

NUMBER 32

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH
COMMUNICATIONS**

2018

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 32



2 0 1 8

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	中濱 一雄	
常務理事	樽井 直樹	
理事	熊谷 英彦 富田 房男 原島 俊 本田 武司	鈴木 健一朗 永井 和夫 古川 謙介
監事	下元 高文	藤井 智幸
評議員	今田 哲 北本勝ひこ 関 達治 武田 直久 土屋 英子	魚住 武司 下田 親 竹内 昌男 谷 吉樹 吉田 敏臣

目 次

発酵研究所の歴史 (6)		
～研究助成事業を中心に (2003.4～2017.6)～	中濱 一雄	1
第12回助成研究報告会の開催	横田 明	13
■ 平成28年度大型研究助成		
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系の再検討	前川二太郎	17
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	29
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	41
木材腐朽のシステム合成生物学への挑戦	中沢 威人	55
■ 平成24年度寄付講座助成		
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	尾仲 宏康	67
ミコール酸含有細菌死菌体は放線菌の二次代謝を誘導しない	浅水 俊平, 尾崎 太郎, 尾仲 宏康	73
ミコール酸含有細菌に対する放線菌二次代謝応答機構の網羅的転写解析	浅水 俊平, 尾崎 太郎, 菅井 佳宣, 尾仲 宏康	87
重イオンビーム変異導入法による <i>Tsukamurella pulmonis</i> への 赤色色素非生産応答性 <i>Streptomyces coelicolor</i> 突然変異株の解析	浅水 俊平, 菅井 佳宣, 尾崎 太郎, 尾仲 宏康	95
複合培養を用いた新規アルカロイドの同定と生合成に関する研究	尾崎 太郎, 浅水 俊平, 尾仲 宏康	105
放線菌複合培養液からの抗生物質-シデロフォア連結化合物の発見	浅水 俊平, 菅井 佳宣, 尾仲 宏康	117
ゴードスポリン作用機構の解析	尾崎 太郎, 菅井 佳宣, 浅水 俊平, 尾仲 宏康	129
<i>In vitro</i> 再構成系を用いたゴードスポリン生合成酵素の解析と 合理的な類縁体設計	尾崎 太郎, 菅井 佳宣, 浅水 俊平, 尾仲 宏康	141

ゲノム探索による 32 員環新規チオペプチドラクタゾールの発見 林 昌平, 尾崎 太郎, 浅水 俊平, 尾仲 宏康	155
新規ラビオネン構造の形成に関与するランチペプチド合成酵素の解析 菅井 佳宣, 尾崎 太郎, 浅水 俊平, 尾仲 宏康	167
略号集.....	178

■ 平成28年度 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	179
アーバスキュラー菌根菌の <i>in vitro</i> 培養方法の確立と日本産菌株の整備 石田 孝英	179
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	180
人獣共通感染症原因菌 <i>Escherichia albertii</i> の遺伝子解析および 表現型解析による分類..... 村上 光一	181
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	182
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	182
ヒト口腔領域における <i>Veillonella</i> 属細菌の系統分類と バイオフィルム形成に関する生態学的研究..... 眞島いづみ	183
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	184
原生生物の細胞表面に共生する <i>Treponema</i> 属細菌の シングルセルゲノム解析..... 雪 真弘	184
ナノアーキアの検出と培養株確立の試み..... 伊藤 隆	185
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	186
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	186
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	187
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	188
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	189

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	189
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	190
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 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	191
グリセロール資化性乳酸菌 <i>Enterococcus faecalis</i> 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	192
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	193
植物病原卵菌 <i>Phytophthora infestans</i> のシスト発芽阻害物質の 作用機序解析	谷 修治	193
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	194
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	195
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	195
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	196
難培養性 <i>Dehalococcoides</i> 属細菌の <i>Sulfurospirillum</i> 属細菌による 新規増殖促進メカニズムの解明	内野 佳仁	197
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	198
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	198
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	199
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	200
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	201
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	201

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 202

■ 平成27年度若手研究者助成

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……………春成円十朗 205

発酵研究所の歴史 (6) ～研究助成事業を中心に (2003.4～2017.6)～

中 濱 一 雄*

はじめに

財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka, 略称 IFO) は、1944 年 (昭和 19 年) に当時の内閣技術院と武田薬品工業株式会社との共同出資により設立され、微生物株の保存機関として国内外の微生物研究を支援してきたが、2002 年 7 月に一般微生物株のコレクションと研究者を独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) に移し、微生物株保存機関としての使命を終えた。2003 年 3 月に開催された評議員会・理事会で、アドホック的に微生物の研究を対象とする研究助成事業および微生物に関する出版物を刊行する出版事業を実施することが決定・承認された。

筆者は 2003 年 4 月に武田薬品創薬研究本部から財団法人発酵研究所に転職し、常務理事として勤務することになった。波多野和徳前常務理事から引き継いだ業務は、微生物株保存事業の継続および研究助成事業と出版事業の立ち上げであった。このうち、微生物株保存事業については、2014 年 4 月に EPO 特許寄託株を独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD) に移管した。研究助成事業については、2003 年 4 月に開始し、各種助成を実施して現在に至っている。出版事業については、2003 年 4 月から開始し、出版委員会による企画、執筆者による執筆ののち 2010 年 12 月に「IFO 微生物学概論」を発刊した。

IFO の常務理事 (所長) は、設立当時は中澤亮治、その後、佐藤喜吉、長谷川武治、飯島貞二、長谷川 徹、竹内昌男、波多野和徳の順で、筆者が 8 代目になる。このうち、長谷川武治¹⁾、飯島貞二²⁾、長谷川 徹³⁾、竹内昌男⁴⁾、波多野和徳⁵⁾ がそれぞれの常務理事 (所長) 在任中の事業について執筆し、「発酵研究所の歴史 1, 2, 3, 4 & 5」として本書 (IFO Research Communications) に掲載した。本稿では、筆者が IFO の常務理事に就任

した 2003 年 4 月から退任した 2017 年 6 月まで主導・実施した研究助成事業を中心に記述する。この期間の事柄を記録として残しておくため、業務の担当者、会議 (開催日、場所、出席者) 等について、できるだけ詳細に記載した。

微生物株保存事業

一般微生物株 (主にカタログに掲載されている株、約 15,000 株) は 2002 年に NBRC に移管していたが⁵⁾、危機管理のため、その 1 セットは引き続き IFO で預かった。また、EPO 特許寄託株については、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) には特許株寄託機関がなかったので、そのまま保管・分譲業務を継続した。一般微生物株および EPO 特許寄託株の保存管理は吉田正憲事務長が担当し、EPO 特許寄託株のデータベースの管理と分譲は佐藤邦子職員が担当した。

2009 年 3 月に、これまで危機管理のため IFO で預かっていた一般微生物株の 1 セットも NBRC に全てを引き渡した。

独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD) は、2004 年 4 月に国際特許微生物株の寄託機関としての指定を受け、国際寄託当局としての地位を取得して特許微生物株の寄託業務を実施することになった。そこで、IFO の EPO 特許寄託株を NPMD に移管すべく NPMD と交渉を開始したが、いくつかの問題があった。IFO はヨーロッパ特許庁 (EPO) から認定された特許株寄託機関であるが、NPMD はブタペスト条約上の特許寄託当局であるため、移管したい特許寄託株の取扱が異なるとのことであった。また、IFO のような民間の業務を国が引き受けることを問題視する意見が NITE にあった。しかし、当時 NBRC の顧問を務めていた波多野和徳前常務理事の NITE との度重なる交渉の結果、2014 年 4 月に EPO 特許寄託株 (43 株) を国際特許寄託株として NPMD に移管できた。

研究助成事業

微生物株保存機関としての使命を終えた IFO が何をなすべきか、関係者の間で熟慮の結果、研究助成が、こ

*中濱一雄

1944 年 10 月 7 日生まれ

1969 年 4 月に武田薬品工業株式会社に入社、研究所に配属

2003 年 4 月に武田薬品から財団法人発酵研究所 (IFO) に転職

2003 年 4 月から 2017 年 6 月まで IFO 常務理事

2017 年 6 月から IFO 理事長

れまで実施してきた微生物株保存事業の精神を生かし、微生物の研究の進歩発展に寄与できる事業であるとの結論に達した。2002年11月7日に開催された臨時理事・評議員会で研究助成の概要が決定され⁵⁾、2003年3月14日に開催された評議員会・理事会でアドホック的に微生物の研究を対象とする研究助成事業を実施することが承認された。そこで、筆者がIFOの常務理事として就任した2003年4月から当事業を開始することになった。

平成15年度(2003年度)から研究助成を、平成16年度(2004年度)から研究者招聘助成を実施し、その後、特定研究助成および寄付講座助成を追加した。研究助成事業を開始して5年を経たとき、当事業の内容について見直しをする必要が感じられ、後述する検討委員会を設けて論議していただいた。その検討委員会の見直し案はIFO理事長の森田 桂へ答申され、それに基づき平成22年度(2010年度)から新たに一般研究助成、大型研究助成および若手研究者助成を開始した。

研究助成事業を開始した2003年度から筆者が常務理事を退任した2017年度までに、研究助成、研究者招聘(留学)助成、特定研究助成、一般研究助成、大型研究助成および若手研究者助成で合計367件を採択した。また、寄付講座助成を開始した2008年度から平成2017年度までに、10件の寄付講座を採択した。これまでに採択した助成対象者および寄付講座は、IFOのホームページに掲載されている。

各助成の研究成果は、助成研究報告会で発表され、助成研究報告集 IFO Research Communications に掲載されている。

1) 研究助成

研究助成は、2003年3月14日に開催された評議員会・理事会で承認されたので、2003年4月から実施することになった。著者がIFOに着任したとき、引き継ぎ業務として波多野前常務理事から研究助成の募集要項と申請書を受け取っていたので、これを基にIFOのホームページで研究助成の募集を行った。本助成の研究課題は、研究課題1「微生物の分離、分類、保存に関する研究」を基本とし、これを活用・発展した形の研究課題2「健康、環境に関与する微生物の研究」とした。助成金額は、研究課題1では1件当たり年額300万円以内、研究課題2では1件当たり年額500万円以内で、助成期間は3年以内とし、1年目および2年目に提出される中間報告書を基に評価委員会で評価し、次年度における助成の可否および助成金額の増減を決定することとした。

IFOは研究助成事業に関してまったく未経験であったので、当初は筆者と吉田事務長で試行錯誤しながら研究助成の募集、選考、採択、助成金交付等を行い、毎年、

改善して事業を進めた。当事業の立ち上げとその後の運用について波多野前常務理事および坂野 勲顧問から多大な助言を受けた。また、研究助成事業を実施している他の財団法人からも多くの助言を得た。IFOの研究助成を全国の微生物研究者に周知させるため、募集案内の掲載をバイオ関係、微生物関係の学会のホームページおよび学会誌に依頼するとともに募集案内のチラシを関連する学会、研究会、講演会で配布した。

