

第 14 回
助 成 研 究 報 告 会

日 時 : 2020年6月5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 山村雄一記念ライフホール



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30年度大型研究助成<口頭発表> (13:10~14:50)

- O-1 絶滅危惧樹木の保全に不可欠な菌根菌の系統分類と菌株コレクションの構築
奈良 一秀 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)
座長：高橋 洋子 (北里大学名誉教授)
- O-2 糸状菌の細胞接着制御による有用物質高生産を目指した新規高密度培養技術の研究開発
阿部 敬悦 (東北大学大学院農学研究科)
座長：大島 敏久 (大阪工業大学客員教授)
- O-3 糸状菌における多糖資化の優先順位決定に関わるシグナル伝達・遺伝子発現制御機構の解明
小林 哲夫 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
座長：大島 敏久 (大阪工業大学客員教授)
- O-4 バイオ合成による環境適合型半導体製造技術基盤の構築：細菌による多様なカルコゲン代謝機構の解明と合理的活用法の検討
池 道彦 (大阪大学大学院工学研究科)
座長：藤田 正憲 (大阪大学名誉教授)

休憩 (14:50~15:10)

平成26年度寄付講座助成<口頭発表> (15:10~15:55)

- O-5 微生物二次代謝産物の物理化学的性質に着目したPhysicochemical screeningによる新規物質の発掘とその実用化研究
中島 琢自 (北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座)
座長：加藤 暢夫 (京都大学名誉教授)

休憩・移動 (16:00~16:10)

平成30年度一般研究助成、平成29年度若手研究者助成* (ポスター発表) (16:10~17:00)

- P-1 緑藻クロレラの細胞内共生による繊毛虫の進化と多様性のメカニズムの解明
児玉 有紀 (島根大学生物資源科学部)
- P-2 かつお節かび付け工程で働く好乾性糸状菌の分類と菌叢解析に関する研究
竹中 慎治 (神戸大学大学院農学研究科)
- P-3 日本産海岸生地衣類の種多様性解明と同定ツールの開発
原田 浩 (千葉県立中央博物館植物学研究科)
- P-4 熱帯アジアで猛威を振るうぶどうサビ病菌の生態学的・分類学的研究
小野 義隆 (茨城大学教育学部)

- P-5 木材腐朽菌の進化仮説を、実験室内で実証する
中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)
- P-6 難分解性物質を利用する昆虫における共生酵母とその機能
土岐和多瑠 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
- P-7 放線菌門に属さない放線菌様系統「クテドノバクテリア」の選択的培養法の確立と分離及び創薬微生物資源としての有効性の検証
矢部 修平 (東北大学大学院農学研究科)
- P-8 シロアリ腸内原生生物に細胞共生する*Desulfovibrio*属細菌の共生進化
桑原 宏和 (東京工業大学生命理工学院)
- P-9 市民科学者とアカデミアの協働体制の構築と博物館が所蔵する学術的レガシーの活用による未記載・未解明大型担子菌類探求の推進
佐久間大輔 (大阪市立自然史博物館学芸課)
- P-10 アーキア界に広がるメチル化合物利用性メタン生成アーキアの分離とその進化・生態
春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)
- P-11 酵母の接合型遺伝子のグローバルな機能とホモタリズムとの相互作用
前川 裕美 (九州大学大学院農学研究院)
- P-12 アーキア膜脂質によるバクテリア膜脂質の置換に基づく大腸菌の細胞膜エンジニアリング
邊見 久 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
- P-13 空気と電気から含窒素有機化合物を製造する革新的発酵プロセスの創出に向けた基盤研究
高妻 篤史 (東京薬科大学生命科学部)
- P-14 微生物が備える可逆的ゲノム改編による環境適応メカニズムの解明
田中 誠司 (高知工科大学環境理工学群)
- P-15 変動環境下における葉面細菌のストレス対処と増殖に関する研究
井口 博之 (京都先端科学大学バイオ環境学部)
- P-16 人工ゲノム再編系による酵母発酵性能の改良
太田 邦史 (東京大学大学院総合文化研究科)
- P-17 グリシン誘導性small RNA GcvBによるサルモネラ増殖抑制機構の解析
宮腰 昌利 (秋田県立大学生物資源科学部、現 筑波大学医学医療系)
- P-18 ゲノムマイニングおよび培養試験から存在が見いだされた新規な亜硝酸還元酵素の正体と機能をつきとめる
押木 守 (長岡工業高等専門学校環境都市工学科、現 北海道大学大学院工学研究院)
- P-19 tRNA依存型ペプチド合成酵素のtRNA基質認識機構の解明と新規ペプチド系抗生物質の創製
丸山千登勢 (福井県立大学生物資源学部)
- P-20 分裂酵母における細胞壁ホメオスタシスの化学遺伝学的解析
西村 慎一 (京都大学大学院薬学研究科、現 東京大学大学院農学生命科学研究科)

- P-21 自然界からは未発見の有用アミノ酸脱水素酵素の酵素工学的創製
櫻庭 春彦 (香川大学農学部)
- P-22 大腸からの粘液分泌を活性化する菌株の同定とその作用機序の解明
～腸内フローラの変動から推察される微生物叢への着目～
東村 泰希 (石川県立大学生物資源環境学部)
- P-23 ミコール酸含有細菌の接触刺激による放線菌二次代謝応答機構の変異ゲノム解析を用いた解明
浅水 俊平 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
- P-24 脂質代謝異常に対する新たな防御応答機構の解明と有用スフィンゴ脂質生産の基盤構築への応用
谷 元洋 (九州大学大学院理学研究院)
- P-25 光による大腸菌組換えタンパク質大量発現系の開発
華岡 光正 (千葉大学大学院園芸学研究科)
- P-26 酸素耐性ビフィズス菌が有する抗酸化機構の解明
山本 裕司 (北里大学獣医学部)
- P-27 海洋性紅色光合成細菌によるバイオポリエステル生産システムの開発
樋口美栄子 (理化学研究所環境資源科学研究センター)
- P-28 鉄腐食性メタン生成菌固定化電極を用いた省エネルギー型二酸化炭素変換技術の開発
若井 暁 (神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、現 海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門)
- P-29 リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産に向けた環境汚染物質分解細菌の利用
渡邊 崇人 (京都大学生存圏研究所)
- P-30 埋立地浸出水処理槽において低濃度・低負荷条件で1,4-ジオキサン分解を担う微生物群集機能の解明
宮田 直幸 (秋田県立大学生物資源科学部)
- P-31 カニ殻堆肥由来の放線菌“*Cellulosimicrobium* sp. NTK2”の遺伝資源と特性を利用した次世代バイオマス“キチン”からの有用物質生産
有馬 二郎 (鳥取大学農学部)
- P-32 光駆動ATP再生ミトコンドリアを用いた光エネルギー利用型酵母の創製とバイオファインケミカル生産への応用
原 清敬 (静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究院)
- P-33 1細胞解析による遺伝子発現ノイズ制御機構の網羅的解明
宮崎 亮 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
- P-34 微生物により生成される高蓄電ミネラルの生成機構解明
二又 裕之 (静岡大学グリーン科学技術研究所)
- P-35 芳香族化合物を特異的に吸着する微生物を用いた活性汚泥の機能向上に関する研究
森 一博 (山梨大学大学院総合研究部)
- P-36 軽油相当の炭化水素を大量生産可能なシアノバクテリアの創出
新井 宗仁 (東京大学大学院総合文化研究科)

P-37 結晶性酸化鉄を還元する新規な微生物の分離培養と代謝メカニズムの解明

青柳 智* (石巻専修大学共創研究センター、現 産業技術総合研究所環境管理研究部門)

懇親会 (17:00～19:00)



要旨(大型研究助成)

絶滅危惧樹木の保全に不可欠な菌根菌の系統分類と 菌株コレクションの構築

奈良 一秀（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

[背景・目的]

樹木の成長や生存には菌根菌という根に共生する菌類が不可欠だが、絶滅危惧樹木と菌根菌の相互作用に関する知見は乏しい。先行研究において、絶滅危惧種に指定されているトガサワラとヤクタネゴヨウの菌根菌を調べたところ、いずれもその樹種にしか共生しない新種の菌根菌が発見され、それぞれトガサワラショウロ、ヤクタネショウロとして記載されている。これらの菌根菌は埋土胞子として最も優占していたことから、絶滅危惧樹木実生の定着や森林の更新に中心的な役割を担っていると考えられる。また、これらの菌根菌は宿主である絶滅危惧樹木の存在する場所にしか生息していないため、発見された菌根菌自体も絶滅の危機にあることが強く示唆される。そこで本研究では、トガサワラショウロとヤクタネショウロの菌株を網羅的に分離収集し、カルチャーコレクションとして整備することを目的とする。また、対象菌種の集団遺伝的な系統の特徴についても明らかにする。

[方 法]

