種の *Treponema* 属細菌が役割分担して共生していることが示唆された。現在、ゲノム完全性が低い Cluster IIB に関しては、シングルセルゲノム解析とミニメタゲノム解析を組み合わせ、完全性の向上を目指している。

## ナノアーキアの検出と培養株確立の試み

伊藤 隆 (理化学研究所バイオリソース研究センター)

近年、大きさが 500 nm 程度と微小で、他のアーキアに外部共生 (寄生) していると思われる多様なアーキア群 (本研究ではナノアーキアと称する) が見つかってきている。このうち *Nanoarchaeota* 門アーキアは、海底熱水孔や陸上温泉から頻繁に検出されており、またこれまでに2株が培養化に成功している。しかしながら、その生態学的実態や宿主範囲、共生 (寄生) のメカニズムはよく分かっていない。本研究では *Nanoarchaeota* を中心にその分布パターンの解明と培養株の確立を目指すことを目的とした。

国内より火山性酸性温泉水を採取し、そのうちの3試料についてユニバーサル 16S rRNA 遺伝子プライマーを用いた菌叢解析を行ったところ、野外で採取した温泉水2試料には17~37%、屋内浴槽中温泉水には1.4%の *Nanoarchaeota* が検出された。これら温泉試料についてアーキアが生育する様々な培養条件下で集積培養を行ったところ、浴槽温泉水のみ、70°C・pH 2.5・好気条件下の集積培養物は一次 PCR で *Nanoarchaeota* を検出することが可能であった。

## 微生物に見出した新規で多様なアミド結合形成酵素の網羅的解析と利用

大 利 徹 (北海道大学大学院工学研究院)

筆者らが見出した、アミノ酸類のカルボキシ末端を ATP を用いてリン酸化により活性化し、ペプチド類を求核剤として利用する新規 ATP-grasp ligase 相同遺伝子の機能解明を行った。合計 10 株の放線菌に見出した、相同遺伝子を含む推定クラスターを PCR で増幅後、各々近縁の異種宿主での発現を行った。種々の培地を用いて特異的に生産される代謝産物の同定を試みたが、殆どの株で特異的化合物の生産は認められなかった。おそらく、用いた殆どのクラスターが休眠状態にあると考えられた。唯一、*Nocardiopsis baichengensis* NBRC 104399 由来のクラスターを *Streptomyces lividans* で発現させた株では、クラスターの一部の遺伝子が機能したと推定される N-アセチルクロロチラミンの生産が認められた。

また、本研究の過程で、微生物のペプチドグリカンの生合成に関与する ATP-grasp ligase である新規酵素 UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu synthetase (MurD2) を見出した。

## 糸状菌テルペノイドのコンビナトリアル生合成

一 瀬 博文 (九州大学大学院農学研究院)

セスキテルペノイドは多種多様な生物活性を示す魅力的な天然化合物である。その生合成経路では、セスキテルペン合成酵素 (STS) とシトクロム P450 (P450) が重要な役割を果たしており、STS と P450 の連鎖的な作用によって複雑多岐に渡る化合物が産生される。本研究では、白色腐朽担子菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) および褐色腐朽担子菌 (*Postia placenta*) に由来する 26 種類の STS を完全長 cDNA として獲得することに成功した。得られた STS の機能を同定するとともに、STS を 425 種類の糸状菌 P450 と酵母細胞内に共発現させて様々なセスキテルペノイドの産生を試みた。一連の検討により、ビスボレン合成酵素と 5 種類の P450 を用いることで、7 種類のビスボラン型セスキテルペノイドの産生を可能にした。また、プロトイルデン合成酵素と 3 種類の P450 を組みあわせて、5 種類のプロトイルダン型セスキテルペノイドの合成を達成した。本研究においては、担子菌 STS と麹菌 (*Aspergillus oryzae*) P450 の組みあわせなど「生物種の壁を越えた生合成経路の再構築」によってユニークな化合物が得られることも示され、天然化合物のコンビナトリアル生合成を加速する興味深い結果が得られた。



## 焼酎麹菌のクエン酸高生産機構の鍵となるクエン酸トランスポーターの 同定と機能解析

二神 泰基 (鹿児島大学農学部)