第1回目となる平成15年度(2003年度)の研究助成を募集したところ、研究課題1では45件の、研究課題2では48件の応募があり、初めてにしては予想以上の応募があった。これは、微生物株保存機関のときの高い知名度と信用のお蔭であると思った。選考委員会での選考について、選考委員長である駒形和男東京大学名誉教授および豊島久真東京大学名誉教授から懇切なご指導をいただいた。選考委員会で選考を行い、研究課題1では5件、研究課題2では2件を採択し、採択された7件に助成金を支給した。助成対象者から提出された1年目および2年目の中間報告書を基に早石 修京都大学名誉教授を委員長とする評価委員会で審査し、研究の進捗状況および成果に応じて次年度の助成金の助成の可否および助成金額の増減を決定した。

この研究助成は平成21年度(2009年度)まで実施し、合計51件を採択した。

なお、2005年からは、佐藤職員が微生物株保存事業に加えて研究助成事業の業務にも携わるようになった。

2) 研究者招聘助成

東南アジアは微生物資源の宝庫であり、この地域の微生物研究者を支援することは国際協力としてたいへん意義深い。2003年3月14日に開催された評議員会・理事会の承認を得て、東南アジアを含む途上国の研究者を支援するための研究者招聘助成を平成16年度(2004年度)から開始した。助成対象は①微生物に関する研究を行う目的で来日する外国人研究者、②微生物に関する学会で発表する目的で来日する外国人研究者とし、研究課題は微生物の分類に関する研究とした。助成金額は、①の場合は最高25万円/月とし、②の場合は1名あたり20万円を限度とした。受理した応募申請書を選考委員会で審査し、支給総額が600万円以内(平成23年度以後は1,000万円以内)になるように採択し、助成金を支給した。後述する検討委員会の答申を基に、平成22年度(2010年度)から、本助成に③微生物に関する研究を行う目的で外国へ留学する日本人研究者(最高25万円/月)を追加し、研究者招聘・留学助成とした。

平成16年度(2004年度)から平成29年度(2017年度)まで、合計35件を採択した。このうち、第10回世界微

生物株保存会議 (2004年10月10日-15日, つくば市), 国際微生物連合2011年大会 (2011年9月6日-16日, 札幌市), 第64回日本生物工学会大会 (2012年10月23日-26日, 神戸市), 第14回酵母国際会議 (2016年9月11日-15日, 淡路市) および第11回国際極限環境生物学会 (2016年9月12日-16日, 京都市) では, 10名以上の外国人研究者 (発表者) に学会を通して助成をおこなった。

3) 特定研究助成

前出の研究助成の規模を大きくした助成 (特定研究助成) を実施するため, 委員会を設け, 2006年7月19日, 波多野和徳委員長ほか3名の委員 (木村 光, 中瀬 崇, 坂野 勲) で協議し検討を行い, IFOで提案した2つの課題に沿った研究を行うグループを募集して助成することにした。その結果, 研究課題1として「我が国における微生物の多様性解析とインベントリデータベースの構築-亜熱帯域と冷温帯域の比較から」を, 研究課題2として「琵琶湖の水質と環境浄化に関する研究-ヨシ帯とそこに生息する微生物が果たす役割の解明」を研究するグループが採択され, 評議員会・理事会で承認された。助成金額は年間2,000万円, 助成期間は3年で, 1年目および2年目の中間報告書を基に評価し, 研究の進捗状況および成果の応じて次年度の助成金の増減を決定した。本助成は, 2007年度 (3年間) の1回だけ実施し, 次に述べる寄付講座助成に発展していった。

4) 寄付講座助成

近年, 大学では微生物の研究と教育を行う講座 (研究室) が減少している。例えば, 東京大学では応用微生物研究所が分子細胞生物学研究所に, 大阪大学では工学部の醗酵工学科が応用生物工学科に名称が変更されたことから明らかなように, 微生物関連の講座がなくなりつつあった。このままでは日本の大学で微生物関連の講座がなくなり, 微生物の研究が衰退するのではないかと危惧された。IFOの坂野 勲顧問から「研究助成事業の1つとして, 大学に寄付講座を設置・運営するための助成を行ってはどうか」との提案があり, この件を森田 桂理事長に相談したところ, 寄付講座は助成金が多額であることもあって「慎重に進めたいので理事・評議員の先生方のご意見を聞いてほしい」とのことであった。評議員であった木村 光京都大学名誉教授に寄付講座についてご意見を伺ったところ, 「たいへん意義深い助成である」と大いに賛成された。この旨を森田理事長に伝え, ゴサインがでたので, 木村 光名誉教授を委員長とする教育・研究育成委員会を設けた。2008年1月9日にIFOで木村委員長ほか4名の委員 (熊谷英彦, 富田房男,

波多野和徳, 坂野 勲) が出席して会議を開催し, 寄付講座助成に関する検討を行い, 具体案をまとめた。その具体案は2008年3月13日に開催された評議員会・理事会で承認され, 平成20年度 (2008年度) から寄付講座助成を実施することになった。

助成金額は2.5億円, 助成期間は5年 (その後, 5.5年) とし, 研究課題は特に設定せず, 微生物全般とした。全国の国立大学, 公立大学, 私立大学の部局 (研究科, 学部, 研究所) に向けて公募を行い, 応募申請書を基に選考委員会で選考し, 理事会で採択を決定した。採択された大学に助成金を支給した。

平成20年度 (2008年度) から平成29年度 (2017年度) まで, 京都大学 (全学), 北海道大学 (農学研究院), 九州大学 (農学研究院), 大阪大学 (工学研究科), 東京大学 (農学生命科学研究科), 石川県立大学 (生物資源工学研究所), 北里大学 (北里生命科学研究科), 首都大学東京 (理工学研究科), 東北大学 (生命科学研究科) および筑波大学 (生命環境系) の合計10件を採択した。

寄付講座設置期間中には, 毎年, 寄付講座の教員から中間報告書を提出させ, これを選考当時の選考委員に送付している。中間報告書について選考委員からいただいたご意見・コメントをまとめて寄付講座教員に送付し, 当該講座の研究の進展に役立てるようにしている。

寄付講座を設置した大学では, 寄付講座の開設時期および終了時期に当該寄付講座主催のシンポジウムが開催されている。

5) 検討委員会

2003年4月から実施してきた研究助成事業が5年目を迎えたとき, その内容について見直しが必要と考えられたので, 検討委員会を立ち上げ, 当事業の内容について検討することになった。IFOの理事である別府輝彦東京大学名誉教授に委員長を務めていただき, 2008年7月28日にIFOで検討委員会が開催された。9名の委員 (別府輝彦, 木村 光, 鈴木健一朗, 富田房男, 永井和夫, 波多野和徳, 古川謙介, 本田武司, 中濱一雄) が出席して協議・検討し, さらにメールで委員へのアンケートを実施して検討結果をまとめ, 見直し案を作成した。この見直し案は2008年12月8日に別府委員長から森田理事長へ答申された。その主な内容は次のとおりである。

- 1) これまでの研究助成を廃止して, 新たに一般研究助成と大型研究助成を行う。
- 2) 一般研究助成および大型研究助成の研究課題は, 研究課題1「微生物の分類に関する研究」, 研究課題2「微生物の応用に関する研究」, 研究課題3「微生物の健康, 環境に関する研究」とする。
- 3) ポスドクを対象とする若手研究者助成を行う。

- 4) 研究者招聘助成に留学のための助成を追加し、研究者招聘・留学助成とする。
- 5) 寄付講座助成については、このまま継続し、時々見直しを行う。
- 6) 選考委員会の選任に関する新たな規程を設ける。

本答申の内容は2009年3月10日に開催された評議員会・理事会で承認され、これを基に研究助成事業を実施することになった。

6) 一般研究助成

検討委員会の答申を基に、平成22年度(2010年度)から新たに一般研究助成を開始した。助成金額は1件あたり300万円、助成期間は2年。研究課題は、研究課題1「微生物の分類に関する研究」、研究課題2「微生物の応用に関する研究」、研究課題3「微生物の健康、環境に関する研究」とし、平成28年度(2016年度)助成の募集から研究課題3を「微生物の環境に関する研究」とした。受理した応募申請書を選考委員会で審査してそれぞれの研究課題で約10件ずつ採択し、助成金を支給した。

平成22年度(2010年度)から平成29年度(2017年度)まで、合計239件を採択した。

7) 大型研究助成

検討委員会の答申を基に、一般研究助成よりも大きな構想をもつ研究を対象とする大型研究助成を平成22年度(2010年度)から開始した。助成金額は1件あたり1,000万円、助成期間は2年、研究課題は一般研究助成と同じとした。受理した応募申請書を選考委員会で審査してそれぞれの研究課題で1件ずつ採択し(応募件数が最も多い研究課題では2件を採択)、助成金を支給した。

平成22年度(2010年度)から平成29年度(2017年度)まで、合計32件を採択した。

8) 若手研究者助成

ポスドクは大学の研究において重要な役割を果たしているが、その多くは生活が不安定であり、日本の科学研究の後継者育成に関わる問題点の1つとなっている。検討委員会で若手研究者への支援が提案され、その答申を基に平成22年度(2010年度)から新たにポスドクを対象とする若手研究者助成を実施することになった。助成金額は年間500万円(生活費400万円+研究費100万円)で、助成期間は3年、研究課題は主に微生物の分類に関する研究とした。受理した応募申請書を選考委員会で審査して1件を採択し、助成金を支給した。

平成22年度(2010年度)から平成29年度(2017年度)まで、合計8件を採択した。

9) 応募件数および採択件数

平成29年度(2017年度)一般研究助成、大型研究助成、若手研究者助成、研究者招聘・留学助成および寄付講座助成の応募件数および採択件数を表1に示す。年度ごとの応募件数および採択件数はIFOのホームページに掲載されている。

9) 助成研究報告会

第1回目となる平成15年度(2003年度)研究助成の助成期間が2007年3月に終了するので、助成対象者が研究成果を発表するための助成研究報告会を開催することになり、千里ライフサイエンスセンター(豊中市)で実施した。

第1回助成研究報告会は2007年5月25日に開催された。平成15年度(2003年度)研究助成対象者7名が3年間の研究成果を口頭発表した。すなわち研究課題1「微生物の分離、分類、保存に関する研究」は5題、研究課題2「健康、環境に関する微生物の研究」は2題が発表された。座長には、発表者(助成対象者)が採択されたときの選考委員長であった駒形和男名誉教授(研究課題1)および豊島久真名誉教授(研究課題2)が務められた。第2回以後もほぼ同じ形式で実施し、現在に至っている。

第1回助成研究報告会の参加者は80名弱であったが、その後、参加者は年々増加して、2017年6月9日に開催された第11回助成研究報告会の参加者は232名に達し、このうち大学院生は29名を数えた(図1)。

最近の当報告会では、大型研究助成と寄付講座助成の研究成果は口頭発表、一般研究助成と若手研究者助成の研究成果はポスター発表としている。いずれの発表でも、質疑・応答が活発である。