対象菌種の子実体採取は極めて困難であることから、埋土胞子からの菌株分離を試みた。トガサワラとヤクタネゴヨウの主要な自生地の手元から土壌サンプルを採取し、各樹種および近縁な樹木の苗を用いた埋土胞子の釣上げ試験（バイオアッセイ）を行い、菌根を形成させた。バイオアッセイ苗に形成された菌根を採取、表面殺菌し、抗生物質を添加した MMN 培地を用いて菌株の分離を試みた。バイオアッセイ苗の菌根および分離菌株から DNA を抽出し、ITS 領域のシーケンスによる菌種の同定および SSR マーカーによる系統遺伝解析を行った。

[結果・考察]

トガサワラショウロ、ヤクタネショウロの多数の菌株単離に成功し、その一部はカルチャーコレクション（NBRC）に寄託した。埋土胞子からの菌根菌株収集、絶滅危惧菌種を保全するためのカルチャーコレクション利用は、ともに新しい試みであり、今後の発展が期待できる。SSR 解析の結果、両菌種とも集団間の遺伝的交流がほとんどなく、宿主樹木以上に遺伝的分化が進行していることが判明した。これは近交弱勢によって絶滅するリスクが宿主以上に高いことを意味しており、希少な森林生態系を保全する上で重要な知見である。

糸状菌の細胞接着制御による有用物質高生産を目指した 新規高密度培養技術の開発

阿部 敬悦（東北大学大学院農学研究科）

[背景・目的]

糸状菌は液体培養によるタンパク質・化成品の工業生産に利用される。糸状菌の大量培養では、細胞が糸状に生育した菌糸が絡まり合い塊を形成することで、高密度培養が達成できず、生産性の限定要因となってきた。我々はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において細胞壁多糖 α -1,3-glucan (AG) が、産業用糸状菌（麹菌）では AG と galactosaminogalactan (GAG) が菌糸接着因子であることを見出した。すなわち、麹菌野生株が菌糸塊を形成するのに対し、AG と GAG の二重欠損株（AG-GAG 欠損株）では菌糸が均一分散し、菌体量が増加して高密度培養に適することを発見した。本研究では AG と GAG による菌糸接着機構の解析及び、麹菌 AG-GAG 欠損株の応用を見据えた酵素生産性の評価を目的とした。

[方法]

A. nidulans の 2 種の AG 合成酵素遺伝子高発現株の AG 分子量を GPC で決定し、その菌糸細胞表層の AG の分布を蛍光染色で解析した。さらに麹菌精製 GAG と AG-GAG 株の菌糸を用いて *in vitro* で GAG による菌糸接着能を解析した。また麹菌の野生株、AG 欠損株及び AG-GAG 欠損株を 5L リアクターで 600 rpm, 60 時間培養し、生育菌体量及び培養上清に分泌された組換えモデル酵素（CutL1）量を定量すると共に、培養槽内の数値流体解析を行った。

[結果・考察]

A. nidulans の *agsA* と *agsB* の単独高発現株の AG の分子量は、夫々 140 万、40 万で、AgsA の AG は細胞壁内層に AgsB の AG は外層に分布し、主に外層に分布する AG が菌糸接着に寄与すると予想された。麹菌培養液より精製した GAG を AG-GAG 欠損株菌糸に添加して菌糸凝集の再現に成功した。GAG の galactosamine (GalN) をアセチル化すると菌糸凝集能が低下し、GalN のアミノ基が水素結合を介して菌糸凝集に寄与することが示唆された。5L リアクターを用いて、野生株、AG 欠損株、AG-GAG 欠損株間でモデル酵素 CutL1 の生産量を比較した結果、AG-GAG 欠損株の生産量が顕著に高かった。培養液の流体特性を解析したところ、AG-GAG 欠損株は野生株と比較して培養液の非ニュートン性が低下し、野生株では培養槽の外側と回転翼の近傍との間でスリップが起り培養槽全体が攪拌されないが、AG-GAG 欠損株では槽内全体が攪拌されることが示唆された。本報告では菌糸接着特性と培養特性について考察する。

糸状菌における多糖資化の優先順位決定に関わる シグナル伝達・遺伝子発現制御機構の解明

小林 哲夫 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

[背景・目的]

糸状菌は多様な植物性多糖分解酵素遺伝子を有している。これら遺伝子の発現は基質により誘導され、易資化性糖質が共存するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) により抑制される。*Aspergillus* 属糸状菌では CCR は転写抑制因子 CreA により制御されるため、本因子の活性制御に関わる研究が行われてきた。一方、我々は三量体 G タンパク質の α サブユニット (GanB) やプロテインキナーゼ A (PkaA) という cAMP シグナリング構成因子が CreA とは独立してセルラーゼの CCR に関わることを見出した。本研究ではこの新機構について詳細に解析し、多糖資化の優先順位決定についてのさらなる理解を目指した。

[方 法]

モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、*creA*、*pkaA*、*ganB* の破壊が与える CCR への影響を、酵素生産と転写のレベルで比較検討した。また、他生物での情報を参考として cAMP シグナリングに関連すると考えられる遺伝子の破壊を行い、新奇 CCR 関連因子の同定を目指した。

[結果・考察]

セルラーゼでは、分化を伴うプレート培養における CCR は主として GanB/PkaA が担っており CreA の関与は微弱であった。液体培養では、CreA と PkaA の部分的かつ相加的関与が認められた。また、GanB 遺伝子破壊の影響は下流の PkaA 破壊を上回っていたため、GanB からのシグナルは PkaA 以外にも流れると思われる。一方、アミラーゼでは培養条件にかかわらず CreA が主であり、キシラナーゼとマンナーゼではこれらの中間的な結果となった。したがって、酵素の種類や培養条件により各因子の関与の程度が異なり、これにより資化の優先順位が決定されると示唆される。CCR に関与する新奇因子の探索では、PkaA 下流因子候補として出芽酵母 Sfl1 の類似因子 SflA を同定した。SflA は転写因子と考えられるため本因子の制御化遺伝子の同定が今後の課題である。また、cAMP シグナリングとは別であるが、CCR に関わる脱ユビキチン化酵素 CreB と相互作用すると考えられる新奇 CCR 関連因子も同定した。CreB も CreA や PkaA/GanB と独立して CCR に関わるため、3 種の経路が複雑に絡み合って多糖資化の順位を決定づけていると考えられる。

バイオ合成による環境適合型半導体製造技術基盤の構築： 細菌による多様なカルコゲン代謝機構の解明と合理的活用法の検討

池 道彦（大阪大学大学院工学研究科）

[背景・目的]

化合物半導体合成に係る環境負荷を大幅に低減し、グリーン化する手段として、微生物の持つ金属類代謝作用を利用するバイオ合成が提案されているが、現状では十分に確立された技術とはいえない。本研究では、細菌によるカルコゲン元素（S、Se、Te 等）の多様な代謝を検索し、それらを利用したカルコゲン系半導体（ChSC：Chalcogenide Semi-Conductors）バイオ合成の可能性を探ることを目的とした。

[方法]

ハンドリングの容易さを考慮し、好気培養においても S、Se、Te の酸化物イオンの還元能を示す多様な細菌株を取得し、 Cd^{2+} などを添加した培養によって ChSC 合成ポテンシャルを調べた。また、有望な ChSC 合成細菌株として Se 代謝に優れた *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を対象として、Se 化合物合成メカニズムの解明を試みた。

[結果・考察]

取得した一連のカルコゲン代謝細菌株によって、 CdS 、 CuS 、 ZnS 、 CdSe 、 $\text{CdS}_x\text{Se}_{(1-x)}$ 、 Bi_2Se_3 、 $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ などの S / Se 化合物半導体ナノ粒子がバイオ合成され得ることが明らかとなった。一方、Te 化合物半導体については明確な合成を確認することはできず、バイオ合成が困難であることが示された。また、Se に対して極めて多様な代謝能を有する *P. stutzeri* NT-I 株を用いた検討により、Se 化合物半導体の合成はその高い Se 揮発化能（ $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ などの Se メチル化物の生成）と関連付けられることが示された。NT-I 株は Se の揮発化反応における中間体として、メタンセレノール（ CH_3SeH ）やセレノシステインなどの含セレノール化合物を生じ、これらが Cd^{2+} や Bi^{3+} と反応することで CdSe や Bi_2Se_3 を合成しているものと推測された。



要旨(寄付講座助成)

微生物二次代謝産物の物理化学的性質に着目した Physicochemical Screeningによる新規物質の発掘とその実用化研究

中島 琢自 (北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座)

[背景・目的]

微生物はこれまで人知の及ばない構造を有する化合物を提供し、抗生物質などに応用されてきた。微生物培養液から物質探索のため、従来から生物活性を指標に目的とする活性物質を篩にかける方法が用いられてきた。しかし、目的以外の化合物は、有用な二次代謝産物であっても見逃されている可能性がある。一方、近年の分析機器や技術の発展により多くの化合物が検出可能となった。そこで、演者らは微生物培養液抽出物に含まれる化合物の分子量、分子組成、紫外線吸収や極性などを網羅的に解析し、新規性が予測された化合物を取得後に生物活性を見出す physicochemical (PC) screening^{1,2)} を構築し、探索研究を行った。

[結果・考察]