本研究は白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) のクエン酸高生産機構の解明を目的として、クエン酸輸送体 (CtpA と YhmA) を解析した。まず、白麹菌のミトコンドリアから CtpA と YhmA を精製し、クエン酸輸送活性を測定した。その結果、CtpA と YhmA は交換輸送体であり、CtpA はリンゴ酸と *cis*-アコニット酸を対向基質としてクエン酸輸送活性を示し、一方、YhmA はリンゴ酸、*cis*-アコニット酸、オキシグルタル酸、オキサロ酢酸、コハク酸を対向基質としてクエン酸輸送活性を示した。次に、白麹菌において *ctpA* と *yhmA* のそれぞれを破壊すると、菌体あたりのクエン酸生産量が減少した。また、コンディショナルな破壊株を用いた実験から、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊が最小培地で合成致死であり、リジン要求性となることが明らかになった。また、培地へのリジン添加によりクエン酸生産が抑制されることを見出した。以上の結果から、CtpA と YhmA がクエン酸高生産に関与するクエン酸輸送体であり、ミトコンドリアから細胞質へのクエン酸輸送がリジン合成に関与することが示唆された。

## 分裂酵母の細胞寿命制御に学ぶ健康長寿創薬の基盤研究

饗場 浩文 (名古屋大学大学院創薬科学研究科)

分裂酵母をモデルとして生物の寿命がどのようにして決まるのかを理解することに挑戦し、以下の成果を得た。これらはヒトの健康長寿に資する創薬・食品開発等の基盤知識になると期待される。

(A) 分裂酵母から長寿命変異株を大規模にスクリーニングし、新規な必須キナーゼ Nnk1 に変異 (*nnk1-35*) が生じることで経時寿命が延びることを発見した。*nnk1-35* 変異株では主要なグルコーストランスポーターである Ght5 の発現が低下すると共に局在にも異常が見られた。これによりグルコースの利用が正常に行われず、細胞がカロリー制限様の生理状態になることで経時寿命が延長したと考えた (FEMS Microbiol. Lett. 364 (2017))。

(B) 長生き因子 Ecl1 は転写レベルで硫黄源の枯渇にตอบสนองして転写因子 Zip1 により発現誘導されることを発見した。さらに、硫黄枯渇はリボソームの低下を介して新しい寿命延長シグナルとして作用することを見出した。これを基に、「寿命制御におけるリボソーム仮説」を提唱した (Mol. Microbiol. 105 (2017), FEMS Yeast Res. Rev. (2017))。さらに Ecl1 タンパク質の機能-構造相関を解析し、Ecl1 は亜鉛結合タンパク質であることを示した (Mol. Genet. Genomics 292 (2017))。

## 細菌のタンパク質アシル化修飾を標的とした代謝改変に関する研究

古園 さおり (東京大学生物生産工学研究センター)

グルタミン酸発酵生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* では、Tween 40 添加などの刺激によりグルコースからグルタミン酸生成に至る代謝酵素反応のフラックスが上昇することが知られている。本研究では、グルタミン酸生産に特徴的な代謝フラックス変化を誘発するメカニズムとしてアシル化修飾という新しい可能性に注目し、グルタミン酸生産に重要な代謝酵素のアシル化修飾の機能解析を行った。オキサロ酢酸供給に関わるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) について、グルタミン酸生産に必須なアセチル化部位を見出し、アセチル化を介した PEPC 活性調節機構とグルタミン酸生産におけるその意義を明らかにした。また、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH) 活性調節因子 OdhI におけるスクシニル化は、その制御標的である OdhA サブユニットとの相互作用を阻害し、ODH 活性やグルタミン酸生産に影響を及ぼすことを見出した。本研究により、アシル化修飾が PEPC や ODH などグルタミン酸生産において鍵となる代謝酵素の活性調節に関わることを明らかにすることができた。

## 微生物による多様な金属酸化物の合成に関する研究

山本 兼由 (法政大学生命科学部)

*Actinobacteria*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* を含む様々な微生物は、水溶液中の Mn (II) を酸化して不溶性の Mn(IV) 酸化物を形成する。本研究では、微生物の金属酸化システムを再構成させ、金属酸化物の効率的な発酵合成と多様な金属酸化物合成デザインの制御を目指し、マンガン酸化物を合成する *Pseudomonas putida* からマンガン酸化物合成酵素遺伝子を単離同定することを行った。