口頭発表、ポスター発表の後には懇親会を開催した。分類、生態、応用、環境、健康、病原微生物など様々な領域の微生物研究者が一堂に会し、盛んに歓談がなされ、

表1 平成29年度(2017年度)助成の応募件数および採択件数

助 成		応募件数	採択件数
一般研究助成	研究課題1	61	11
	研究課題2	137	13
	研究課題3	59	10
大型研究助成	研究課題1	10	1
	研究課題2	15	2
	研究課題3	8	1
若手研究者助成		9	1
研究者招聘・留学助成		5	5
寄付講座助成		14	1



口頭発表



ポスター発表



懇親会

図1 第11回助成研究報告会

異分野研究者間の交流を深める機会を提供している。

この助成研究報告会では、伊藤忠義氏、横田明氏ほか元IFO所員の多大な協力を得た。

なお、毎年の助成研究報告会については次項で述べる助成研究報告集 IFO Research Communications に掲載されている。

10) 助成研究報告集

IFO は 1961 年に IFO Annual Report という名称で機関誌の刊行を開始した。その後、1971 年から IFO Research Communications に改称し、隔年で刊行してきた。その主な内容は、保存業務に必要な微生物の分離、分類およ

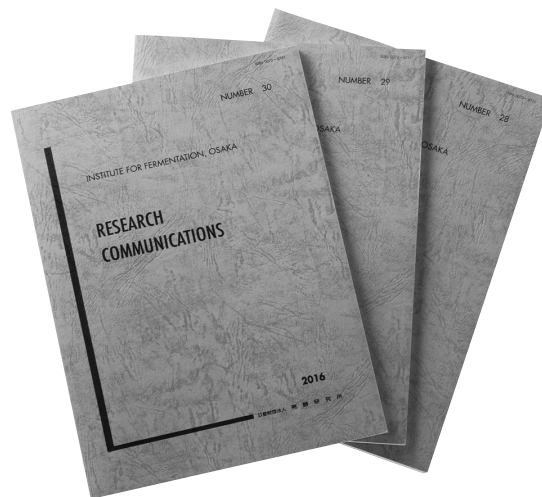


図2 助成研究報告集 IFO Research Communications

び保存に関する研究成果である。2002年に微生物株保存機関としての研究を終了するのに伴い20号（1999-2000年）を最後に休刊していたが、2007年から研究助成の助成対象者による助成によって得られた研究成果を掲載する助成研究報告集 IFO Research Communications として復刊することになった。このため、IFO 評議員である駒形和男名誉教授を委員長とする当機関誌の編集委員会を設けた。2007年7月12日に八重洲富士屋ホテルで第1回会議が、2008年8月9日に同ホテルで第2回会議が開催され、駒形委員長ほか3名の委員（中瀬 崇、波多野和徳、渡邊 信）が出席して助成研究報告集の投稿要領、投稿原稿の査読等について協議した。その後、さらに議論を深めるため、各委員はメールにて協議を続行し、編集方針が定まって現在の形になった。

復刊の21号は平成15年度（2003年度）研究助成の助成対象者7名による約3年間の研究成果のまとめたものである。その後、大型研究助成、寄付講座助成、一般研究助成、若手研究者助成の研究成果を掲載し、現在に至っている（図2）。

当報告集では助成研究で得られた成果のみならず、Negative data も盛りこまれている。学术论文では Negative data を掲載することはないが、この報告集では Negative data であっても記録として残しておく価値のあるものは記述するよう執筆者にお願いしている。

当報告集 IFO Research Communications はレベルの高い伝統ある機関誌であるので、充実した内容にするため、投稿原稿について数名の委員による3度の査読（一次査読、二次査読、三次査読）を実施し、必要に応じて執筆

者に修正を指示している。

当報告集は、毎号約 600 部印刷し、多くの微生物研究者に配布し利用されている。2017 年から、IFO Research Communications の 1 号から最新号までのすべての内容を PDF ファイルにして IFO のホームページで閲覧できるようにした。

出版事業

2002 年 11 月 7 日に開催された臨時理事・評議員会で、監事の大嶋泰治大阪大学名誉教授から微生物に関する出版物を刊行することが提案され⁵⁾、2003 年 3 月 14 日の評議員会・理事会で承認された。微生物学の進展のためにはまず大学で微生物に関心をもつ優秀な学生を育てることが肝要であるが、日本語で書かれた適切な微生物学入門教科書がないとの声が多かったので、IFO が主体となって要望に応えうる微生物学入門教科書を出版することになった。当書を出版するための出版委員会の委員長には大嶋泰治名誉教授が選任された⁵⁾。

大嶋委員長と筆者との間で 2003 年 4 月から 6 月までの 4 回の会合で出版のスケジュール、出版委員、出版社について相談し、大嶋委員長が提示された微生物学の入門教科書「IFO 微生物学概論」の構想書を基に出版委員会で協議することになった。出版委員会は 2003 年 7 月 23 日（第 1 回）、8 月 28 日（第 2 回）、2004 年 4 月 9 日（第 3 回）に IFO で開催された。この出版委員会には大嶋委員長ほか 4 名の出版委員（荒井基夫、駒形和男、本田武司、宮道慎二）が出席し、執筆要領および目次を作成し、執筆者を決定した。執筆者には微生物研究の各分野の第一人者が選ばれ、大嶋委員長はじめ出版委員がそれぞれの章の編集を担当することになった。その後、出版委員として新たに 2 名（杉山純多および中瀬 崇）が参加した。本書の出版社は培風館とし、同社の担当者と 2 回にわたって協議した。

2004 年 9 月 19 日に東京駅八重洲北口ルビーホールにて出版企画会議が開催され、大嶋委員長はじめ出版委員を含む 15 名の執筆者が出席した。大嶋委員長から出版に至った経緯および趣旨および執筆要領の説明があり、執筆の分担が相談、決定された。

出版企画会議の直後から執筆者に執筆を依頼したが、執筆は大幅に遅れ、2009 年 7 月ようやく一次原稿が揃い、原稿の編集が行われた。完成稿を 2009 年 9 月 29 日に出版社（培風館）に渡し、2010 年 12 月 22 日に「IFO 微生物学概論」が発刊された。本書は、財団法人発酵研究所監修、大嶋泰治、新井基夫、駒形和男、杉山純多、中瀬 崇、本田武司、宮道慎二共編、執筆者は 37 名で、5 版/543 ページとなった（図 3）。内容を重視したため



図 3 IFO 微生物学概論

ページが増え、経費が膨らんだが、売価を学生でも購入可能な値段（本体 4,700 円 + 税）に抑えた。本書の目次を表 2 に示す。

本書は内容が充実しているとともに、最新の研究成果が盛り込まれ、優れた教育内容になった。また、装丁、紙質、図版や写真も美しく仕上がっている。微生物学のほとんど全ての領域を採りあげて懇切な解説がなされており、微生物の学徒に極めて有益な参考書になったと自負している。出版社によると、本書は 2014 年 3 月までに 1,065 部販売され、在庫はほとんどなくなった。

公益法人への移行

1896 年（明治 29 年）の民法で定められた公益法人制度を抜本的に改革するため 2006 年 3 月に公益法人制度関連法案が閣議決定され、同年 5 月に国会において法案が成立した。2008 年 12 月から施行されるので財団を存続するためには、向こう 5 年以内に公益財団法人または一般財団法人への移行申請し、認可されることが必要になった。

IFO は、公益法人協会に加入していたので、当協会が発刊する月刊誌、主催する説明会等により新制度に関する情報を入手していた。その他、国、証券会社が主催する説明会にも積極的に参加した。また、製薬企業が設立した財団法人（25 財団）の生命科学助成財団懇談会において、助成財団センターや公益法人協会の講師の講演を聞くことに加えて他の財団との意見交換によって多くの情報を得た。

公益認定申請には吉田正憲事務長が主担となって定款等の書類の作成など認定に必要な作業を進め、2011 年 4 月 1 日に公益法人へ移行することができた。

表2 「IFO 微生物学概論」の目次

<p>I. 基礎編</p> <p>1. 序 論 微生物の発見／自然発生説に対する論争／醸造技術／医学と免疫学／薬剤の開発／植物の微生物侵害／地球環境／微生物分類法の変遷／生命科学への展開</p> <p>2. 微生物の操作と観察法 微生物培養法／顕微鏡による観察／微生物株の保存</p> <p>3. 微生物の多様性 生態系と微生物の活動／地球生態系の創生と微生物／微生物における系統進化と分類法の変遷</p> <p>4. 微生物と物質代謝 代謝の熱力学／微生物のエネルギー代謝／光合成／生合成</p> <p>5. 微生物の増殖 細胞増殖の数学的表現／閉鎖系内での増殖経過／連続培養系での増殖経過／増殖の計測／細胞の分裂様式／自然環境が増殖に与える影響／共生</p> <p>II. 微生物の遺伝現象</p> <p>6. 遺伝子とその形質支配 細胞分裂と染色体の動き／核酸と染色体の構造／DNAの複製／ウイルスとファージにおけるゲノムの複製／遺伝子発現</p> <p>7. 微生物の変異と組換え 遺伝子と突然変異／微生物における交雑のメカニズム／変化し移動する遺伝子</p> <p>III. 微生物の系統発生と分類</p> <p>8. 原核生物の系統と分類 細菌分類学の歴史／微生物の分類学</p> <p>9. 細菌 プロテオバクテリア／ファーミクテス／アクチノバクテリア／シアノバクテリア／その他の細菌</p> <p>10. アーキア 性質と分布／膜脂質／細胞外被／中央代謝系／遺伝情報の複製と発現装置／分類</p> <p>11. 真核微生物の系統と分類 真核微生物の種多様性／真核微生物の大きな系統関係／命名法と命名規約</p>	<p>12. 菌 類 菌類とは／ツボカビ門／接合菌門／子囊菌門／担子菌門／酵母／地衣類／偽菌類</p> <p>13. 真核藻類 灰色植物門／紅色植物門／緑色藻類／クリプト植物門／ユーグレナ植物門／クロララクニオン植物門／ハプト植物門／不等毛植物門／渦鞭毛植物門</p> <p>14. 原生動物 単細胞真核生物の進化／原生動物の分類体系／原生動物の種類／アルベオラータの分類</p> <p>15. ウイルスとバクテリオファージ ウイルスの構造と形態／細菌ウイルス／動物ウイルス／植物ウイルス／スローウイルス感染症とプリオン／がんウイルス</p> <p>IV. 生態系における微生物</p> <p>16. 地球環境と微生物 炭素の循環／窒素の循環／硫黄の循環／リンの循環／鉄その他元素の循環／土壌・淡水・海洋および極限環境と微生物</p> <p>17. 植物・動物との共生 植物との共生／動物との共生</p> <p>V. ヒトと微生物</p> <p>18. ヒトへの侵害：病原微生物と感染症 感染症とヒト／感染発症の要因／主な感染症とその原因微生物／病原微生物の危険性とバイオセーフティ／感染症法</p> <p>19. ヒトへの感染防御と免疫 物理的障壁／自然免疫系／適応免疫系／免疫異常と病気</p> <p>VI. 微生物の利用</p> <p>20. 人類の生産活動と環境保全への微生物の応用 酒類と発酵食品の製造／食飼料としての微生物菌体の生産／医薬品製造への微生物の応用／アミノ酸と核酸関連物質の生産／発酵生産と化学工業への微生物の応用／酵素の生産／地球環境保全への応用／農業における微生物の役割</p>
---	---