1. 主成分分析を用いた新規物質の探索

北里生命科学研究所が保有する放線菌 344 株を 4 培地で培養し、その抽出物 1,376 サンプルを LC/MS で分析した。その分析データを主成分分析ソフト MakerView で解析し、1 サンプルのみに生産されている化合物を探索した。その結果、新規物質 nanaomycin H³⁾ (Fig. 1) や放線菌の代謝産物では初の報告となるイミニウム化合物 iminimycin⁴⁾ (Fig. 2) が見出された。また、nanaomycin K は上皮間葉転換が誘導された細胞に対し、特異的に細胞増殖抑制活性を示し、*in vivo* で抗腫瘍活性を示した。これら培養液には nanaomycin A や cycloheximide など強力な生物活性を示す既知化合物が含まれており、培養液を用いた生物活性評価では、これら新規物質を発見することは困難であると考えられる。

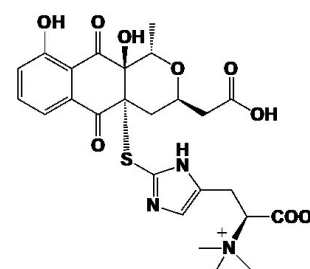


Fig. 1 Nanaomycin K

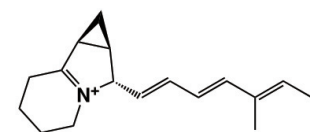


Fig. 2 Iminimycin

2. ヘテロ原子を含む新規物質

KEGG MEDICUS (http://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/kegg_medicus_drug) は日本および米国の医薬品添付文書をもとに 10,484 の医薬品が登録されている。そのうち、7,207 化合物 (69%) が窒素、2,430 化合物 (23%) が硫黄を含んでいる。このようにヘテロ元素を含む化合物は構造的に多様性を生み出し、医薬品として利用されている化合物も多い。窒素または硫黄を含む化合物のスクリーニング系を構築し、新規物質の探索を行った。含窒素化合物は主成分分析と窒素が奇数個含まれる化合物は奇数の分子

量を示すという窒素ルールを用いて探索した。含硫黄化合物は MoS-screening⁴⁾ (モリブデン酸化) により探索した。

Trichothioneic acid⁵⁾ (Fig. 3) : *Trichoderma virens* FKI-7573 株の培養物抽出液より見出された。分子式 $C_{24}H_{36}N_3O_7S^+$ を示し、部分構造にエルゴチオネインを有する新規含窒素化合物であった。絶対立体配置は円二色性スペクトルとマرفイー法の組み合わせで決定した。抗酸化活性が認められた。

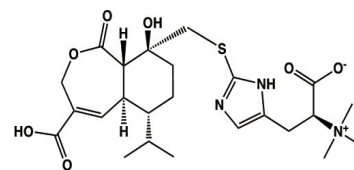


Fig. 3 Trichothioneic acid

Thioporiol (Fig. 4) : *Trichoderma polypori* FKI-7382 株の培養物抽出液より見出された。部分構造に *N*-アセチルシステインを有する新規含硫黄化合物であった。MPA (α -methoxy- α -phenylacetic acid) 修飾によりジエステル体を取得後、NMR を用いて相対立体配置を決定した。

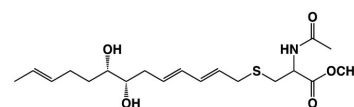


Fig. 4 Thioporiol

簡便かつ迅速に窒素や硫黄を含む化合物の探索方法が構築できた。微生物代謝産物にはヘテロ原子を含む多くの化合物が取り残されていることがわかった。

3. 新規分離剤、生体成分分子修飾シリカを用いた新規物質の探索

エルゴステロールは真菌の細胞膜成分で、膜の流動性に関与し、抗真菌剤アンホテリシン B の標的分子である。エルゴステロールをシリカのシラノール基に修飾した ES シリカを作製した。この新しい吸着剤を用いて放線菌培養液抽出物より新規物質を探索した。840 の放線菌培養液抽出物より、LC/MS を用いて既知物質 93 化合物を同定、推定新規物質 27 化合物を見出した。*Amycolatopsis* sp. K16-0194 株の培養液から dipyrimicin 類、*Streptomyces* sp. K16-0477 株の培養液から dietziamide C が新規物質として見出された。ES シリカは窒素を含む化合物と結合しやすいことが示唆された。

強力な生物活性を示す既知化合物が微生物培養液に含まれている場合や生産量が低い化合物の場合、いかに有用化合物であっても見逃してきた。PC screening は化合物の物理化学的性状を指標に、高感度な分析機器を用いるため、より多くの化合物を対象に新規物質の探索研究が行える。本方法により、微生物培養液から新規物質 30 化合物 (類縁体を含めると 80 化合物) を見出すことができた。

1) Takahashi Y, Nakashima T. *Antibiotics*, **7**, pii: E45 (2018), 2) Nakashima T, Takahashi Y, Ōmura S. *Biochem Pharmacol.* **134**, 42-55 (2017), 3) Nakashima T, *et al.*, *J Biosci Bioeng.* **123**, 765-770 (2017), 4) Matsuo H, *et al.*, *Molecules*, pii: E240 (2020), 5) Miyano R, *et al.*, *J Biosci Bioeng.* **129**, 508-513 (2020)



要旨(一般研究助成)

緑藻クロレラの細胞内共生による繊毛虫の進化と多様性のメカニズムの解明

兎玉 有紀 (島根大学生物資源科学部)

ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ、真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていない。この謎を解明するためのモデル生物が繊毛虫のミドリゾウリムシと共生クロレラである。クロレラは宿主ミトコンドリアと共生胞膜との接着によって宿主細胞表層直下に固定されている。共生の成立や維持における宿主ミトコンドリアの機能を調べるために、抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を作製した。その抗体を使用して、クロレラ除去株と保持株の抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。その結果、保持株と比較して除去株のミトコンドリア数が多いことが分かった。共生藻を持つ宿主は光合成による酸化ストレスを受ける。共生藻を持つ複数種の宿主において、活性酸素種の発生源となる宿主ミトコンドリアの機能の低下と、抗酸化酵素遺伝子の発現の上昇が報告されている。一方ミドリゾウリムシにおいてはクロレラ除去株で抗酸化酵素遺伝子が高発現し、その理由は不明であったが、ミトコンドリア数の減少が酸化ストレスを軽減している可能性が示唆された。

かつお節かび付け工程で働く好乾性糸状菌の分類と菌叢解析に関する研究

竹中 慎治 (神戸大学大学院農学研究科)

鰹節は、鰹肉を煮熟・焙乾した荒節とさらにかび付け発酵・熟成工程を経た枯節に分けられる。同工程では、好乾性 *Aspergillus* 属糸状菌が、脂肪の分解、香味の付与、色相の変化に関わるが、節の成分変化に伴ってどのような種が働くかその詳細は明らかではない。本研究では、サンプル調製および菌叢解析法の検討とかび付けにおける優占種の解明を目的とした。まず、枯節から *A. amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. pseudoglaucus*, *A. ruber*, *A. sydowii* の5種を分離・同定し、基準株とした。次に、混合培養・ゲノム DNA 調製法を検討後、BenA 遺伝子の増幅と DGGE で菌叢解析した。「同じ製造元から入手した1番から4番枯節」について優占種の推移を調べた結果、*A. pseudoglaucus* および *A. chevalieri* が優占種であり、かび付け発酵が進むとともにこれらの構成比が徐々に変わることがわかった。また、「製造元が異なる4番枯節」については、上述の2種の他に *A. amstelodami*, *A. ruber*, *A. sydowii* も優占種となっていた。

日本産海岸生地衣類の種多様性解明と同定ツールの開発

原田 浩 (千葉県立中央博物館植物学研究科)

ほとんどの生物にとって過酷な環境となる、岩石海岸の潮間帯から飛沫帯にかけては、地衣類が卓越し時に明瞭な分布帯を形成することから、生態学をはじめとする様々な分野において研究対象として期待されるが、国内での研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では、その基礎となる種多様性解明を進めるとともに、分類学者以外にも利用可能とするための、図鑑・化学成分データベース・DNA データベースの3つの同定ツールの構築を目指した。長崎県周辺・千葉県・秋田県周辺を3重点地区として、野外調査を行い採集した標本について形態、化学成分、DNA (ITS 領域) を検査し、同定と分類学的検討を進めた結果、16科31属51種を同定し、この他未同定種として10種以上を認めた。同定された51種について図(写真)と記載をそろえ、群ごとに図鑑として誌上で公表するとともに、ウェブ図鑑の公開準備を進めた。未同定種についても同様に進めている。DNA バーコーディングを目的として、約半数の24種のITS領域を取得し、データベース公開の準備を進めた。化学成分(HPLC/MS等)は、ダイダイゴケ科等について解析を概ね完了し、残る群についてもまもなく完了する予定である。

熱帯アジアで猛威を振るうぶどうサビ病菌の生態学的・分類学的研究

小野 義隆 (茨城大学教育学部)