マンガン酸化活性が確認される *P. putida* GB-1 を参考に、*P. putida* KT2440 の金属酸化活性について調べた。KT2440 は寒天培地中の添加する金属によって異なる呈色をもつコロニーを形成した。さらに、KT2440 を、金属を添加した液体培地で培養したところ、この呈色化合物は細胞外に存在することを確認した。GB-1 で推定される全 7 種類のマンガン酸化遺伝子のすべてを KT2440 で確認した。これらの遺伝子がゲンタマイシン耐性遺伝子カセットで破壊された組換え遺伝子を pK19mobsacB プラスミドベクター上にクローニングし、接合によって KT2440 ゲノム上にこの組換え遺伝子を導入し、7 種類のマンガン酸化遺伝子の欠失株を単離した。親株と比較して、寒天培地上でのマンガン酸化物量を比較したが、すべて欠失株で顕著な違いを確認できなかった。これらの結果を踏まえ *P. putida* KT2440 のマンガン酸化能について議論する。

## 細菌による機能性プラズマローゲン生産の基盤となる酵素の分子機構の解明

金子 淳 (東北大学大学院農学研究科)

近年、アルツハイマー症の発症予防や進行抑制の期待から、グリセロール骨格の 1 位に尾部がビニルエーテル結合したリン脂質であるプラズマローゲンのサプリメントとしての需要が高まっている。我々はアミロイドβ産生に関わる膜酵素γセクレターゼ活性を嫌気性ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* のエタノールアミン型プラズマローゲンを豊富に含む膜脂質画分が用量依存的に抑制することを発見し、細菌によるプラズマローゲン生産の可能性を発想した。本研究はその実現に向け、細菌酵素によるプラズマローゲン生産の分子機構の解明を目指した。ゲノム解析情報からグラム陽性型リン脂質生合成酵素 PlsX、PlsY の関与を予想し、それらの遺伝子を枯草菌並びに大腸菌に導入した。様々な培養条件で得た菌体のリン脂質画分を DNP 法により解析した結果、いずれの評価系でも PlsX、PlsY とともに導入した株を静置培養することでプラズマローゲンの生産を確認し、両者のビニルエーテル結合導入への関与が示唆された。現在、PlsX のアミノ酸の点変異の影響及び PlsX 大量発現条件を検討する一方、本菌におけるプラズマローゲンの生理的意義の解明を進めるため、形質転換系の確立を進めている。

## *Corynebacterium glutamicum* のストレス応答性新奇遺伝子による TCA 回路鍵酵素の制御機構の解明

川崎 寿 (東京電機大学工学部)

*Corynebacterium glutamicum* によるグルタミン酸過剰生産は、特定のストレスで引き起こされる。本菌には、このストレスに応答して転写が増大する遺伝子が 7 つ存在する。これらはいずれも機能が未知である。本研究では 7 遺伝子のうち *uk2* と *uk3* に着目し、それぞれの遺伝子欠損株、相補株、増幅株を作製して機能解析を行った。

*uk2* の ORF に変異を導入した株の表現型から、*uk2* がコードする機能分子はタンパク質ではなく non-coding RNA であることが示唆された。*uk2* は糖代謝の制御因子であること、PDHc/ODHc の活性制御へ関与することが示唆された。Non-coding RNA のターゲット分子が何か、興味深い。

*uk3* がコードする機能分子はタンパク質であり、糖代謝の正の制御因子であることが示唆された。アミノ酸配列から Uk3 は膜に存在することが予測され、それを支持する実験結果も得られた。これらから、Uk3 はグルコースの取り込み制御に関与する因子ではないかと考察している。本遺伝子は真正細菌に広く分布することが分かっているが機能解析例は他に無い。新機構の発見を期待してさらに解析を進めたい。

## グリセロール資化性乳酸菌 *Enterococcus faecalis* が行う好気性乳酸発酵の発現条件の解明とそれを利用した廃棄グリセロール再資源化技術の構築

土肥 裕希 (岡山理科大学工学部)