移行認定申請の主な経緯は次のとおりである。

- ・2009年3月10日 評議員会・理事会で公益財団法人への移行決議
- ・2009年6月4日 評議員会・理事会で最初の評議員選任方法について決議および最初の評議員候補者選定
- ・2009年8月21日 最初の評議員選任委員会開催
- ・2010年3月10日 評議員会・理事会で定款変更の案決議
- ・2010年3月10日 評議員会・理事会で役員報酬規程決議
- ・2010年9月1日 移行認定申請
- ・2011年4月1日 内閣府より公益財団法人の認定を受け、「公益財団法人発酵研究所」に移行

理事、監事、評議員

筆者が常務理事を就任した2003年度、公益法人に移行した2011年度および常務理事を退任した2017年度の理事長、常務理事、理事、監事および評議員の名簿は次のとおりである。

2003年度

理事長	森田 桂		
常務理事	中濱一雄		
理事	岡田善雄	岡見吉郎	杉野幸夫
	波多野和徳	早石 修	藤野政彦
	別府輝彦	山田秀明	
監事	磯野正雄	大嶋泰治	
評議員	大村栄之助	木村 光	駒形和男

竹内昌男	武田六郎	竹中浩治
椿 啓介	富田房男	豊島久真男
中瀬 崇	古川謙介	本郷次雄
松原 謙一		

2011 年度

理事長	波多野和徳		
常務理事	中濱一雄		
理事	大嶋泰治	木村 光	武田光子
	富田房男	中瀬 崇	古川謙介
	別府輝彦	本田武司	
監事	岡田将生		
評議員	今田 哲	魚住武司	北本勝ひこ
	下田 親	竹内昌男	谷 吉樹
	土屋英子	松原謙一	吉田敏臣

2017 年度

理事長	中濱一雄		
常務理事	樽井直樹		
理事	熊谷英彦	鈴木健一朗	富田房男
	永井和夫	中瀬 崇	原島 俊
	古川謙介	本田武司	
監事	下元高文		
評議員	今田 哲	魚住武司	北本勝ひこ
	下田 親	関 達治	竹内昌男
	武田直久	谷 吉樹	土屋英子
	吉田敏臣		

IFO の理事会、評議員会の出席率は常に 8 割以上で、全員が出席されることも多い。また、議案や報告事項について質疑応答は活発で、適切なご指摘、有益なご意見・ご提案をいただいた。理事、評議員が IFO の運営に熱心であることの証であり、感謝している。

顧 問

2003 年に筆者が IFO に着任した当時の顧問は、長谷川武治元発酵研究所所長および坂野 勲元発酵研究所副所長であった。2003 年 11 月から 2006 年 1 月まで、毎年、ヒアリングで両顧問に当年度の進捗状況と次年度の事業計画を説明して、ご意見とご助言を得た。

長谷川顧問は、日本の微生物保存事業に多大な貢献をされ、1993 年に勲四等瑞宝章を受章された³⁾。1997 年 6 月から 9 年間、IFO の顧問を務められた。2006 年 5 月に間質性肺炎を発病され、8 月 6 日に満 91 才の天寿を全うして永眠された。8 月 8 日に枚方市で告別式が執り行われ、IFO の評議員である駒形和男東京大学名誉教授が弔

辞を述べられた。

坂野顧問は、IFO の研究者時代に担子菌系酵母の有性世代の発見という偉大なる業績をあげられた。1997 年 6 月から 20 年間、IFO の顧問を務められた。前出のヒアリング以外にも、月に 2～3 回、IFO に来訪され、IFO の運営や事業にたいへん有益なご意見とご助言を受けた。また、助成研究報告会、助成研究報告集等の件でもご支援いただいた。2017 年 6 月で顧問を退任されたが、現在もメール等でご意見をいただいている。

人 事

筆者が IFO の常務理事を務めていた 2003 年 4 月から 2017 年 6 月までの IFO の人事は次のとおりである。

1) 理事長

筆者が IFO の常務理事として着任した時の理事長は、元武田薬品社長・会長の森田 桂であり、武田薬品相談役として武田薬品本社（御堂筋ビル）に在籍していた。相談役の退職を機に、2005 年 7 月に発酵研究所（武田薬品研究所本館内）に設けた理事長室に移った。森田桂は 2010 年 6 月に理事長を退任し、理事の互選により波多野和徳理事が理事長に就任した。波多野和徳は 2017 年 6 月に理事長を退任し、それまで常務理事を務めていた筆者が理事長に選任され、現在に至っている。

2) 常務理事

筆者（中濱一雄）は 2003 年 4 月に波多野和徳から常務理事を引き継ぎ、2017 年 6 月に常務理事を退任した。筆者の後任として武田薬品医薬研究本部生物分子研究所の所長を勤めていた樽井直樹が常務理事に就任し、現在に至っている。

3) 事務長

筆者が IFO の常務理事として着任した時の事務長は吉田正憲であった。吉田正憲事務長の定年退職に伴い、2010 年 9 月から吉田恒明が事務長に就任した。その後、吉田恒明事務長の定年退職に伴い、武田薬品で経理業務を担当していた児山宗太郎が 2015 年 8 月に事務長に就任し、事務全般の管理、経理業務等を担当している。

4) 職員

筆者が IFO の常務理事として着任した時の職員は佐藤邦子であった。その後、佐藤邦子の定年退職に伴い、2015 年 4 月に柘原 静が職員として着任し、研究助成事業の業務に携わっている。

IFOの収支

IFOは2001年度までは武田薬品から寄付を受けていたが、2002年度以後はこの寄付を打ち切られ、その後のIFOの収入のほとんどは武田薬品の株の配当金となった。2010年度から現在までの武田薬品株の1株当たりの配当金は180円で、IFOは245万株を保有しているので配当収入は4.41億円となる。

2017年度の収入は、上記の配当収入とその他の収入(利息等)を合わせると4.74億であった。このうち4億865万円を研究助成金[一般研究助成1億200万円(34件)、大型研究助成4,000万円(4件)、若手研究者助成700万円(3件)、研究者招聘・留学助成965万円(5件)、寄付講座助成2.5億円(1件)]として支出した。

今後、武田薬品株の配当金が変わると、それに応じて研究助成事業の内容を変更する必要がある。

その他のできごと

1) 事務所の移転

IFOは武田薬品研究所本館が竣工した1955年から当研究所本館に賃借所在していたが、武田薬品研究所の湘南への移転に伴い当研究所本館を解体することになり、同じ敷地内(武田薬品大阪工場)にある管理棟の1室を借受けることになった。当研究所本館では、事務所と常務理事室(1階)、理事長室(6階)および微生物株保管庫兼倉庫(地下)の3か所に分かれていたが、これらを管理棟6階の1室に移すことになった。吉田恒明事務局長は武田薬品時代に設備関係を担当していたので、この経験を生かして無事に移転し、使い勝手のよい事務所となった。

移転後、IFOは武田薬品に賃借料として毎年436万7千円を支払っている。

2) 菌塚参拝

京都市の比叡山西麓にある曼殊院の境内に微生物の供養塚「菌塚」がある。今から約40年前に、大阪の大和化成株式会社(現在は天野エンザイム株式会社滋賀工場)の取締役社長であった笠坊武夫氏は、社長退任を機に「人類のため多大な貢献をし、犠牲となった菌類に感謝し、供養する」ため、供養塚として菌塚を建立することを思いついた。菌塚の建立について相談を受けたIFO所長の長谷川武治は、IFOの理事で発酵・醸造学の世界的権威である坂口謹一郎東京大学名誉教授を笠坊氏に紹介した。菌塚は自然石の石碑で坂口謹一郎名誉教授の揮毫による「菌塚」の碑銘が彫られている。1981年5月16日

に菌塚の除幕法要が行われ、多くの関係者が参列した。その後、曼殊院では毎年5月に法要を行っていたが、知名度が低く、参列者は少なかった。

IFOの武田光子理事のご提案により、理事、監事、評議員の先生方に菌塚を参拝し、武田薬品京都薬用植物園を見学していただくことを計画し、次のように実施した。2012年3月8日の理事会および6月22日の評議員会を京都市内で開催した後、出席者全員がマイクロバスで曼殊院に異動し、菌塚を参拝した(図4)。この参拝にあわせて曼殊院を拝観し、武田薬品のご厚意で京都薬用植物園を見学した。微生物の研究を支援することを理念とするIFOの理事、監事、評議員の先生方に菌塚を参拝していただくことはおおいに意義があると感じた。

2013年5月に曼殊院の松影崇誓執事長から「久しぶりに多くの方に参列していただいて菌塚の法要をしたいので協力してほしい」との依頼があり、IFOから筆者の他に吉田恒明事務局長および佐藤邦子職員が助力することになった。2014年5月26日に33年ぶりに盛大な法要が執り行われ、雨天にもかかわらず、大学や企業の発酵関係者および京都大学の大学院生・学生を含めて約100名が参列した。法要の願主は菌塚を建立した笠坊武夫氏のご子息である笠坊俊行氏。法要は当院の藤光賢門主の読経から始まり、参列者の焼香でもって滞りなく終了した。参列者には、曼殊院を拝観し、武田薬品京都薬用植物園を見学する機会が得られた。

3) 震災支援

2011年3月11日に発生した東日本大震災では地震と津波により、多くの尊い命が失われ、家屋や施設が大被害を受けた。2011年6月7日に開催された評議員会で土屋英子評議員から「東日本大震災で被害を受けた微生物株保存機関があったならば、その支援をしてはどうか」とのご提案があった。そこで、日本微生物資源学会(鈴木健一朗会長)のカルチャーコレクション委員会を通して同学会傘下の保存機関(23機関)にIFOからの寄付を要望する機関の募集を行ったところ、石巻専修大学理工学部基礎理学科(ISU)から応募があった。IFO理事会の承認を得て2011年12月にISUに1,000万円を寄付した^{6,7)}。

北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所(釜石研)は、東日本大震災での津波で被災し、フリーザーに保管していた微生物株が全滅の危機に瀕したので、IFOの平成21年度(2009年度)研究助成対象者(笠井宏明)の3年目助成金を使って菌株の復元作業を行った。その結果、71%の菌株の生存が確認され、再保存することができた^{8,9)}。釜石研は当フリーザーから救済した石割桜の酵母を用いて地元酒造会社と共同で東北復興支援ビー