広く東南アジアとオーストラレーシアに分布する栽培ぶどうサビ病 (GLR) 菌の分類と命名は確定していなかった。タイとベトナムからの新たなサンプルを含め、形態的特徴及びITS2とLSUrRNA(D1/D2)の配列を用いた分子系統の再解析の結果、従来指摘されていたように、このGLR菌が*Neophysopella*属の新種であることを確認した。GLR菌の野生宿主は未知であったが、接種試験でGLR菌のブドウ科*Ampelocissus*属植物への感染を確認していたため、*Ampelocissus*属を中心にブドウ科植物をタイで調査した。その結果、*A. araneosa*に夏・冬胞子世代を形成するサビキンを見出したが、本菌はGLR菌とは異なる新種であることが明らかになった。一方、GLR菌の異種寄生宿主となりえるアワブキ (*Meliosma*) 属植物についてもタイ各地で調査した。その結果、*M. simplicifolia*と*M. arnottiana*にさび胞子世代を形成するサビキンを見出した。分子系統解析により、それぞれがGLR菌ではなく、*Neophysopella*属の別種であることが明らかになった。

木材腐朽菌の進化仮説を、実験室内で実証する

中沢 威人 (京都大学大学院農学研究科)

近年旺盛に行われた木材腐朽菌（担子菌の一部）の比較ゲノミクス解析の結果、木材分解機構の進化および多様性に関する興味深い仮説が多数立てられた。このことを踏まえて本研究では、その中の進化仮説の一部を実験室内で再現および実証することを目的として行った。具体的には、タマチョレイタケ目において、白色腐朽菌から褐色腐朽菌へと進化したことについて実証することを行った。そのために、褐色腐朽菌に近いと考えられる選択的的白色腐朽菌（木材中の多糖をほとんど分解せず、リグニンを選択的に分解する腐朽菌）*Ceriporiopsis subvermispora* において、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集系を確立し、遺伝子組換えの基盤技術を構築した。この手法を用いることで、木材腐朽菌のゲノム上に多コピー存在する木質分解系酵素遺伝子群の大規模改変を行う上で必須となる多重遺伝子変異導入が可能であること、ならびに本手法を用いて作成したゲノム編集株（遺伝子変異株）と親株との間で、木質分解能の比較解析が可能であることを確認した。今後は、本研究で確立した遺伝子組換え系を用いて、実際に *C. subvermispora* から褐色腐朽菌への進化の実証を行う予定である。

難分解性物質を利用する昆虫における共生酵母とその機能

土岐 和多瑠 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

地球上で最も多様化した生物とされる昆虫は、様々な環境へ進出するばかりでなく、普通の動物では利用困難な餌資源を利用するものまで知られる。これらの昆虫は、微生物と共生関係を結ぶことでそのような餌資源を利用できるようになったことがわかりつつある。特に顕著な多様化を遂げた甲虫では、多くの種類で消化管などから酵母が見出されている。本研究は、昆虫による難分解性物質の利用において、共生酵母が果たす役割を解明するため、タケの空洞内で酵母を育てて食べるコメツキモドキと枯死木の材内で酵母を育てて食べるツツシンクイムシを対象に調査を行った。コメツキモドキについては、利用するタケの糖分析を行い、次いで、検出された各糖について、共生酵母が資化可能かどうかを培養実験によって調べた。ツツシンクイムシについては、樹木の材中に含まれる糖類について同様に資化性試験を行った。その結果、難分解性のキシランやキシロースに対して資化性を示す場合が多く、材の消化を助ける役割があることが示唆された。一方で、一部の酵母ではそれらに対して資化性を示さず、栄養摂取以外の機能を持つ可能性、便乗性あるいは寄生性の可能性が考えられた。

放線菌門に属さない放線菌様系統「クテドノバクテリア」の 選択的培養法の確立と分離及び創薬微生物資源としての有効性の検証

矢部 修平（東北大学大学院農学研究科）

クテドノバクテリア（綱）は放射状の菌糸に孢子を着生させ、種々の抗菌活性を示すなど第二の放線菌と称し得る形態分化と性質を持つユニークな分類群であるが、培養株が少ない未開拓遺伝資源である。本研究では、分離培養法を改良しながら本系統を拡充し、有益な遺伝資源と成り得るかを検証した。

国内の火山地帯の堆積物や土壌及び「食べられる土」として知られる微生物塊「天狗の麦飯」から 19 株のクテドノバクテリア綱に属する菌種の分離に成功した。それらの分類学的性質を解明し、1 新科、1 新属、6 新種を提唱した。さらに一部の菌種は孢子嚢を形成することを見出した。孢子嚢を形成する細菌系統の存在が明らかとなったのは、放線菌、粘液細菌に次いで 3 例目である。これら分離株のゲノム中には二次代謝物生合成遺伝子群が最大で 22 個と放線菌に匹敵するほど多く、それらのほとんどは新規であることが示唆された。分離株はグラム陽性菌から陰性菌まで幅広く抗菌活性を示し、その培養物から新規と推定されるアントラキノン化合物を見出した。以上、本研究により、本系統を拡充することに成功し、その生合成ポテンシャルの高さを証明するに至った。

シロアリ腸内原生生物に細胞共生する *Desulfovibrio* 属細菌の共生進化

桑原 宏和（東京工業大学生命理工学院）

シロアリ腸内には、微生物間、特に原核生物と真核生物（原生生物）間での多様な共生関係が存在しており、細胞共生研究の格好のモデルとなっている。本研究では、その中で *Desulfovibrio* 属細菌と *Trichonympha* 属原生生物の細胞共生に着目し、同原生生物にほぼ細胞内共生している *Desulfovibrio* 属細菌で近年ゲノムが解読されている Rs-N31 と、未だ完全に細胞体が露出した状態で原生生物細胞表面に付着共生する同属細菌 ZnDsv-02 の比較ゲノム解析を行った。ネバダオオシロアリの腸内に共生する *Trichonympha collaris* 1 細胞を物理的に単離しマイクロメスで解剖し、目的の細菌を含む細胞前部を回収後、全ゲノム増幅を行い、ZnDsv-02 のゲノムシーケンスを行った。その結果、ZnDsv-02 のほぼ完全長のゲノムの取得に成功した。ZnDsv-02 のゲノムサイズは 1.6 Mb であり、Rs-N31 の 1.4 Mb よりやや大きいが、近縁の自由生活型 (2.9 Mbp) と比べ大幅に縮小していることが明らかとなった。ZnDsv-02 は、Rs-N31 と異なり、乳酸利用経路、細胞接着、ファージに対する防疫システムに関わる遺伝子などを保持していたが、ZnDsv-02 と Rs-N31 の遺伝子欠失のパターンはよく似ていた。本研究により、細胞表面細菌であってもゲノム縮小進化が起こっていることが明らかとなった。

市民科学者とアカデミアの協働体制の構築と博物館が所蔵する 学術的レガシーの活用による未記載・未解明大型担子菌類探求の推進

佐久間 大輔 (大阪市立自然史博物館学芸課)

菌類研究の進展には、フィールドワークや新規の分析とともに、これまでの研究により蓄積された資料の再吟味が重要である。全国には 1,000 点以上の菌類標本を保管する標本庫が 11 大学(小計 20 万点)、2 国立研究機関(小計 24 万点)、14 の地方公立(財団を含む)研究機関(小計 12 万点) に存在する。将来の研究資源としてもこれら全体を保全し、活用と充実をはかる必要がある。本研究ではこれら将来の研究資料となる過去の標本及び描画、顕微鏡記録など「学術的レガシー」の活用をすすめるために資料研究を行った。1. 青木実資料のうち、外見的特徴を的確に表すもののみ公表であった写真資料群の発見と整理、検証、2. 図鑑著者であった上田俊穂氏の関連資料の公開に向けた準備 3. 豊嶋弘図譜などこれまで未公表であった資料の発掘 4. 本郷次雄氏の初期研究資料群の発見などの成果を上げた。また、菌類研究に取り組む市民科学者の裾野を拡大するために 5. 関西菌類談話会や大阪市立自然史博物館と連携した菌類教育の展開、6. 菌類研究の手引となる一般書の刊行、7. 切片観察、DNA シーケンス、参考資料提供など市民科学者の観察力を引き上げる環境構築それぞれに成果を上げることができた。

アーキア界に広がるメチル化合物利用性メタン生成アーキアの分離と その進化・生態

春田 伸 (東京都立大学大学院理学研究科)

Thermoplamata 綱メタン生成アーキアはメチル化合物利用性の新しいメタン菌グループである。本研究では、高温環境に注目し、*Thermoplamata* メタン菌の生態、多様性および代謝生理を明らかにすることを目的とした。高温嫌気消化汚泥から取得した *Thermoplamata* メタン菌についてゲノム情報を取得し解析したところ、そのゲノムサイズは 1.1Mb と既報の *Thermoplamata* メタン菌のなかでも最小であり、いくつかの代謝経路に欠失があると考えられた。また、日本各地の陸上温泉から温泉水が噴出する高温土壌を採取し、16S rRNA 遺伝子、メタン生成の鍵酵素遺伝子 *mcrA*、メチル化合物代謝を担う酵素遺伝子 *mtaBC* を対象とする PCR アンプリコン解析を行った結果、弱アルカリ性の高温土壌から広く *Thermoplamata* メタン菌が検出された。宮城県鬼首温泉郷からは、新属新種を含む複数系統の *Thermoplamata* メタン菌の存在が示唆された。メタノールを炭素源としてこれらメチル化合物利用性メタン菌の分離を試みたところ、新規好熱性 *Thermoplamata* メタン菌の培養に成功した。