高濃度のグリセロールを炭素源に用いて好気培養された乳酸菌 *Enterococcus faecalis* は、その代謝産物としてアセトイン、酢酸、エタノールなどをほとんど産生せず、L-乳酸のみを盛んに産生する。本課題では、この「好気性乳酸発酵」の発現が乳酸発酵以外のピルビン酸代謝経路の抑制に起因することを明らかにした。具体的には、ピルビン酸の好気代謝経路を担う酵素の遺伝子発現または活性はグリセロール代謝で生じた多量の NADH 由来の還元ストレスによって抑制され、その嫌気代謝経路を担う酵素は供給された酸素によって失活した。これらに対して、乳酸発酵を担う L-乳酸脱水素酵素の遺伝子発現および活性はそれらの影響をほとんど受けなかった。*E. faecalis* のこの代謝は、1.5 M のグリセロールおよび 1.4 M の廃棄グリセロール (不純物を含むグリセロール) から 120 時間以内にそれぞれ 1.4 M および 1.15 M の L-乳酸の発酵生産を可能にした。これらの生産量は既報を大きく上回る。このように、我々は乳酸菌 *E. faecalis* に見出された「好気性乳酸発酵」の発現メカニズムを解明し、その応用性を実証した。

## 乳酸菌の代謝能を利用した有用機能性物質の生産とその応用に関する研究

五十嵐 康弘 (富山県立大学工学部)

我々は、乳酸菌発酵物から美容や健康に有用な天然成分を探索する過程で、薬草粉末を添加した豆乳を乳酸菌発酵すると、未発酵の薬草入り豆乳発酵液には見られない様々な生理活性が出現する現象を見出した。例えば、ウコン等の沖縄産薬草の乾燥粉末を添加した豆乳に乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* を接種した後、メジウム瓶中で二日間保温すると豆乳は固化するが、その上清にはアミラーゼやキサンチンオキシダーゼ等の阻害活性が見られた。その活性は、薬草抽出液や豆乳には認められなかったことから、乳酸菌が豆乳発酵の過程で薬草成分を代謝変換したことにより得られたと推定した。そこで実際に活性成分を単離、構造決定したところ、乳酸やコハク酸等の有機酸が得られ、予想に反する結果となった。加えて、活性の再現性が安定しなかったことから、改めて発酵条件を精査した。その結果、薬草粉末を滅菌せずに発酵させると、活性が安定して得られることが分かり、酵素阻害成分の生産には乳酸菌ではなく、薬草に付着している微生物が関与していることが強く示唆された。現在は、関与する微生物の同定と、ウコンを添加した豆乳発酵液中に生産される  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質の同定を進めている。



## 植物病原卵菌 *Phytophthora infestans* のシスト発芽阻害物質の作用機序解析

谷 修治 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

*Phytophthora infestans* は、トマトやジャガイモに感染して疫病を引き起こす植物病原卵菌である。*P. infestans* は、主に 15°C 以下の低温条件下でおきる形態形成をへて植物に感染するが、その分子機構の詳細は不明である。本研究では、この形態形成と植物感染機構を解明する事を目的として、まず土壌から単離した放線菌由来の二次代謝産物をターゲットとして、形態形成段階を特異的に阻害する化合物を探索した。本研究では、10°C の条件下で起きる形態形成の内、シストからの発芽を特異的に阻害する化合物を取得し、ESI-MS、<sup>1</sup>H-NMR、と <sup>13</sup>C-NMR スペクトル解析により、β-rubromycin が *P. infestans* のシスト発芽を阻害する事を明らかにした (IC<sub>50</sub>=37 nM)。また β-rubromycin は、25°C 条件下で起きる菌糸伸長を阻害しただけでなく、卵菌 *Pythium aphanidermatum* のシスト発芽と卵胞子からの発芽を阻害した。β-rubromycin は、人テロメラーゼの阻害剤として知られているが、β-rubromycin 寒天培地上での *P. infestans* の生育を阻害しなかったことから、新たな作用機序により *P. infestans* および *P. aphanidermatum* の形態形成を阻害したものと推測している。また、β-rubromycin 存在下でシスト発芽形成時に発現量が変動する遺伝子を RNA-seq 解析及び定量 PCR 法により同定し、発現量が変動した遺伝子のサイレンシング株を作出し、その機能を遺伝学的に解析している段階である。

## 細胞性粘菌由来の低分子化合物 DIF をリードとした新規抗菌剤の開発

久保原 禪 (順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科)

細胞性粘菌類は、世界中の森の落ち葉の下などに生息する土壤微生物の一群である。我々は、細胞性粘菌類を「未開拓 (未利用) 創薬資源」と位置づけ、細胞性粘菌由来の生物活性物質の探索とそれらをリードとした新規薬剤開発を進めている。近年我々は、細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum* 由来の低分子化合物 DIF とその誘導体が抗菌活性を有することを発見した。