理事会後（2012年3月8日）



評議員会後（2012年6月22日）

図4 理事会・評議員会後の菌塚参拝

ル「福香ビール」を開発した⁹⁾。IFOは2013年6月7日に開催された第7回助成研究報告会の際にこの「福香ビール」を大量購入し、懇親会で参加者に供した¹⁰⁾。

4) 財団設立当時の理事会議事録に関する投稿

東日本大震災の翌年、元評議員の駒形和男東京大学名誉教授からお電話があり、「東京大学では、太平洋戦争中に坂口謹一郎教授は空襲を避けるため教室の菌株を盛岡農林専門学校と高田農学校に疎開された。その当時、IFOは菌株をどこに疎開させたのか」とのご質問をいただいた。財団設立当時の理事会議事録を調べたところ、菌株を京都薬学専門学校(現 京都薬科大学)に疎開させたことが書かれてあったので、この議事録のコピーを駒形和男名誉教授に送付した。当議事録には上記の菌株の疎開のほかにも事業内容、役員など日本の終戦前後の微生物研究の状況を知るうえでたいへん貴重な事柄が記載されていたので、駒形和男名誉教授から「この時期の理事会議事録は貴重な資料であるので、何らかの形で公表してはどうか」とのご提案をいただいた。また、2014年3月に開催した理事会および同年6月に開催した評議員会で財団設立当時の理事会議事録を紹介したところ、理事および評議員から「興味ある内容であるので、学会誌等に投稿するとよい」とのご意見をいただいた。

そこで当財団設立当時の第一回から第四回までの理事会議事録を紹介することを目的に生物工学会誌の「資料」として投稿し、2015年の第93巻第3号に掲載された¹¹⁾。標題は「微生物株の保存とバックアップ～発酵研究所設立当時の理事会議事録から～」で、著者は中濱一雄。当稿は公益社団法人日本生物工学会の許可を得て本書29号に転載した¹²⁾。

おわりに

筆者が常務理事として勤務した2003年4月から2017年6月までの約14年間の経緯について記述した。IFOは1944年に設立されて以来、微生物株の保存機関として国内外の研究を支援し、多大な貢献をしてきたが、2002年にその使命を終えた。2003年から新たに微生物の研究を対象とする研究助成事業を開始し、現在に至っている。

近年、微生物の研究者は少なくなり、微生物の研究では科研費やその他の助成金を獲得しにくい状況にある。大学や企業ではバイオ分野の研究には流行がある。1970年代までは微生物の研究が全盛期であったが、その後、約15年ごとに遺伝子工学、ゲノム創薬、再生医学(iPS細胞)の順で研究が注目されるようになり、それに伴って微生物の研究がやや下火になったようである。しかし、

2015年には大村 智博士がエバーメクチンの発見とその開発で、2016年には大隅良典博士が酵母を用いたオートファジーの仕組みの解明で、ノーベル生理学・医学賞を受賞され、微生物の研究が再認識されるようになった。

日本はアミノ酸・ヌクレオチドの発酵生産や微生物酵素による物質生産で世界をリードしてきた。コレステロール合成阻害剤スタチン、免疫抑制剤タクロリムス、 α -グルコシダーゼ阻害剤ボグリボースは日本の製薬企業の発酵技術で開発・実用化されており、今後も新規生理活性物質の発見と開発に期待したい。最近ではプロバイオティクスを対象とした腸内細菌の研究が盛んで、新聞やテレビでよく報道されている。また、将来、バイオエネルギーの生産に微生物の利用が期待されている。学術的な観点では、単細胞の微生物は生命の基本単位であり、生命現象を明らかにするためにはモデル生物として大腸菌や酵母などの微生物を用いなければ解決できないことが多い。これまでに自然界から分離培養された微生物は全体の1%以下で、残りのほとんどは難培養微生物と言われている。そこで、難培養微生物を分離培養し、ゲノム解析などを活用することによって微生物の新たな能力を見出すことができれば、微生物の研究と利用が飛躍的に進歩すると思われる。このように微生物学はバイオサイエンスおよびバイオテクノロジーの基本となる重要な分野であり、その研究を財政的に支援することは大きな意義があると考えられる。

大学では国からの運営費交付金は年々減少し、それとともに研究費も減少しており、外部資金として財団法人等の研究助成金を獲得することが必要となってきた。そのためIFOの各種助成の応募件数は年々増加している。IFOは、研究助成事業を開始した2003年度から筆者が常務理事を退任した2017年度までに、研究助成、研究者招聘・留学助成、特定研究助成、一般研究助成、大型研究助成および若手研究者助成で合計367件を採択し、総額18.4億円の助成金を支給した。また、寄付講座助成を開始した2008年度から平成2017年度までに、10件の寄付講座を採択し、総額25億円の助成金を支給した。これらの助成金は有効に活用され、多くの素晴らしい研究成果がでており、助成を受けた研究者と機関から感謝されている。

IFOは、国がやらない、やれないような特色ある研究助成事業にしたいと思っている。例えば、微生物の研究にとって重要であるが、あまり評価されないために科研費などの競争的資金を獲得しにくい基礎研究、特に分類に関する研究に重点的に助成金を支給している。また、選考委員会には、独創的でチャレンジングな研究はもとより、すぐに役に立つ研究よりも20年先に重要な研究を積極的に採択していただくようお願いしている。

何の役に立つかが予測できない研究が採択されてもよいと思う。

今後も、微生物株保存事業で培ってきた精神を生かして研究助成事業を通して微生物の研究の進歩発展に寄与していきたい。その精神とは「微生物をこよなく愛し、大切にすること」である。

筆者がIFOの常務理事として在籍していた14年間には、理事、監事、評議員、顧問のほか、選考委員会、評価委員会、検討委員会、編集委員会、出版委員会等の先生方には多大なるご尽力、ご指導、ご支援を賜った。また、助成研究報告会での座長、助成研究報告集への投稿原稿の査読など、多くの先生方にはたいへんお世話になった。さらに武田薬品の関係者、IFOの事務長、職員、元所員のお蔭で事業を順調に進めることができた。皆様には、心から感謝を申しあげたい。

参考文献

- 1) 長谷川武治 1995. 微生物保存事業とIFO. IFO Research Communications **17**: 9-18.
- 2) 飯島貞二2001. 発酵研究所の歴史. IFO Research Communications **20**: 15-33.
- 3) 長谷川 徹 2014. 発酵研究所の歴史～所長当時を回想して(1990～1995)～. IFO Research Communications **28**: 1-10.
- 4) 竹内昌男 2016. 発酵研究所の活動－発酵研究所を継いだ人たち (1995.4－2001.3)－. IFO Research Communications **30**: 1-16.
- 5) 波多野和徳 2017. 発酵研究所の歴史(5) 微生物株保存事業から研究助成事業への転換－その激動の2年間 (2001.4～2003.3)－. IFO Research Communications **31**: 1-12.
- 6) 鈴木健一郎 2012. 公益財団法人発酵研究所の「震災で被害を受けた微生物株保存機関への支援」に関するご報告. Microbiol. Cult. Coll. **28**: 41.
- 7) 宮寄 厚 2013. 東日本大震災で被害を受けた微生物保存機関への支援を受けて. 生物工学会誌 **91**: 244-246.
- 8) 笠井宏明2013. 希少海洋性アクチノバクテリアの系統保存. IFO Research Communications **26**: 49-60.
- 9) 猪又幸江, 佐藤 航, 笠井宏明 2013. 天然記念物「盛岡石割桜」由来の酵母を使用した東北復興支援「福香（ふくこう）ビール」の開発. 生物工学会誌 **91**: 238-240.
- 10) 坂野 勲 2013. 第7回助成研究報告会の開催. IFO Research Communications **27**: 1-2.
- 11) 中濱一雄 2015. 微生物株の保存とバックアップ～発酵研究所設立当時の理事会議事録から～. 生物工学会誌 **93**: 139-148.
- 12) 中濱一雄 2015. 微生物株の保存とバックアップ～発酵研究所設立当時の理事会議事録から～. IFO Research Communications **29**: 1-9.

第12回助成研究報告会の開催

平成30年6月8日千里ライフサイエンスセンター5階サイエンスホールにおいて第12回助成研究報告会を開催し、2年間の助成を受けた大型研究助成4件の研究成果の口頭発表、5年間の助成を受けた寄付講座助成1件の研究成果の口頭発表、ならびに2年間の助成を受けた一般研究助成33件と若手研究者助成1件の研究成果のポスターによる発表が行われた。参加者は、大学、国公立研究所、企業の研究者、大学院生など総数247名であった（このうち大学院生は30名）。

報告会に先立ち、中濱一雄理事長から挨拶があった。報告会では大型研究助成4件のうち「きこの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」（前川二郎）の1題は左子 芳彦 京都大学大学院農学研究科教授の座長のもと、「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）および「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）の2題は西山 真 東京大学生物生産工学研究センター教授の座長のもと、「木材腐朽のシステム合成生物学への挑戦」（中沢 威人）は福田 雅夫 中部大学応用生物学部教授の座長のもとに口頭発表が行われた。また、寄付講座助成の1題「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）は永井 和夫 東京工業大学名誉教授の座長のもとに口頭発表が行われた。各研究発表に対して活発な討議がなされ、示唆に富んだ意見も出るなど実りのある発表となった。発表の内容は全文が本報告集に収録されている。なお、寄付講座助成の報告は総論1報と各論9報に分けて報告されている。

引き続き一般研究助成33件および若手研究者助成1件はポスター展示による発表がなされた。各ポスターの前で参加者と熱心な質疑が交わされた。さらにこの後行われた懇親会の時間にもお酒を片手にポスターの前で討論する姿が見られて、ポスター発表内容について十分に議論されたようであった。一般助成研究および若手研究者助成の研究結果は本報告集ではページ数の関係で要約のみを掲載したが、当財団ホームページ上に詳細を掲載してあります。

懇親会には報告会参加者のほとんどが参加した。まずは熊谷英彦 理事（石川県立大学学長）の挨拶があり、次いで関 達治 評議員（大阪大学名誉教授）のご発声で乾杯を行った。懇親会では、参加者の間で和やかに歓談が持たれたのに加えて、報告会では十分に出来なかった質疑応答も行われ、また昨年9月で設置期間が終了した東京大学微生物潜在機能探索寄付講座の尾中宏康教授と教員（尾崎太郎、林 昌平、浅水俊平、菅井佳宣の各氏）および本年10月に開設する東京大学 微生物膜輸送工学寄付講座の川崎 寿教授からの挨拶などもあって、異なる分野の研究者の間で賑やかな交換が見られた。今回の報告会および懇親会にも若手の研究者が多数参加され、新旧の研究者の交流の場としても十分役だったものと思われま。参加された皆様のご協力に心から感謝致します。

来年の第13回助成研究報告会は2019年6月7日(金)に同じ会場で開催致します。
以下に報告会、ポスター展示、懇親会の模様の一部を写真で紹介する。

(文) 横田 明

RESEARCH COMMUNICATIONS



開会挨拶
中濱 一雄 理事長



座長 左子 芳彦 先生



座長 西山 真 先生



座長 福田 雅夫 先生



座長 永井 和夫 先生



前川二太郎 氏



渡部 邦彦 氏



高木 博史 氏



中沢 威人 氏



尾仲 宏康 氏

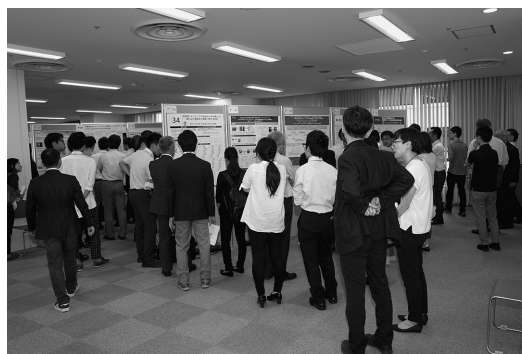


司会
樽井 直樹 常務理事

RESEARCH COMMUNICATIONS



講演会



ポスター発表



挨拶 熊谷 英彦 理事



乾杯 関 達治 評議員



懇親会

平成 28 年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成 28 年 4 月～平成 30 年 3 月