酵母の接合型遺伝子のグローバルな機能とホモタリズムとの相互作用

前川 裕美 (九州大学大学院農学研究院)

真菌の接合型の違いは性的適合性にあると考えられるが、接合型遺伝子は接合に関わる遺伝子だけでなく、広範な遺伝子発現に関わることが報告されている。メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* の接合胞子は一方の細胞体に偏っており、接合過程における2つの接合型細胞の振る舞いに違いがあると考えられる。本研究では、*O. polymorpha* の‘性差’を明らかにすることを目的とし、接合型によって発現量に差がある遺伝子群の同定を行なった。ホモタリックな実験室株から接合型変換能を喪失させた人工的ヘテロタリック a 型株および alpha 型株と、*MATa* と *MATalpha* を共発現する擬似二倍体細胞を作製し、栄養条件と飢餓条件での RNA 発現解析を行なった。飢餓条件での発現量が a 型と alpha 型で4倍以上の差がある遺伝子として19遺伝子を同定したが、それらのほとんどは *S. cerevisiae* 相同遺伝子がない、または接合への関与が知られていない遺伝子であった。また、栄養条件では全遺伝子の約4%に当たる191遺伝子が2倍以上の差を示しており、様々な細胞機能に関与する遺伝子が接合型の影響を受けていることが明らかになった。

アーキア膜脂質によるバクテリア膜脂質の置換に基づく大腸菌の細胞膜エンジニアリング

邊見 久 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

アーキアは極限環境に生育する菌を数多く含む分類群である。その膜脂質は還元されたイソプレノイドアルコールを炭化水素鎖とする特徴的な構造を有し、脂肪酸を側鎖とする他生物の膜脂質に比べて透過性の低い膜を構成する。本研究では、生合成遺伝子の導入により大腸菌にアーキア膜脂質を大量生産させ、内在の膜脂質を一部置換することで、「強い」細胞膜を有する大腸菌株の作製を目指した。一般的なアーキア膜脂質の少量生産にはすでに成功していたが、これに加えて、超好熱性アーキアに特異的な長い炭化水素鎖を有する膜脂質の生合成遺伝子を特定し、大腸菌における生産系を構築した。また、アーキア膜脂質の生産量を向上させるため、大腸菌に元来存在しないイソプレノイド生合成前駆体供給経路であるメバロン酸経路を導入した。その際、ゲノム編集による導入も試みたが、プラスミドによる導入の方が効果的であった。さらに、イソプレノイド鎖の還元に必要なとされる嫌気培養条件で効率が大きく低下するという、メバロン酸経路の弱点を克服し得る ATP 低消費型の変形メバロン酸経路をアーキアから発見した。現在同経路を使ったアーキア膜脂質の生産向上に取り組んでいる。

空気と電気から含窒素有機化合物を製造する 革新的発酵プロセスの創出に向けた基盤研究

高妻 篤史（東京薬科大学生命科学部）

本研究では、大気成分（CO₂ と N₂）と電気エネルギーから含窒素有機物を生産する発酵プロセスを創出するための技術基盤を確立することを目的とした。具体的には、電気エネルギーを利用して炭酸固定と窒素固定が可能な細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* のニトロゲナーゼ活性を増強するとともに、本細菌に適用可能なゲノム編集技術を確立した。

ニトロゲナーゼ活性は厳密な制御を受けるため、含窒素化合物の生産にはその制御系の改変が必要となる。本研究ではニトロゲナーゼ遺伝子の転写活性化因子である NifA に着目し、本因子の過剰発現株（*nifA*-OE 株）が野生株よりも高いニトロゲナーゼ活性を示すとともに、電気培養時に細胞外にアンモニウムイオンを分泌することを明らかにした。また、*A. ferrooxidans* では効率的な遺伝子改変法が確立されていなかったが、本研究では本細菌が保持可能なプラスミドベクター（pBBR1MCS-2）をベースとしたゲノム編集技術を開発した。今後はこれらの知見を元に、アミノ酸等の含窒素有機物を生産可能な遺伝子改変株の構築を行う予定である。

微生物が備える可逆的ゲノム改編による環境適応メカニズムの解明

田中 誠司（高知工科大学環境理工学群）

多くの微生物は単細胞で、個々の細胞が直接外的環境にさらされているため、環境変化に即座に対応・適応するためのプログラムを備える。その実体は、ほとんどの場合、遺伝子発現の変化であるが、それに加えて、ゲノム情報をも改編する例も知られている。このようなゲノム改編による環境適応戦略は、ゲノム不安定化のリスクを伴う可能性があるが、実際には部分的な改編のみでゲノム全体を不安定化させることは無く、その分子機構に興味を持たれる。そこで、出芽酵母の銅イオン耐性付与遺伝子 *CUP1* をモデル領域として、ゲノム改編を伴う環境適応戦略を支える分子メカニズムの解明を目指した。*CUP1* 遺伝子をそれぞれ 0, 1, 2 コピー持つモデル細胞を作製し、銅イオン添加後のゲノム改変を調べたところ、ゲノム改変には 2 コピー以上の遺伝子が必要で、この領域特異的に起きる相同組み換えを用いること、転写で生じる R-ループと複製フォークの衝突がそのきっかけとなっていることが示唆された。このような、転写誘導に依存した遺伝子コピー数の増加は、その遺伝子産物の必要量に応じて、段階的な発現レベルの上昇を可能とするメカニズムであると考えられる。

変動環境下における葉面細菌のストレス対処と増殖に関する研究

井口 博之（京都先端科学大学バイオ環境学部）

自然環境中では気候変動により温度・光量・水分量などが絶えず変化しており、植物葉など特に表層に生息する微生物はその環境変化を即座に直接的に受けると考えられる。しかし、繰り返しの環境変動の下でストレス防御や細胞修復に追われる中、微生物はいかに増殖しているのか不明である。そこで本研究では、主要な葉上微生物である *Methylobacterium* 属細菌（使用株は *M. extorquens* AM1）の温度変動下における生育と変動環境への適応機構について調べた。本属基準株の多くが生育できない 37℃と、生育可能な 30℃の間で変動する培養条件を設定した。まず、ある時間以上 37℃にさらすと死にゆくこと、37℃では細胞が異常に長く伸張し 30℃に移すと回復することが分かった。続いてマイクロアレイ解析を行い、37℃環境での熱耐性や 30℃シフトでの回復に寄与する遺伝子を探索した。DNA 合成・シャペロン・メタノール代謝の遺伝子などに加えて制御遺伝子が抽出された。また 30℃に比べて 37℃では 1 割程度の遺伝子の発現量が半分以下に減少し、数 % の遺伝子の発現量が 2 倍以上に上昇していた。制御遺伝子の破壊株の解析結果より、当該制御遺伝子が転写制御を通して温度変動環境での生育に寄与していることが示唆された。

人工ゲノム再編系による酵母発酵性能の改良

太田 邦史（東京大学大学院総合文化研究科）

育種には、さまざまなゲノム再編成や新しい遺伝情報のシャッフルが可能な「交配」が有効である。しかし、醸造酵母の多くが孢子形成能を失っているためこの方法は利用できない。この問題を克服して醸造に適した形質を持つ醸造酵母株を新たに取得することを目的として、本研究では、申請者らが確立した人工ゲノム再編成システム「TAQing システム」(Muramoto ら 2018, *Nature Commun.*) を醸造酵母に適用することを試みた。

TAQing システムでは、高度高熱菌由来制限酵素 Taq I を細胞内に導入し、一過的に加温することで、ゲノム中に多数の DNA 切断を誘発し、転座や変異、ヘテロ接合性喪失などのゲノム再編成を誘発する。本研究では、熱耐性など TAQing システムを適用するために重要な醸造酵母の性質を調べるとともに、精製した Taq I タンパク質を醸造酵母に導入する方法を確立した。また、パルスフィールド電気泳動によりゲノム DNA の再編成を検出できる条件を見出した。現在、これらをもとに醸造酵母に TAQing システムを適用し、得られた細胞株でゲノム再編成が起こっているかどうかを調べている。今後は、TAQing システムによって得られた新規醸造酵母について、ゲノム再編成の有無や醸造特性の変化を調べる。興味深い株については、ゲノム配列解析等を用いてより深く解析する。

グリシン誘導性 small RNA GcvB によるサルモネラ増殖抑制機構の解析

宮腰 昌利 (秋田県立大学生物資源科学部、現 筑波大学医学医療系)

グリシンによって誘導される約 200 塩基の small RNA GcvB は、大腸菌やサルモネラをはじめとする腸内細菌科細菌で保存されており、主にアミノ酸代謝に関与する複数の mRNA を転写後レベルで制御する。GcvB の細胞内存在量は新生転写速度と分解速度によって決定される。GcvB の転写はグリシンによって誘導される一方、分解速度はグルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーター mRNA から生成する small RNA SroC に依存する。