Bu-DIF-3 や Ph-DIF-3 等いくつかの DIF 誘導体は、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA、腸球菌、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE 等、我々が調べた全てのグラム陽性菌の発育を強力に阻害した。DIF の作用機序解析を目的とした DIF 耐性株の単離を試みたが、現段階では DIF 耐性株は得られていない。一方、Bu-DIF-3 や Ph-DIF-3 存在下で培養した黄色ブドウ球菌を電子顕微鏡観察した結果、多くの菌細胞内に細胞壁が何層も折り重なったような構造体が形成されることが判明した。この特徴的構造体の形成と DIF の抗菌作用の因果関係は不明だが、今後、DIF の作用機序の解明と、DIF をリードとした抗菌剤の開発を目指したい。

## 乳酸菌由来リボソームによる細胞のリプログラミング機構

太田 訓正 (熊本大学大学院生命科学研究部)

我々は、ヒト皮膚細胞が乳酸菌を取り込むと多能性を獲得することを報告した (Ohta *et al.*, PLoS One, e51866, 2012)。その後、生化学的実験や培養実験により、リボソームが細胞のリプログラミングに関与していることを見出した (Ito *et al.*, Scientific Reports, 8:1634, 2018)。乳酸菌由来のリボソームをヒト皮膚細胞に取り込ませると、細胞塊が形成され、増殖が停止した。また、細胞塊による様々な多能性マーカーの発現を、免疫染色法やシングルセル qPCR 法により確認した。さらには、細胞塊を特殊な細胞分化誘導培養液で培養すると、三胚葉由来の細胞へと分化した。振り返ってみると、「ヒト皮膚細胞が乳酸菌を取り込むと宿主細胞をリプログラミングする」という現象は、乳酸菌体内に充満するリボソームに起因する結果であったと考えれば得心がいく。その後、バクテリアだけでなく真核細胞由来のリボソームにもリプログラミング活性が存在することを確認している。本報告会では、リボソームによる細胞リプログラミング機構についてご紹介する。

## 絶対寄生性の植物病原糸状菌が分泌する宿主細胞壁分解酵素群の新規発見とセルロース系バイオマス糖化酵素高機能化に向けた基礎的研究

八丈野 孝 (愛媛大学農学部)

絶対寄生性の菌のオオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) は、分生子の発芽後に形成した付着器の先端から宿主細胞壁を貫通して侵入し、感染に成功する。付着器内の膨圧による物理的な突破ではなく、付着器から分泌する宿主細胞壁分解酵素群により貫穿すると考えられている。付着器形成から貫穿まではほんの数時間であることから、酵素群は非常に高い活性を持つと予想されるが、それらはまだ見つかっていない。そこで本研究では、長さ数十  $\mu\text{m}$  の付着器発芽管を大量に集めてタンパク質を抽出する実験系を構築し、質量分析装置に供してプロテオーム解析を行った。またさらに、オオムギうどんこ病菌の全ゲノム配列を新たに解読して付着器分泌型タンパク質の同定を行った。その結果、多数の新奇病原性タンパク質に加え、幾つかの細胞壁分解酵素の候補が見つかり、その中のひとつの立体構造モデルが糞生菌のエキソ- $\beta$ -1,3/ エキソ- $\beta$ -1,6/ エンド- $\beta$ -1,4-グルカナーゼの触媒ドメインに酷似することが明らかとなった。報告会では、このタンパク質の生化学的性質および病原性機能の有無についても議論する。

## シロアリおよび糸状菌由来の植物バイオマス分解酵素の性質解明とそれらを利用したバイオマス分解系構築の試み

有岡 学（東京大学大学院農学生命科学研究科）

シロアリは高効率で木材を分解・資化できるが、これには腸内の共生微生物の持つ分解酵素が寄与している。本研究ではそれらの異種生産を行って機能解析を試みた。また、併せて糸状菌由来のバイオマス分解酵素の解析も行った。まず、腸内共生原生生物由来のセロビオヒドロラーゼ EuCBH の麹菌を用いた生産を試みた。その結果、培養上清への分泌生産が認められたが、キャリアが融合されたままのバンドも検出された。そこでキャリアを用いないコンストラクトでの発現も試みたところ、より多量の EuCBH が生産されることがわかった。しかし、これらは活性を示さず、生産した EuCBH が正しくフォールディングしていない可能性が考えられた。次に共生細菌由来のキシラナーゼの大腸菌での生産および機能解析を行った。その結果、キシラン特異的な分解活性が認められ、比活性や安定性の解析から、同じドメイン構造を持つ既知酵素に比べて約 20 倍高い触媒効率を示すことがわかった。併行して *A. fumigatus* 由来のグルクロン酸エステラーゼの麹菌や酵母を用いた生産も行った。酵素学的性質を解析した結果、熱安定性や触媒能に優れた酵素であることがわかった。