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

〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101

Evaluation of mycelial characteristics in culture as taxonomic criteria and their applications to classification of Basidiomycota

Nitaro Maekawa

Faculty of Agriculture, Tottori University

4-101 Koyama-minami, Tottori 680-8553, Japan

The main purpose of this study was to evaluate as taxonomic criteria anamorphs produced in fungal culture of the subdivision Agaricomycotina (Basidiomycota). The strains of various species preserved in the Fungus/Mushroom Resource and Research Center of Tottori University (FMRC) were observed. In addition, the published literatures on fungal cultures of this subdivision were investigated, and a total of 1,415 species of 442 genera belonging to 81 families of 21 orders were examined for their productivity of anamorphs in culture. Eighty-two species out of 1,415 species examined formed blastoconidia, and the species of Dacrymycetales formed sympodially proliferating conidiogenous cells. *Spiniger*-type anamorph was produced in phylogenetically different genera belonging to Polyporales and Russulales, and its morphological differences were observed among the genera. In addition, annellated conidiogenesis was observed in the limited genera of Auriculariales and Agaricales. On the other hand, the formation of arthroconidia was observed in 179 species, and their secession modes were different depending on the family or genus level, indicating either rhexolytic or schizolytic type. Arthroconidium secession mode of *Ossicaulis* species belonging to Lyophyllaceae (Agaricales) was schizolytic type along with other genera of this family. The arthroconidia of *Ossicaulis* species were significantly different in size from those belonging to other genera. The two cryptic species of the genus *Gloeocystidiellum* in which the morphological differences could not be found between their teleomorphs were different in the productivity of anamorphs in culture. These results suggest that the productivity of anamorphs in culture, their conidiogenesis and morphology are useful for discriminating at the level of family, genus or species.

Key words: Agaricomycotina, arthroconidia, blastoconidia, conidium secession mode, molecular phylogeny

緒言

きのこは、菌類の中で、主に有性胞子を形成する肉眼で識別可能な大きさの組織体（子実体）、あるいはこのような子実体を形成する分類群を指し示す。きのこを形成する多くの分類群は担子菌門（Basidiomycota）のハ

ラタケ亜門（Agaricomycotina）に所属する。これらの分類群の生活環において、有性胞子である担子胞子を形成する子実体（担子器果）は肉眼的および顕微鏡的特徴が多様であるため、主に担子器果（テレオモルフ）の形態形質に基づき分類体系が構築され（Ainsworth *et al.*, 1973）、長年この分類体系による分類が行われてきた。しかし、1990年代から分子生物学的手法による分子系統解析が行なわれるようになり、DNA塩基配列情報に基づきハラタケ亜門の分類体系も大幅に修正されている（Hibbett, 2006）。ハラタケ亜門に含まれる様々な分類群における分子系統解析の結果、本亜門内の各階層におい

E-mail: kin-maek@tottori-u.ac.jp

共同研究者：中桐 昭（鳥取大学農学部）、

早乙女 梢（鳥取大学農学部）、

遠藤 直樹（鳥取大学農学部）

て、新たな分類群が創設され、とくに属および種においては数多くの新分類群が報告されている。また、従来用いられている担子器果の形態形質が種間あるいは属間で有意な差異が認められない隠蔽種あるいは隠蔽属の存在も示唆されているが、多くの分類群において、それらの新種、新属等の分類学的処置はなされていない。また、ハラタケ亜門に所属する菌類には、食用きのこ、生理活性物質や酵素類の生産、植物の生長促進など、遺伝資源として有用な分類群も多く含まれているため、遺伝資源株として多くの菌株保存施設で保存されている（日本菌学会編, 2013; GCOE「持続性社会構築に向けた菌類きのこ資源活用」編集委員会編, 2013）。しかし、種によっては菌株の品質評価・管理に有用な培養的性状に関する情報が欠如している状況にある。

ハラタケ亜門に所属する菌類を培養すると、しばしば培養菌糸体に無性世代（アナモルフ）や嚢状体（シスチジア）等の菌糸とは異なる多様な形態を呈する異形細胞が形成される。Kendrick & Watling (1979) は担子菌門に所属する分類群が形成するアナモルフを分生子形成様式等に基づき分類した。ハラタケ亜門に含まれるヒダナシタケ類（aphyllophoraceous fungi）については、Nobles (1948, 1965), Nakasone (1990) および Stalpers (1978) らによって、アナモルフ形成の有無を含む種の培養的性状の記載および培養的特徴に基づく種の検索表が構築された。ハラタケ目（Agaricales）については、*Hohenbuehelia* 属（Thorn & Barron, 1986）、*Pholiota* 属（Jacobsson, 1989）、*Pleurotus* 属（Stalpers *et al.*, 1991）などのアナモルフが断片的に報告されている。また、Walther *et al.* (2005) は分生子形成様式と担子器果にひだを有する分類群の系統関係との関連性を明らかにし、培養菌糸体に形成されるアナモルフが本目の分類に有用であることを示唆した。しかし、いずれの報告も限られた分類群を対象にしたものであり、培養菌糸体に形成されるアナモルフに関してハラタケ亜門全体を網羅した解析は行われていない。

本研究では、これらの先行研究を基盤として、従来分類形質としてあまり重要視されてこなかった担子器果以外のステージ、とくに無性世代（アナモルフ）に焦点を当て、ハラタケ亜門に所属する分類群のアナモルフの形成の有無、形成様式等について網羅的に解析を行うとともに、これと並行して保有菌株の分子系統解析を行い、培養形質と系統群との関係性を解析することによって、ハラタケ亜門に所属するきのこ類培養菌糸体に形成されるアナモルフ等の分類形質としての評価を行なった。

実験方法

供試菌

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）に保存されているカルチャーコレクション（TUFC）の中から、担子菌門のハラタケ亜門に所属する956種2,500菌株を供試した。供試菌株は二次菌糸体であるが、一部の菌種については一次菌糸体をあわせて用いた。

培養菌糸体の性状調査

供試菌株をマルトエキス寒天平板培地（MA培地）にて20–25℃下3–6週間培養を行なった。菌種によってはModified Melin-Norkrans培地、コーンミール培地等をあわせて用いた。各供試菌株の培養菌糸体について菌叢形態の肉眼的観察を行なった後、微分干渉顕微鏡下で、分生子、異形細胞等の形成の有無を調査するとともに、分生子等の形成が認められた菌株については、その形態的特徴を観察した。また、必要に応じて、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて、分生子の形成および離脱様式について詳細な観察を行なった。さらに、同亜門に所属する種の培養性状に関する文献を抽出し、FMRC保存菌種と合わせて、合計3綱21目81科442属1,415種の培養菌糸体の性状調査を行なった。

走査型電子顕微鏡観察

MA培地で培養した供試菌株の培養菌糸体を、培養基質であるMA培地とともに、およそ5mm角にカミソリ刃で薄く切り出し、SEM観察用試料とした。各試料を2%オスミウム酸溶液に一晩浸漬固定した。固定した試料は、30%エタノールで洗浄後、50、70、80、90、95、100%のエタノールの順に15分間毎に置換し、最後に100%エタノールに2回置換することによって脱水を行った。脱水した試料は、エタノール：酢酸イソアミル（1:1, v/v）の混合液に15分間浸漬した後、100%酢酸イソアミルに15分間2回置換することによって、エタノールを除去した。酢酸イソアミルに置換した試料は試料表面の酢酸イソアミルを除去後、臨界点乾燥装置（JCPD-5, JEOL）を用いて臨界点乾燥を行った。乾燥した各試料はSEM観察用試料台に菌叢面を上にしてSEM用カーボン両面テープで貼付け、Magnetron Sputter（MSP-1S, アルバック機工株式会社）を用いて白金によりコーティングを行った。コーティングした試料は、走査型電子顕微鏡（S-3400N, HITACHI）を用いて、高真空低加速電圧（5kV）モードで観察を行った。

各培養菌糸体からのDNA抽出、PCRおよびシーケンス反応
各供試菌株をMA培地等で培養して得られた菌糸体から、改変CTAB法によりゲノムDNA抽出を行った。得られたゲノムDNAを鋳型とし、核リボソームRNA遺伝子のITS領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。プライマーにはITS1F/ITS4を用いた。PCRの反応条件は、初期熱変性を95℃で2分間行なった後、変性95℃で45秒間、アニーリング50℃で45秒間、伸長70℃で1分間を35サイクル行ない、最終伸長反応を72℃で10分間行なった。PCR増幅産物は、エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動により増幅を確認後、ExoSAP-IT(USB)を用いて精製した。精製後の産物はBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1(Applied Biosystems)を用いてダイレクトシーケンスを行った。シーケンス反応はPCR反応と同様のプライマーを用い、初期熱変性を96℃で1分間行い、変性96℃で10秒間、アニーリング50℃で5秒間、伸長60℃で4分間を25サイクル行なった。反応生成物はエタノール沈殿により精製した後、ABI 3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いてシーケンスを行なった。

分子系統解析

分子系統解析には、本研究で得た塩基配列に加え、FMRCおよびGenBankのデータベースから入手した*Hyphoderma*属種の塩基配列からITS(IT1-5.8S-ITS2)領域を用いた。塩基配列はMEGA7(Kumar *et al.*, 2016)を用いてデータセットを作成し、MAFFT Ver. 7 Online versionを用いてアライメントを行った。その後、最尤法(ML法)に基づきMEGA7を用いて系統樹を作成した。ギャップはmissing dataとして扱い、各枝の信頼性は1,000回反復のブートストラップ値検定により算出した。ブートストラップ値(BP値)は70%以上の枝を信頼性の高い枝とした。アウトグループとして、*Hypochnicium bombycinum*(Sommerf.) J. Erikss.および*Hypochnicium wakefieldiae*(Bres.) J. Erikss.を用いた。

結果および考察

ハラタケ亜門におけるアナモルフ形成種の分布

供試した1,415種の培養菌糸体におけるアナモルフ形成の有無を調査した結果、179種において分節型分生子(arthroconidia)の形成が認められ、82種において出芽型分生子(blastoconidia)の形成が認められた。残りの1,154種においてはこれらアナモルフの形成は認められなかった。また、同亜門に所属する各目の分節型分生子および出芽型分生子の形成種数をTable 1に示した。こ