GcvB の過剰発現によってサルモネラと大腸菌の生育阻害が観察された。0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で培養した場合には、サルモネラは大腸菌よりも顕著な遅滞期の延長が見られ、*sroC* 破壊株ではより顕著な遅延を引き起こした。このことから、サルモネラの GcvB レギュロンは大腸菌とは異なり、生育に必須の経路をより強く阻害することが示唆された。その要因の一つとして、GcvB は大腸菌の二成分制御系因子をコードする *phoP* mRNA と塩基対を形成して発現を抑制する一方で、サルモネラの *phoP* は GcvB と塩基対形成せず制御されないことを明らかにした。

ゲノムマイニングおよび培養試験から存在が見いだされた 新規な亜硝酸還元酵素の正体と機能をつきとめる

押木 守 (長岡工業高等専門学校環境都市工学科、現 北海道大学大学院工学研究院)

本研究では嫌気性アンモニウム酸化 (anammox) 細菌 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* および乳酸菌 *Lactobacillus* から新規な亜硝酸還元酵素 (Nir) を同定することを目指した。*K. stuttgartiensis* Nir について、本菌の可溶性タンパク質が亜硝酸を一酸化窒素 (NO) へ還元したのに対し、膜タンパク質は亜硝酸をアンモニウム (NH_4^+) へ還元する活性が高かった。NO は *K. stuttgartiensis* の anammox 反応の中間代謝物であると考えられており、可溶性画分に Nir が存在していたことが示唆された。イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーによって可溶性画分から Nir 活性の高い画分を精製し、現在、質量分析法による同定を進めている。*Lactobacillus* Nir について、本菌の培養中に亜硝酸が消失する現象は低 pH 条件下における化学的な反応であることが明らかになった。このような化学的な亜硝酸消失が日本酒の生もと醸造過程で生じている可能性に着目し、新たな醸造技術を提案した。

tRNA 依存型ペプチド合成酵素の tRNA 基質認識機構の解明と新規ペプチド系抗生物質の創製

丸山 千登勢 (福井県立大学生物資源学部)

近年、一部の微生物が生命活動に必須な一次代謝であるタンパク質翻訳システムから aa-tRNA^{aa} をハイジャックし、抗生物質などの二次代謝産物を生合成することが認められた。最近我々もまた、放線菌由来 aa-tRNA^{aa} 依存的アミド合成酵素 Orf11 が Gly-tRNA^{Gly} を基質に、抗生物質 glycylothricin における Gly 側鎖のペプチド合成を触媒することを明らかにした (AEM, 82, 3640-3648, 2016)。さらに Orf11 ホモログ酵素の探索を行ったところ、glycylothricin 類縁化合物生産放線菌が有する Sba18 が、放線菌由来の Gly-tRNA^{Gly} だけでなく、大腸菌由来の Ala-tRNA^{Ala} および Ser-tRNA^{Ser} を基質として新規化合物を生産することを明らかにした。tRNA 塩基配列は微生物種間で異なり、また微生物種それぞれに tRNA の立体構造も異なることから、この種の酵素が aa-tRNA^{aa} 構造のどこを認識しているか極めて興味深い。そこで本研究では、人工合成した aa-tRNA^{aa} を用いた Sba18 の詳細な基質認識機構の解析を試みた。

分裂酵母における細胞壁ホメオスタシスの化学遺伝学的解析

西村 慎一 (京都大学大学院薬学研究科、現 東京大学大学院農学生命科学研究科)

真菌の細胞壁は細胞形態を維持するために必須な構造体であり、壁合成は抗真菌剤の標的でもある。主に多糖からなる細胞壁のホメオスタシスは細胞周期依存的に制御されるが、その分子メカニズムには未解明な点が多く、そもそも必須因子の全貌も明らかではない。本研究ではエルゴステロールに結合して細胞壁の異常合成を誘起する抗真菌化合物セオネラミドの作用機序解析を行うことで、細胞壁合成の制御メカニズムの解明を試みた。

セオネラミドの処理により、いくつかのグルカン合成酵素が細胞壁異常部位に集積することが分かっていた。そこで、壁異常部位に集積するタンパク質の網羅的同定を目的として、分裂酵母の全 ORF 発現株コレクションを用いたスクリーニングを行った。すると約 350 の細胞表層局在タンパク質から、壁異常個所にリクルートされる 20 余りのタンパク質の同定に成功した。一方、細胞壁成分の分析では、細胞壁中の 1,3-β-グルカンの比率がセオネラミドの処理時間依存的に上昇することが明らかになった。今後、壁異常個所局在タンパク質の 1,3-β-グルカン合成における機能を解明することで、真菌の細胞壁合成の全貌とハブ分子の同定が期待できる。

自然界からは未発見の有用アミノ酸脱水素酵素の酵素工学的創製

櫻庭 春彦 (香川大学農学部)

酵素の構造情報を踏まえ、産業に有用なアミノ酸の合成に利用できる人工アミノ酸脱水素酵素を創製することを目的とした。

meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素から作成した D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) は主に分岐鎖 D-アミノ酸や D-リジンに高い活性を示す。その基質結合に関与する Asp94 をアラニンに変異させた D94A は親酵素と比較して D-フェニルアラニンに対する反応性が大きく上昇した。また、L-グルタミン酸脱水素酵素の構造を参考に更なる変異導入を行い、D94A/W148K/D124S を作成したところ、D94A や DAADH には無かった D-グルタミン酸に対する反応性を獲得した。

L-トリプトファン脱水素酵素 (L-TrpDH) はラン藻などに存在するが、不安定で利用が困難である。我々が見出した耐熱性 L-フェニルアラニン脱水素酵素 (L-PheDH) との構造比較において、L-PheDH で基質の側鎖周辺に存在する Leu50 および Leu313 が L-TrpDH ではメチオニンに置換されていた。L-PheDH の L50M/L313M 変異酵素を作成したところ、L-トリプトファンに対する反応性が上昇した。

大腸からの粘液分泌を活性化する菌株の同定とその作用機序の解明
～腸内フローラの変動から推察される微生物叢への着目～

東村 泰希 (石川県立大学生物資源環境学部)

大腸管腔は、粘液分泌細胞から分泌された粘液で覆われており、この粘液層の脆弱化は大腸がんや炎症性腸疾患などの発症リスクの一つとして考えられている。先行研究において我々は、転写抑制因子である Bach1 (BTB domain and CNC homolog 1) 欠損マウスの大腸では粘液分泌が亢進することを見出している。しかし、粘液分泌細胞において Bach1 の発現は観察されなかったことから、Bach1 欠損に伴う粘液分泌の亢進は、遺伝子欠損に伴う直接作用ではなく、副次的効果であることが推測された。以上の観点より、Bach1 欠損マウスの腸内細菌叢を解析した結果、野生型マウスと比較し、*Bifidobacterium* 属の優位な上昇が観察された。当該成果を着想とし、ヒトおよびげっ歯類の腸内に存在する *Bifidobacterium* 属細菌を用いて、腸粘液分泌促進作用を有する菌株のスクリーニングを実施した。その結果、腸粘液を形成する主要タンパク質である *Muc2* の遺伝子発現を有意に亢進させる 2 種の *Bifidobacterium* 属細菌を同定した。今後は、有効成分の同定ならびに作用機序の解明を目指す。

ミコール酸含有細菌の接触刺激による 放線菌二次代謝応答機構の変異ゲノム解析を用いた解明

浅水 俊平 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

放線菌 *Streptomyces coelicolor* はミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* の細胞間接触を介した刺激に応答し、赤色二次代謝産物 (RED) を生産する。本現象には異属細菌の細胞間接触が要求されることから未知の微生物間相互作用の存在が示唆された。本研究では *S. coelicolor* の RED 生産応答性変異株のゲノム中の変異点を同定し、変異遺伝子機能から二次代謝応答メカニズムの解明を目指した。59 株の RED 応答生産に異常を示した変異株をスクリーニングにより選抜し、40 株についてゲノムリシーケンス解析を行った。変異点の同定及びその遺伝子相補を行い、グルタミン酸合成酵素 (*gltB*)、モリブドプテリン生合成酵素 *moeA*、翻訳伸長因子 *fasA*、機能未知膜蛋白質 *sarA*、そして機能未知 TetR 様転写制御因子が応答性異常の原因遺伝子であると同定した。中でも TetR 様蛋白質は ABC 輸送体の転写抑制を担うと考えられた。変異株では ABC 輸送体が構成的に発現し、細胞内のストレスとなる未知小分子の蓄積が緩和されることにより RED 応答生産が遅延する表現型を示すことが考えられた。

脂質代謝異常に対する新たな防御応答機構の解明と 有用スフィンゴ脂質生産の基盤構築への応用

谷 元洋 (九州大学大学院理学研究院)