## 難培養性 *Dehalococcoides* 属細菌の *Sulfurospirillum* 属細菌による新規増殖促進メカニズムの解明

内野 佳仁（製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）

難培養性 *Dehalococcoides* 属細菌 (UCH007 株) の増殖が *Sulfurospirillum* 属細菌 (UCH001 株) により促進される増殖促進メカニズムを解明するため、培養実験、顕微鏡観察、トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。培養実験の結果、両株を隔離した状態、UCH001 株の増殖活性が失われた状態では UCH007 株の増殖が促進されないことが明らかとなり、「増殖促進因子」は膜を通過できず、UCH001 株が生きている状態でなければ伝達できないものであることが示唆された。また、電子顕微鏡 (SEM) 観察により UCH007 株と UCH001 株が直接結合している状態が多く観察され、2 つの異なる株が接触することにより UCH007 株が増殖促進している可能性が示唆された。RNA-seq の結果では、混合培養時に電子の移動を伴う反応を触媒するチトクロム類や還元酵素と推定される遺伝子の発現量が大きく上昇していることが明らかとなり、今回の結果やこれまでの培養実験の結果を併せて考察すると、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖促進は微生物間で電子を介して起きている可能性が考えられる。

## カリウム輸送タンパクの人工進化によるセシウム蓄積微生物の創出

加藤 創一郎 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

生物を使った放射性セシウム (Cs) の回収は低コスト・低環境負荷という観点から注目されている。しかし通常の生物は Cs と性質が類似するカリウム (K) の輸送系を介して非特異的に Cs を取り込んでいるに過ぎない。例えば大腸菌の K 輸送タンパク Kup は非特異的な Cs 輸送活性を持つが、その活性・親和性は K に対するものの 1/10 以下にすぎない。本研究では大腸菌の Kup タンパクを人為的に進化させ、高い Cs 輸送活性・親和性を持つ変異型 Kup を作製・選抜し、大腸菌に高い Cs 取り込み能を付与させることを試みた。エラープローン PCR 法により大腸菌 *kup* 遺伝子にランダム変異を導入し、大腸菌 *kup* 欠損株に形質転換し、約 3 万株からなる変異株ライブラリーを作製した。変異株ライブラリーを K 欠乏・Cs 存在下で集積培養し、K 欠乏・Cs 存在下で有意に増殖が改善する C1 株、C2 株を得ることに成功した。この 2 株は  $K^+ 10 \mu M$ 、 $Cs^+ 10-100 \mu M$  の条件で、大腸菌野生株と比較して最大で 46 倍の  $Cs^+$  取り込み能を示した。C1 には E80G、C2 には D283N、T374A および T512A のアミノ酸置換が確認され、陽イオンの認識に関与することが知られている酸性アミノ酸が  $Cs^+$  に対する親和性・特異性にも寄与していることが示唆された。

## 好熱菌の未知代謝経路の同定とグリセロールから有用光学活性物質を生産する新たな微生物発酵法の開発

亀谷 将史 (東京工業大学地球生命研究所、現 東京大学大学院農学生命科学研究科)

光学活性な D-乳酸は機能性ポリマーの材料として有用であり、その安価な生産法の開発が望まれている。既存の D-乳酸発酵法の多くは、大腸菌など本来 D-乳酸生産能のない宿主に D-乳酸合成遺伝子を導入したものであり、宿主本来の代謝による副産物生成や収率低下が課題となっている。また、グリセロールは燃料製造などの工業過程で副生成物として大量に発生し、有用物質生産のための安価なバイオマスとしてのみならず、産業廃棄物としても有効利用が望まれている。

本研究では、グリセロールを単一炭素源とした培地で D-乳酸を選択的に蓄積する微生物を単離・解析した。系統解析から、単離株は *Geobacillus* 属に属すると推定された。本属の菌において同様の D-乳酸生成能はこれまで報告されていない。菌株保存機関から *Geobacillus* 属類縁種 7 株を取り寄せ同様の条件で培養したところ、単離株のような旺盛な生育や D-乳酸蓄積は見られず、単離株が類縁種の中でも特異な生育能・発酵能を有することが示唆された。さらに、ドラフトゲノム解析および各種酵素活性測定を行い、D-乳酸生成経路を推定した。本経路中酵素の発現増強や D-乳酸資化経路の破壊を行うことで、さらなる生産性向上が期待される。