れらの中で、もっとも多くのアナモルフ形成が認められた目はハラタケ目(Agaricales)であり、調査した432種のうち124種が分節型分生子を、15種が出芽型分生子を形成し、本目供試種全体の32%において分生子形成が認められた。また、もっとも多くの供試種が所属するタマシヨレイタケ目(Polyporales)においても分節型分生子を形成する種と出芽型分生子を形成する種が混在することが明らかとなった。しかし、イグチ目(Boletales)は調査した39種のうち1種において、またキカイガラタケ目(Gloeophyllales)は13種のうち6種において分節型分生子の形成が認められたが、両目の供試種において出芽型分生子を形成する種は認められなかった(Table 1)。一方、アカキクラゲ目(Dacrymycetales)は調査した23種のうち15種において、キクラゲ目(Auriculariales)は17種のうち6種において、またシロキクラゲ目(Tremellales)は8種のうち7種においてアナモルフの形成が認められ、これら3目においてはいずれの種も出芽型分生子を形成した(Table 1)。以上の6目においては、目内で同一の分生子形成様式を示したことから、分生子形成様式が目レベルの判別形質となり得ることが示唆された。また、キクラゲ目の出芽型分生子の形成において、分生子形成細胞の頂部に環紋が観察されたことから(Fig. 1C)、アネロ型の分生子形成様式であることが明らかとなり、本目の判別形質となり得ると考えられる。なお、アカキクラゲ目の1種においては、出芽型分生子に加えて、分節型分生子の形成が観察され、本種アナモルフは多型性であることが明らかとなった。

ハラタケ目におけるアナモルフ形成種の分布

ハラタケ亜門において、アナモルフ形成種がもっとも多く認められたハラタケ目について、科別にアナモルフ形成種の分布および分節型分生子と出芽型分生子の形成種数を調査した(Table 2)。その結果、ハラタケ科(Agaricaceae)、オキナタケ科(Bolbitaceae)およびキシメジ科(Tricholomataceae)においては、分節型分生子を形成する種のみが認められ、またシメジ科(Lyophyllaceae)、ナヨタケ科(Psathyrellaceae)およびモエギタケ科(Strophariaceae)においては、それぞれ1種を除き、すべてが分節型分生子を形成する種であった。これに対して、ガマホタケ科(Typhulaceae)においては、調査した4種はすべて出芽型(アネロ型)分生子を形成する種であった。これらの科においては、培養菌糸体に形成されるアナモルフの形成様式が科の判別形質として有用であることを示唆する。

Table 1 Distribution of conidium producing species in Agaricomycotina.

Class	Order	No. of species examined	No. of species producing conidia	
			Arthroconidia	Blastoconidia
Agaricomycetes	Agaricales	432	124	15
	Atheliales	21	0	0
	Auriculariales	17	0	6
	Boletales	39	1	0
	Cantharellales	27	1	1
	Corticiales	28	3	1
	Geastrales	1	0	0
	Gloeophyllales	13	6	0
	Gomphales	2	0	0
	Hymenochaetales	143	2	2
	Phallales	6	0	0
	Polyporales	446	39	24
	Russulales	167	1	10
	Sebacinales	4	0	0
	Thelephorales	1	0	0
	Trechisporales	37	1	1
Dacrymycetes	Dacrymycetales	23	1	15
Tremellomycetes	Tremellales	8	0	7
Total		1,415	179	82

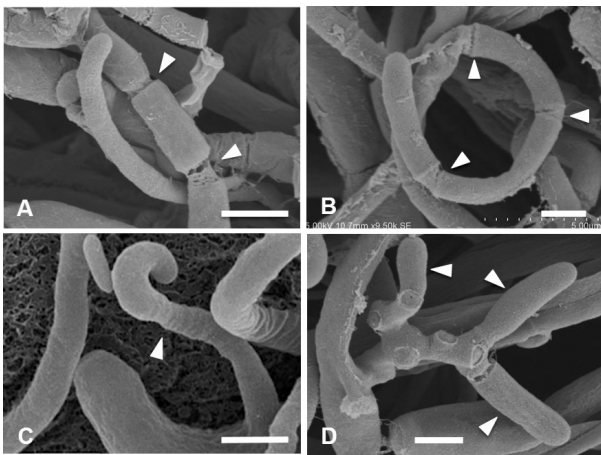


Fig. 1 Anamorphs of Agaricomycotina produced in mycelia. A and B, Arthroconidia of *Hypholoma subviride* (arrowheads: reholytic secession). C, Annellated conidiogenous cell apex (arrowhead) forming C-shaped conidium of *Exidia glandulosa*. D, Conidia (arrowheads) produced on sympodially proliferating conidiogenous cell of *Pholiota aurivella*. Scale bars: A, D=5 μ m; B, C=2 μ m.

分節型分生子の分類形質としての評価

分節型分生子は、多くの種において、直線状に伸長した菌糸の先端細胞に形成されるが (Figs. 1A, 2C), しばしば円状あるいはコイル状に伸長した菌糸先端細胞に形成される. 円状あるいはコイル状の分節型分生子形成菌糸はモエギタケ科 (Strophariaceae) に所属する *Hypholoma* 属種で認められた (Fig. 1B). また、分節型分生子が短く分岐した分生子形成細胞あるいはジグザク状に分岐した分生子形成細胞に形成されるシンポジオ型の形成様式は同科の *Pholiota* 属種において認められた (Fig. 1D). このような形成様式においては、分生子の離脱部に脱落痕が観察された (Fig. 1D). また、シンポジオ型の分生子形成様式はオキナタケ科 (Bolbitiaceae) およびナヨタケ科 (Psathyrellaceae) において、円状あるいはコイル状の分節型分生子形成菌糸はオキナタケ科 (Bolbitiaceae) においても報告されている (Walther *et al.*, 2005). しかし、これら3科以外のハラタケ亜門の科においてはシンポジオ型の分生子形成様式あるいはコイル状の分生子形成菌糸は観察されなかった. これらの

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体系の再検討

Table 2 Distribution of anamorph producing species in Agaricales.

Family	No. of genera examined	No. of species examined	No. of species producing conidia	
			Arthroconidia	Blastoconidia
Agaricaceae	17	40	13	0
Amanitaceae	1	13	0	0
Bolbitaceae	2	11	9	0
Clavariaceae	1	1	0	0
Cortinariaceae	2	2	0	0
Cyphellaceae	2	2	0	0
Entolomataceae	2	6	0	0
Fistulinaceae	3	3	0	1
Hydnangiaceae	1	3	0	0
Hygrophoraceae	1	1	0	0
Hymeogastraceae	5	15	9	0
Inocybaceae	1	1	0	0
Lyophyllaceae	6	12	6	1
Marasmiaceae	10	29	1	2
Mycenaceae	7	46	3	0
Niaceae	2	2	0	0
Omphalotaceae	8	22	1	0
Physalacriaceae	15	34	4	1
Pleurotaceae	2	20	3	2
Plutaceae	1	3	0	0
Porothelaceae	1	1	0	0
Psathyrellaceae	5	37	27	1
Pterulaceae	3	8	2	1
Schizophyllaceae	2	2	0	0
Strophariaceae	6	49	29	1
Tricholomataceae	16	57	12	0
Tubariaceae	1	1	1	0
Typhulaceae	1	4	0	4
Incertae sedis	4	7	4	1
Total	128	432	124	15

結果は分節型分生子の形成菌糸の形状および形成様式がハラタケ亜門の科レベルの分類形質となり得ることを示唆する。

分節型分生子が菌糸から離脱する様式は、破裂型 (rhexolytic secession) と開裂型 (schizolytic secession) の離脱様式に大別される (Cole & Samson, 1979; Walther *et al.*, 2005). そこで、ハラタケ目に所属する科の中で、分節型分生子を形成する供試種が5種以上含まれる7科について、分生子の離脱様式について調査した。その結果、ハラタケ科 (Agaricaceae), オキナタケ科 (Bolbitiaceae), ヒメノガステル科 (Hymenogastraceae) およびシメジ科 (Lyophyllaceae) においては供試種のすべてが開裂型の離脱様式 (Figs. 2A, B) を持つのに対し、ナヨタケ科 (Psathyrellaceae), モエギタケ科 (Strophariaceae) およびキシメジ科 (Tricholomataceae) においては供試したすべての種は破裂型の離脱様式 (Fig. 2D) を示した (Table 3). これらの結果は、分節型分生子の離脱様式もまた科レベルの分類形質として有用であることを示している。なお、シメジ科に所属する *Gerhardtia* sp. においては開裂型であるが、破裂型の離脱様式も観察された (Fig. 2C).

シメジ科における分節型分生子等の分類形質としての評価

Gerhardtia 属, *Hypsizygus* 属および *Ossicaulis* 属において、分節型分生子はいずれの種も直線状菌糸に形成され、開裂型の離脱様式を示した。本研究で供試した *Asterophora lycoperdoides* (Bull.) Ditmar (TUFC 31130) は、分節型分生子の形成が観察されなかったが、本種および *A. parasitica* (Bull.) Singer が分節型分生子を培養菌糸に形成することが Cléménçon (2004) および Durand & Nicot (1968) によって報告されている。また、*Hypsizygus* 属種の培養二次菌糸体において、*H. marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow は分節型分生子を形成するが、

H. ulmarius (Bull.) Redhead は形成しないとされている (長澤・有田, 1988)。しかし、本研究で供試した *H. ulmarius* の二次菌糸体株では旺盛な分節型分生子の形成が観察された。一方、*Lyophyllum* 属および *Leucocybe* 属では供試したいずれの種においても培養菌糸体に分生子の形成は認められなかった。なお、*H. ulmarius* の1菌株においては、分節型分生子に加えて、出芽型分生子の形成が観察された。

Ossicaulis 属に所属する種に分節型分生子のQ値 (長さ/幅) は、*O. lachnopus* (Fr.) Contu が5.4および6.5、*O. lignatilis* (Pers.) Redhead & Ginns が6.5であり、シメジ

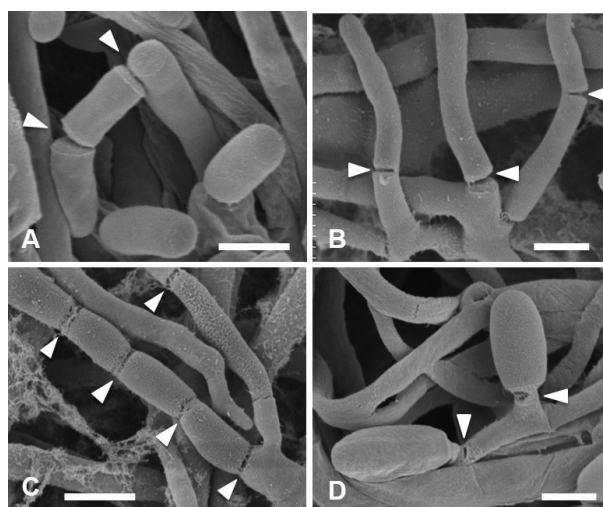


Fig. 2 Scission modes of arthroconidia in Agaricomycotina produced in mycelia. A, *Hyphsizygus marmoreus* (arrowheads: schizolytic secession). B, *Sistotremastrum niveocreum* (arrowheads: schizolytic secession). C, *Gerhardtia* sp. (arrowheads: rhexolytic secession). D, *Pholiota adiposa* (arrowheads: rhexolytic secession). Scale bars: A–D=5 μ m.