近年、スフィンゴ脂質の疎水性部の構造であるセラミドの健康食品、化粧品、医薬品への利用が大変注目が集まっている。本研究では、出芽酵母を用いたセラミド大量生産の基盤技術構築を目指した。酵母にセラミドを大量に蓄積させるためには、スフィンゴ脂質代謝系を大きく改変する必要があるが、代謝バランスに変動が生じると致死となる。我々は、これまでにスフィンゴ脂質の代謝系が破綻すると高浸透圧ストレス応答経路 (HOG 経路) が活性化され、代謝破綻に対する防御応答をしていることを見出している (*Mol Microbiol* (2018) 107, 363)。この防御応答機構を強化できれば、セラミドを大量生産できる酵母の創成に繋がることが期待される。そこで、HOG 経路による救済メカニズムを明らかにすることを試みた。DNA マイクロアレイ解析によって、スフィンゴ脂質代謝破綻下で HOG 経路依存的に発現上昇する遺伝子を 30 個同定した。これらの遺伝子の中から、スフィンゴ脂質代謝破綻から酵母を救済している遺伝子として機能未知の *FMP48*, *UIP4* を同定した。またこれらの遺伝子が、転写調節因子である *Mks1* を介して、スフィンゴ脂質代謝破綻によって生じるミトコンドリア由来の活性酸素種の抑制をすることで救済に寄与することも明らかにした。

光による大腸菌組換えタンパク質大量発現系の開発

華岡 光正（千葉大学大学院園芸学研究科）

大腸菌などの宿主微生物に目的遺伝子を導入し、組換えタンパク質や酵素を大量発現させる技術は、広く利用され多くの実績が挙げられている。このような発現誘導系において、宿主生物の多様化や利便性の高いベクター開発に関する研究は広く進められてきたが、遺伝子発現の誘導方法については大きな進展がなく、薬剤処理等による従来法に加え、簡便で発現効率の高い新しい技術開発が期待される。本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリアにおける光応答転写制御の知見を活かし、目的タンパク質の発現を光で誘導することが可能な「光大量発現システム」の開発を目指した。

シアノバクテリアの二成分制御系レスポンスレギュレーターである RpaB は、多様な光環境に応答して迅速に標的遺伝子の転写制御を行うことが確認されている。RpaB 活性を調節するセンサーヒスチジンキナーゼとして NblS と Cph1 に着目し、両者の単独、もしくはキメラ型のセンサーを大腸菌に導入することで、光に依存した RpaB を介した発現誘導系の構築を試みた。シアノバクテリアにおける発現系の開発も併せて進めており、それぞれの検討結果と最適化に向けた課題について報告する。

酸素耐性ビフィズス菌が有する抗酸化機構の解明

山本 裕司（北里大学獣医学部）

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。しかし、本菌のストレス耐性機構については不明な点が多い。本研究では、*B. animalis* より酸素感受性株と酸素存在下でコロニーを形成できる酸素耐性株を分離し、解析を行った。酸素感受性株については、取得した 5 株のうち、3 株で共通して細胞壁合成系遺伝子に、1 株でストレス耐性への関与が報告されている *clpP* 遺伝子に変異が認められた。同定された遺伝子の野生型遺伝子をそれぞれの酸素感受性株に導入したところ、好気条件での生育能が回復したことから、これらの遺伝子が酸素耐性に寄与していることが確認された。酸素耐性株については取得した 3 株のうち、2 株で共通して転写制御因子 X に変異が見られ、酸素耐性への関与が示唆された。また、もう一つの解析手法として、酸素に感受性を示す *Bifidobacterium longum* 105A 株に *B. animalis* のゲノムライブラリーを導入し、大気下での低温生残性を向上させる遺伝子を選抜した。その結果、ジヒドロ葉酸還元酵素が生残性を向上させる遺伝子として同定された。

海洋性紅色光合成細菌によるバイオポリエステル生産システムの開発

樋口 美栄子（理化学研究所環境資源科学研究センター）

海洋性紅色光合成細菌は、海水と太陽光を利用し、二酸化炭素固定と窒素固定を行う環境負荷低減を実現できる理想的な微生物である。また、バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を合成することが知られている。本研究では、海洋性紅色光合成細菌の PHA 生産と形質転換法について解析した。800nm の弱光照射が PHA 生産には有効であり、ピルビン酸とリンゴ酸を炭素源とすると、好気培養では PHA を生産せず、酢酸の添加により生産量が増加した。遺伝子発現解析の結果、好気培養時は TCA サイクルの低下により PHA が生産されず、酢酸の添加により回復すること、転写因子が制御に関与することが示唆された。炭酸水素ナトリウムを炭素源とすると、チオ硫酸ナトリウムの存在下で生育が良く、濃度増加により PHA 生産量が増加した。また、安定同位体で標識した炭酸水素ナトリウムのアミノ酸への取り込みを確認した。一部の株は窒素ガスを窒素源として生育し、窒素のアンモニアへの変換を行うニトロゲナーゼ活性が認められ、窒素固定培養条件においては酢酸を炭素源とし PHA を生産した。さらに、ペプチドを用いた形質転換法を開発した。

鉄腐食性メタン生成菌固定化電極を用いた省エネルギー型二酸化炭素変換技術の開発

若井 暁（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、現 海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門）

本研究では、金属腐食を加速させる鉄腐食性メタン生成菌の固体金属から電子を受け取ってメタンガスを生産するという能力に注目し、光駆動型の二酸化炭素変換技術を開発することを目的とした。安価で耐食性の高いステンレス鋼を用いて電極を作成し、金属鉄顆粒と同時に培養液中に浸漬することで、鉄腐食性メタン生成菌の細胞を含む付着物を電極表面に固定することに成功した。次に、再生可能エネルギーである太陽光を外部エネルギー供給源とするため、太陽電池に作用電極（ステンレス鋼電極）と対極（白金）を接続して、人工海水培地中でのケミカルなガス発生を調べた。対極に白金をした場合、海水の電気分解により当該微生物に有毒な酸素や塩素が生じてしまった。二槽式の電気化学セルを用いればこの問題を解決できるが、一槽式セルでも可能なシステムを開発するために、白金電極の代わりに純鉄試験片電極を用いた。その結果、アノード反応を鉄の溶解反応に代替することができ、酸素や塩素の発生を抑制することが出来た。最後に、固定化ステンレス鋼電極と純鉄試験片電極を太陽電池に接続した結果、光エネルギー駆動による二酸化炭素からのメタン生成に成功した。

リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産に向けた環境汚染物質分解細菌の利用

渡邊 崇人 (京都大学生存圏研究所)

自然界から供給される芳香族化合物の多くは植物リグニン由来である。リグニンは木材腐朽菌等により部分分解されるとその分解生成物である芳香族化合物の多くは土壤中に供給される。土壤中には、リグニンから供給された芳香族化合物を分解して増殖する細菌が数多く存在する。これらは、リグニンの末端分解に直接関与することから末端リグニン分解細菌と呼ぶことができる。我々は、これまでに土壤中より *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属を始めとするビフェニル / ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌を十数株単離し、それらの遺伝生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた。その結果、これらの細菌においては、ビフェニル / PCB 等の環境汚染物質だけではなく、様々な芳香族化合物の分解・代謝を担うと推定される遺伝子を数多く有していることが分かった。一方、これらの環境汚染物質分解細菌は新規な芳香族化合物分解系を獲得した末端リグニン分解細菌の一種とも考えられる。今回は、リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産を行う上でビフェニル / PCB 分解細菌を利用できるのかどうか、その可能性について探った。

埋立地浸出水処理槽において低濃度・低負荷条件下で1,4-ジオキサン分解を担う微生物群集機能の解明

宮田 直幸 (秋田県立大学生物資源科学部)

有害化合物である 1,4-ジオキサンを含有する廃水や汚染地下水を効率的に浄化できる生物処理技術の開発が求められている。これまでに種々の分解菌が分離されてきたが、多くは数十～数百 mg/L と高濃度下で増殖や分解特性が検討され、数 mg/L の廃水中でも高濃度時と同様に機能するかは十分に解明されていない。本研究では埋立処分場の浸出水処理槽において、流入濃度約 2mg/L の 1,4-ジオキサンが生物分解されていることに着目した。浸出水処理槽の生物汚泥を用いて培養試験を行い、硝化阻害剤により 1,4-ジオキサン分解が阻害されること、アンモニア態窒素の負荷を上昇させると 1,4-ジオキサン分解速度も上昇することが示された。亜硝酸態窒素の負荷を上昇させても同様の効果は見られなかった。アンモニア態窒素馴養汚泥では、分解された基質炭素 (^{13}C 標識) の 24% が汚泥に同化され、また硝化阻害剤により炭素同化は大きく抑制された。さらに細菌群集解析により、特定のアンモニア酸化細菌 (*Nitrosomonas* 属) の存在割合と 1,4-ジオキサン分解速度に高い相関が認められた。以上の結果から、低濃度・低負荷条件下の 1,4-ジオキサン分解ではアンモニア酸化細菌が大きく寄与し得ると結論付けた。

カニ殻堆肥由来の放線菌“*Cellulosimicrobium* sp. NTK2”の遺伝資源と特性を利用した次世代バイオマス“キチン”からの有用物質生産

有馬 二郎 (鳥取大学農学部)

キチンは生理活性物質生産や次世代バイオマスとしての利用に期待がかけられる多糖であるが、その強固な構造から、分解に係る煩雑な工程や環境負荷のため有効利用に至っておらず、現在は生物学的な分解が試みられている。本研究では、カニ殻堆肥由来のキチン分解放線菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (以下 NTK2) によるキチン分解、分解物/キチナーゼ利用の実現を目指し、NTK2 の特性とキチナーゼの能力を評価した。