## 新規ポリマー生産のための均一なゴム低分子化システムの構築 「ゴム廃棄物の再資源化を目指して」

笠井 大輔（長岡技術科学大学工学研究院）

ポリイソプレンゴムは工業的に幅広く利用されているが、その廃棄物は燃焼や埋め立てにより処理されており、温室効果ガス増加等の環境負荷が懸念されている。本研究では、ゴム廃棄物の削減と処理プロセスの革新を目指して、微生物の酵素系を利用したゴム変換系の開発を進めている。

加硫ゴムの分解能を有する *Nocardia* sp. NBRC 15532 株のゴム分解機構を明らかにするために、本株と加硫ゴムの反応物を分析した。その結果、分解産物としてイソプレンオリゴマーが検出されたことから、本株は加硫ゴムのイソプレン鎖を低分子化し代謝することが示唆された。さらに、本株のゲノム解析によりポリイソプレンからイソプレンオリゴマーへの低分子化に必須な *lcp* 遺伝子が特定された。イソプレンオリゴマーの分解経路を特定するため、ゴム代謝時における遺伝子の転写誘導性を網羅的に解析した結果、イソプレンオリゴマーの代謝にはデヒドロゲナーゼによる酸化と $\beta$ 酸化が関与することが示唆された。今後、ゴム代謝に関わると推定された遺伝子の欠損株を解析することで、ゴム代謝経路の明確化と効率的なゴム変換系の構築が実現できると期待される。

## 効率的な物質変換を行う低温菌シンプル触媒の構築に関する研究

田島 誉久（広島大学大学院先端物質科学研究科）

低温菌シンプル酵素触媒とは、物質変換系酵素を宿主（低温菌）代謝系とは異なる温度域で機能させるようにした細胞を構築し、中温の熱処理により異種発現させた中温性酵素のみで効率的な物質変換を行う触媒である。本触媒は酵素を精製することなく、宿主代謝酵素による副産物のカットと基質の膜透過性を向上させることが可能である。そこで本研究ではグリセロールを基質として 1,3-プロパンジオールを生成するシンプル酵素触媒の構築を目的とした。*Klebsiella pneumoniae* 由来の 1,3-プロパンジオール変換酵素 DhaB および DhaT、さらに補酵素 NADH 再生酵素としてギ酸デヒドロゲナーゼを発現し、45°C で熱処理してシンプル酵素触媒を調製した。20 mM グリセロールおよびギ酸を基質として変換を行ったところ、NADH を添加することなく高収率での変換が可能であった。また、宿主である低温菌については、高増殖する培養条件を検討し、菌体収量を 8 倍に、さらに海底泥からの低温菌探索により、*Shewanella* 属細菌よりも比増殖速度が 2 倍の新規低温菌を単離した。

## リグニンからの基幹化合物生産の高効率化に必要なリグニン系フェノール類トランスポーターの解明

政井 英司（長岡技術科学大学大学院工学研究科）

リグニン系フェノール類からの有価物生産において、トランスポーターを付加したバイオプロセスの構築が望まれる。本研究では、*Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン系フェノール類のトランスポーター遺伝子を明らかにし、有価物生産の高効率化を図ることを目的とした。SYK-6 株に存在する 67 個の major facilitator superfamily (MFS) 遺伝子を破壊し、各種フェノール類での生育能を調査した結果、*pcaK* 破壊株でプロトカテク酸 (PCA) 生育能の低下が見られた。*pcaK* 破壊株の解析と異種宿主発現実験から、PcaK は SYK-6 株において PCA の主要な取り込みと、バニリン酸 (VA) の部分的な取り込みを担うことが示唆された。一方、VA の取り込みには *pcaK* を含む複数の遺伝子が関与することが示唆された。また、5,5'-デヒドロジバニリン酸 (DDVA) の取り込みは、MFS に属する新規トランスポーターの DdvK に担われることが示された。*pcaK* 及び *ddvK* の過剰発現株を用いた有用中間体の生産実験から、トランスポーター遺伝子の発現強化は物質生産速度の向上に寄与することが明らかとなった。

## 海底下泥炭層からの未培養リグニン開裂微生物の獲得と構造生物学に基づくスーパー酵素創生による C6-C3 芳香族バイオプラスチックモノマー生産系の開発

秦田 勇二（海洋研究開発機構海洋生命理工学研究開発センター、現 埼玉工業大学工学部）

リグニンは再生可能天然原料の中で最大の芳香族化合物（数種の芳香族モノマーが主に  $\beta$ -O-4 結合で重合した物質）であり、地球温暖化や石油枯渇リスクを背景に、その有効利用技術の開発が求められている。本課題では優れたリグニン特異的変換能微生物を海底下泥炭層から新規に単離することを第一の目的とした。まず、微生物の環境依存的な生物分布に着目し、環境との相関解析を主軸とする統計数理的な手法により、分離条件の確立を試みた。既報  $\alpha$ -proteobacteria 単離株を対象とする Multi dimensional-scaling 解析の結果、リグニン  $\beta$ -O-4 結合を還元開裂する酵素遺伝子群と相同性の高い酵素遺伝子を有する *Sphingomonadaceae* 科株が非常に近い位置にプロットされた。本情報に基づき、対象とする微生物群の生育に好適な塩類濃度 ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ) を設定し、海底下コアサンプルから新規微生物の単離を試みた。一方、既報の  $\beta$ -O-4 結合開裂酵素群の一つである Short chain dehydrogenase-reductase (SDR3) の改良にも取り組んだ。構造予測プログラムにより、SDR3 の構造モデルを構築したところ、Rossmann-fold モチーフを持つことが予測され、さらに基質結合部位も推定できた。

## 代謝改変赤色酵母を用いる未利用バイオマスからのアスタキサンチン・キシリトールの同時発酵生産プロセスの開発

堀内 淳一（京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科）

バイオマスなどの生物学的利用では、バイオマスから得られるグルコース及びキシロースをともに利用し、高付加価値の生産物を得ることが重要である。本申請では、多様な糖資化能を有する赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* を用い、リグノセルロース系バイオマスを原料とし、キシリトールを培養液中に、アスタキサンチンを細胞内に蓄積させ同時生産するバイオプロセスを開発することを目的とした。まずキシロース・グルコースを炭素源とする合成培地を用いた回分培養を行ったところ本酵母によりアスタキサンチンとキシリトールの同時生産が可能ながことが明らかになった。次にバイオマスとしてトウモロコシの穂軸（コーンコブ）を原料として、コーンコブを酸加水分解及び酵素糖化して得られるキシロース・グルコース混合加水分解液を用いたところ、効率的なアスタキサンチンが可能ながことが明らかとなった。一方キシリトールは一時的に生産されるもののその後資化されたが、その原因は加水分解液中に含有される高濃度のミネラル成分によりキシロース代謝が促進されるためであった。更に培養条件を最適化しアスタキサンチン生産を大幅に向上させるとともに、キシリトールの分解抑制について検討した。



**要旨(若手研究者助成)**



## 放線菌における二次代謝遺伝子を指標とした新たな分類基準の構築に関する研究

春成 円十郎 (富山県立大学工学部)

細菌の中でも、*Streptomyces* 属放線菌のように巨大なグループでは、16S rRNA 領域の比較のみでは種を同定できない。本研究では、多種多様な二次代謝産物を生産する生物の場合、進化情報は二次代謝遺伝子にも強く保存されていると推定し、本遺伝子による放線菌の分類が可能であると仮定した。実際に *Salinispora* 属や *Nocardiopsis* 属の放線菌では属や種に特異的な二次代謝遺伝子を有している。これらの事実から、新規骨格化合物の生産菌は新規分類群である可能性が高いと考え、はじめに新規骨格化合物の探索を行い、次に生産菌を同定・分類することを計画した。

特異的な環境を有する小笠原諸島から放線菌を分離し、生産する二次代謝産物を UV スペクトルに基づく物理化学的スクリーニングに供した。194 株の抽出物を解析した結果、7 株に新規化合物生産の可能性が示唆されたが、構造解析の結果はいずれも類縁体もしくは既知化合物であることを強く支持するものであった。以上より、小笠原諸島からの新規骨格化合物の獲得は困難であると判断し、次に遺伝子データベースを用いた二次代謝遺伝子と 16S rRNA の相関解析を試みた。

*memo* 

A series of horizontal dashed lines for writing.



*memo* 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

*memo* 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.