NTK2 のゲノムには、キチナーゼ遺伝子が 8 つ、キチン結合タンパク質 (CBP) 遺伝子が 2 つ存在し、キチン存在下で培養すると、顕著な生育促進に伴い 4 つのキチナーゼと 1 つの CBP を発現した。NTK2 はカニ殻等のキチン廃棄物も効率よく分解し、プロテアーゼの発現も確認された。一方で、グルコースベースのオリゴ糖や多糖を添加すると NTK2 は生育が抑制され、キチンに特化して分解・生育促進することが分かった。8 つの組換えキチナーゼのうち、7 つはキチンやキチンオリゴ糖に対して分解活性を示し、それぞれで特異性は異なっていた。さらには、5 つのキチナーゼは植物病原糸状菌の孢子発芽も抑制した。

光駆動 ATP 再生ミトコンドリアを用いた 光エネルギー利用型酵母の創製とバイオファインケミカル生産への応用

原 清 敬 (静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究院)

酵母に代謝工学的な改良を施し、様々な有用物質の発酵生産性を向上させる研究が行われている。しかし、目的物質の生産性が向上するにつれ、酵母が細胞内エネルギー不足に陥り、生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちに直面することが少なくない。これは、発酵そのものが、インプットである炭素源を、「細胞自身の材料」、「目的生産物」、「細胞内エネルギー」の 3 つのアウトプットに振り分けるプロセスであり、これらがトレードオフの関係にあることに、根本的な原因が存在すると考えられる。そこで我々は、この三つ巴の状態にある発酵プロセスから「細胞内エネルギー」を切り離すべく、本来は光エネルギーを利用できない酵母への光エネルギー利用能の付与を目指している。具体的には、高度好塩菌が有する光駆動プロトンポンプを出芽酵母のミトコンドリアに発現させ、光駆動 ATP 再生ミトコンドリアを創製した。その結果、細胞内の ATP 濃度が高まった。さらに、生合成に ATP の加水分解エネルギーを必要とするファインケミカルの生産性を高めることができた。この光エネルギー利用型酵母は、酵母を用いた有用物質の発酵生産に汎用的に利用できると考えられる。

1 細胞解析による遺伝子発現ノイズ制御機構の網羅的解明

宮崎 亮 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

近年の 1 細胞解析技術の進展によって、同一条件で培養したクローン細胞集団であっても個々の細胞レベルの表現型は均一でないことが明らかとなってきた。そのような 1 細胞レベルの表現型の不均一性がクローン集団内に機能的多様性と柔軟性を生み出し、集団全体のストレス耐性や物質代謝など様々な環境適応能力を促進させることも報告されている。このような表現型の不均一性は特定の遺伝子発現レベルが細胞間でばらつくこと (ノイズ) によって生じるが、そのノイズ制御機構を網羅的に解明した例は皆無である。

本研究では遺伝子発現ノイズに選択圧をかけた独自の進化実験を行い、ゲノミクスと細菌 1 細胞ライブイメージングを駆使することで、ゲノム上の遺伝子発現ノイズを包括的に制御するグローバル因子、および特定のノイズのみをコントロールする特異的制御因子の同定を試みた。その結果、遺伝子発現ノイズが低下または上昇した進化株から、それぞれのノイズを制御すると考えられる因子が複数見出された。本発表では、推定されるノイズ制御機構を紹介する。

微生物により生成される高蓄電ミネラルの生成機構解明

二又 裕之 (静岡大学グリーン科学技術研究所)

バイオマスの有効利活用とグリーンエネルギーの創製は、循環型低炭素社会の構築に必須の課題であり、本研究室では微生物燃料電池 (MFC) の高効率化を目指している。MFC 負電極上より分離された *Desulfovibrio* sp. AY-IV 株は、硫酸還元条件および Fe^{3+} 存在下において黒色の物質を生産した。物質科学的解析から Mackinawite (Fe_{1+x}S) と判明し、化学合成物とは形態が異なった。本物質は約 160 mAh g^{-1} の蓄電能を持ち、本株のゲノムサイズは約 4 Mbp、硫酸還元条件で乳酸からほぼ当モル量の酢酸を生産する不完全酸化型代謝を示し、硫酸還元遺伝子群の転写も確認された。極近縁でかつ構造の異なる蓄電性 Mackinawite を生成する微生物 (HK-IV 株) の硫酸還元遺伝子および推定転写制御領域を比較したが違いを見出せず、本物質生成は細胞外に生産される H_2S と Fe^{3+} の化学反応と推定された。AY-IV 株はカーボングラファイトを電子受容体として細胞外電子伝達および酢酸消費を示した。本結果は電氣的な微生物代謝制御の可能性を示唆しており、現在電氣的代謝変換機構について研究を進めている。

芳香族化合物を特異的に吸着する微生物を用いた 活性汚泥の機能向上に関する研究

森 一博 (山梨大学大学院総合研究部)

水質浄化系における有機性化学物質の生物吸着作用とその応用はあまり検討されていない。我々は、様々な環境試料から芳香族化合物を特異的に吸着する細菌を探索し、吸着菌を分解菌と協働させることによる浄化の効率化を考えた。ここではビスフェノール A (BPA) に高い吸着効果を示した菌株を用いて、分解菌や馴化活性汚泥との混合系での水質浄化の可能性を検討した。

吸着菌を BPA 含有水に懸濁させた除去試験の結果、菌体への吸着により短時間の内に液中 BPA 濃度が減少し、以後、濃度は変化せず安定的に維持された。菌体表面を洗浄することで BPA は回収でき、また、このときの吸着効果は吸着等温式によく従うことなどから、浄化効果は吸着作用によることを確認した。一方、吸着菌を分解菌と混合した系では、速やかに液中 BPA 濃度が減少し、菌体に吸着される BPA を含めた浄化系内の全残存 BPA 量の消失も分解菌単独の系よりも飛躍的に高まることが観察された。続いて、BPA で長期馴養した活性汚泥に吸着菌を導入した除去試験では、吸着菌を導入しない場合に比べて液中 BPA 濃度の低減が促進され、活性汚泥による処理の効率化に吸着菌が寄与することが示された。

軽油相当の炭化水素を大量生産可能なシアノバクテリアの創出

新井 宗仁 (東京大学大学院総合文化研究科)

シアノバクテリアは、アシル ACP 還元酵素 (AAR) とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO) を用い、光合成によって軽油相当の炭化水素を合成できることから、地球温暖化の防止に有効な再生可能バイオエネルギーの生産源として注目されている。しかし、両酵素の活性は低いため、高活性化が必要である。そこで本研究では、AAR と ADO の高活性型変異体を創出し、軽油相当の炭化水素を大量生産可能なシアノバクテリアの創出を目指した。まず、様々なシアノバクテリアに由来する AAR を比較し、最も高活性な AAR を同定した。次に 100 種類以上の AAR 変異体を作製して、さらに高活性化させた。同様に、様々なシアノバクテリア由来 ADO の中から高活性な ADO を見出し、約 40 種類の変異体を作製して、高活性化に重要な部位を同定した。また、AAR と ADO の結合部位も解明した。最後に、これらの高活性型の AAR と ADO を多様な組み合わせで導入したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の変異株を 24 種類作製した結果、炭化水素合成量が野生株よりも 5 倍以上向上したシアノバクテリアの創出に成功した。

要旨(若手研究者助成)

結晶性酸化鉄を還元する新規な微生物の分離培養と代謝メカニズムの解明

青柳 智 (石巻専修大学共創研究センター、現 産業技術総合研究所環境創生研究部門)

地球の大部分を占める嫌気土壌圏には様々な結晶性酸化鉄が豊富に存在するため、その生物学的還元反応は地球の炭素・エネルギー循環を理解する上で重要である。しかし、結晶性酸化鉄の微生物還元に関する知見は乏しい。本研究は、結晶性酸化鉄での集積培養系から分離した *Deltaproteobacteria* 綱の新規細菌 6 種の生理学的特徴付けとゲノム解読による還元メカニズムの解明 (1) および、新規な当該微生物の分離培養 (2) を試みた。

(1) 結晶性酸化鉄を電子受容体、酢酸を電子供与体として用い、分離菌 6 株を培養した。独自に最適化した鉄の 3N 塩酸抽出法を用いて培養後の二価鉄の生成を評価した。その結果、分離株では既知鉄還元菌と比べて数倍の二価鉄が生成し、高い還元活性が示された。現在、その還元メカニズムを明らかにすべくゲノム解読を進めており、発表ではその結果を合わせて議論する。

(2) 4 年にわたり結晶性酸化鉄で集積培養を継続した約 100 個の培養系を対象に、16S rRNA 遺伝子に基づく大規模解析を行った。その結果、以前の実験でも集積されたもののこれまで未獲得だった *Firmicutes* 門細菌の高度な集積が確認された。

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

Handwriting practice lines consisting of 20 horizontal dashed lines.

memo 

A series of horizontal dashed lines for writing.