Table 3 Scission modes of arthroconidia in families of Agaricales.

Family	No. of species examined	No. of species with	
		Rhexolytic secession	Schizolytic secession
Agaricaceae	13	0	13
Bolbitiaceae	9	0	9
Hymenogastraceae	9	0	9
Lyophyllaceae	6	1	6
Psathyrellaceae	26	26	0
Strophariaceae	23	23	0
Tricholomataceae	12	12	0

科の *Hypsizygus marmoreus* (Q 値:2.6), *H. ulmarius* (Q 値:3.0), *Gerhardtia* sp. (Q 値:2.1, 2.2) と比較して明らかに大きく, また分節型分生子は有意に長い値を示した (Fig.3). さらに, モエギタケ科 (Strophariaceae) に所属する *Hypholoma lateritium* (Schaeff.) P. Kumm. (Q 値:2.4), *H. subviride* (Berk. & M.A. Curtis) Dennis (Q 値:2.1, 2.4, 2.4), *Pholiota adiposa* (Batsch) P. Kumm. (Q 値:2.7), *P. aurivella* (Batsch) P. Kumm. (Q 値:2.6), コウヤクタケ科に所属する *Punctularia atropurpurascens* (Berk. & Broome) Petch (Q 値:1.9), フサタケ科 (Pterulaceae) に所属する *Deflexula fascicularis* (Bres. & Pat.) Corner (Q 値:2.7), およびヒドノドン科 (Hydnodontaceae) に所属する *Sistotremastrum niveocre-mum* (Höhn. & Litsch.) J. Erikss. (Q 値:3.0) のいずれの分節型分生子よりも *Ossicaulis* 種の Q 値は大きく, 本属種の分節型分生子は有意に長いことが明らかになった (Fig.3). したがって, *Ossicaulis* 属においては培養菌糸体に形成される分節型分生子の長さが他属との判別形質になり得ると考えられる. また, 本属の分節型分生子形成能を調査した結果, *O. lachnopus* および *O. lignatilis* とともに供試したすべての一次菌糸体において分節型分生子の形成が認められた (Table 4). 一方, 二次菌糸体においては, 両種ともに一部の菌株においてのみ,

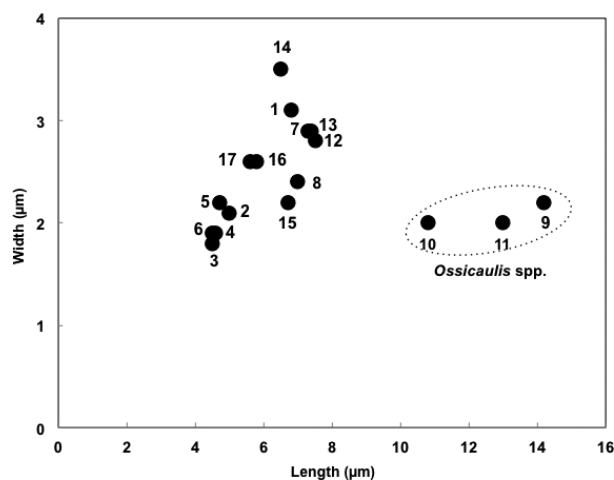


Fig. 3 Size of arthroconidia produced by agaricomycetous fungi produced in culture. Each plot represents following species: 1, *Deflexula fascicularis*; 2, *Hypholoma lateritium*; 3–6, *Hypholoma subviride*; 7, *Hypsizygus marmoreus*; 8, *Hypsizygus ulmarius*; 9 and 10, *Ossicaulis lachnopus*; 11, *Ossicaulis lignatilis*; 12, *Pholiota adiposa*; 13, *Pholiota aurivella*; 14, *Punctularia atropurpurascens*; 15, *Sistotremastrum niveocre-mum*; and 16 and 17, *Gerhardtia* sp.

Table 4 Production of arthroconidia in monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ossicaulis* spp.

Species	Strain number (TUFC)	Arthroconidium production	
		Monokaryotic mycelia	Dikaryotic mycelia
<i>O. lachnopus</i>	11955	ND	+
	12735	ND	+
	32868	ND	–
	100916	+	–
	100998	+	–
	100999	+	–
	101000	ND	–
	101097	+	–
<i>O. lignatilis</i>	31645	ND	–
	31823	ND	–
	32113	+	–
	32307	+	+
	101001	+	–
	101002	+	–
	101101	ND	+

+: arthroconidia observed. –: arthroconidia not observed. Conidium production was examined after 3 weeks incubation at 20–25°C.

ND: not examined.

分節型分生子が観察された (Table 4). これら2種においては、一次菌糸体では安定的に分生子が形成されるが、二次菌糸体では分生子形成能が低下することが示唆された。そこで、*O. lachnopus* の和合性が認められている一次菌糸体2菌株の分節型分生子の形成量とそれらの交配によって得られた二次菌糸体 (交配株) の分節型分生子の形成量とを比較した。その結果、*O. lachnopus* の二次菌糸体 (交配株) の分生子形成量は、それらの親株である一次菌糸体の形成量に比べて明らかに減少した (Fig. 4). これらの結果は、*Ossicaulis* 属種の培養菌糸体における分節型分生子の形成能が二次菌糸体において低下することを示すものであり、本属種に分生子形成能の評価においては一次菌糸体を用いるのが妥当である。また、このような現象が他の分類群でも生じるのかについては、今後より多くの分類群について一次菌糸体と二次菌糸体との分生子形成能の比較調査が必要である。

Asterophora lycoperdoides は培養菌糸体に無色から淡褐色を呈し、表面が明瞭な突起によって被われた厚壁細胞 (chlamydo-spores) を形成する (Fig. 5A). これに対して、*A. parasitica* は平滑な厚壁胞子を形成することが報告されている (Thompson, 1936). *A. lycoperdoides* に見られる特徴ある厚壁胞子は、他の分類群の培養菌糸体では報告されていないため、本種の判別形質として有用である。しかし、*A. mirabilis* (T.W. May) Redhead & Seifert は *A. lycoperdoides* と同形の厚壁細胞を担子器果上に形成することが報告されているため (May & Fuhrer, 1995; Blanco-Dios, 2011), *A. mirabilis* の培養菌糸体における本厚壁胞子の産生の有無について、今後調査する必要がある。

出芽型アナモルフの分類形質としての評価

ベニタケ目、ウロコタケ科 (Stereaceae) に所属する

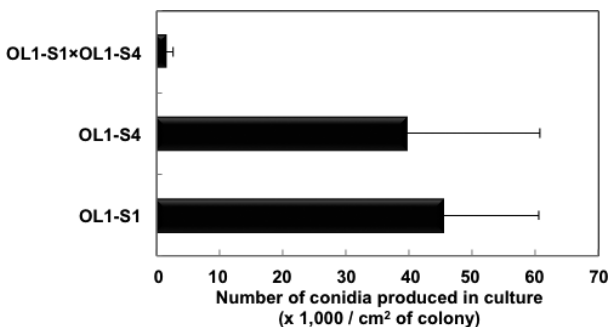


Fig. 4 Productivity of arthroconidia of monokaryotic and dikaryotic mycelia in *Ossicaulis lachnopus*. OL1-S1 × OL1-S4 represents a dikaryotic strain arisen from mating between OL1-S1 and OL1-S4.

Gloeocystidiellum sp. (TUMH61421) は、*Gloeocystidiellum porosum-clavuligerum* complex (Larsson & Hallenberg, 2001; Larsson, 2002) に所属し、類似種の *G. clavuligerum* (Höhn. & Litsch.) Nakasone 等とは形態的特徴において判別が困難な隠蔽種である。しかし、*Gloeocystidiellum* sp. (TUMH61421) の培養菌糸体の菌叢は紛状を呈し、倒卵形で小型の出芽型分生子と棍棒形で大形の出芽型分生子を旺盛に形成する特徴を有する。一方、*G. porosum-clavuligerum* complex に所属する他の種の培養菌糸体はいずれも綿毛状であり、培養菌糸体に出芽型分生子の形成は認められなかった。これらの結果は、テレオモルフの特徴では類似種との種判別が困難な本種において、培養菌糸体に形成される菌叢形態およびアナモルフ形成の有無が有用な種の判別形質になり得ることを示している。

Spiniger 型アナモルフは、分生子形成細胞の頂部が球形あるいは不定形に肥大し、肥大部表面に多数の小突起が生じ、出芽型分生子はこれら小突起の先端に各1個形成されることによって特徴付けられる (Figs. 5B, C). このような *Spiniger* 型アナモルフを培養菌糸体に形成する種はハラタケ亜門のタマチョレイタケ目 (Polyporales) およびベニタケ目 (Russulales) のみに認められた。タマチョレイタケ目においては、*Hyphoderma* 属に所属す

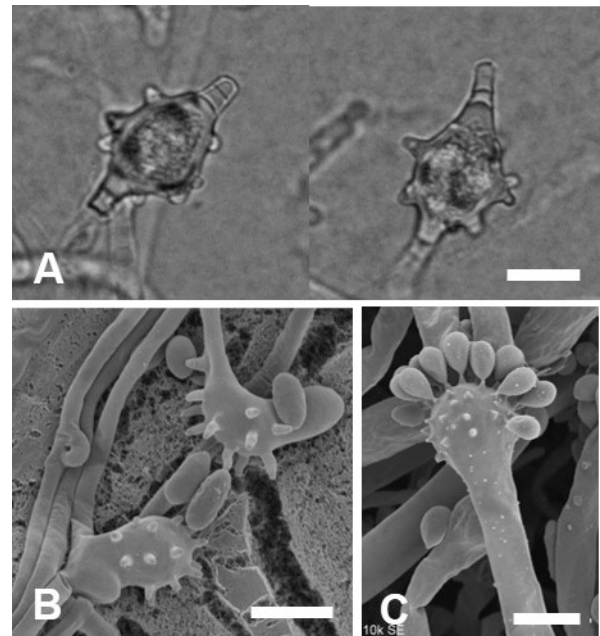


Fig. 5 Chlamydo-spores and *Spiniger*-type anamorphs produced in cultural mycelia. A, Chlamydo-spores of *Asterophora lycoperdoides*. B, *Spiniger*-type anamorph of *Hyphoderma microcystidium*. C, *Spiniger*-type anamorph of *Heterobasidium irregulare*. Scale bars: A, B = 10 μm; C = 5 μm.

る *H. heterocystidia* (Burt) Donk, *H. mutatum* (Peck) Donk, *H. populneum* (Peck) Donk および *Hyphoderma* sp. (TUFC 34078) で形成され、いずれの種も分生子形成細胞の頂部は不定形であった (Fig.5B). これら4種以外に供試した *Hyphoderma* 属 19種の培養菌糸体に、*Spiniger*型アナモルフの形成は観察されなかった. さらに、ITS領域を用いた最尤法による系統樹において、これら4種は高いブートストラップ値 (96%) でクレ-

ドを形成した (Fig.6). また、Parmasto (1968) は *Hyphoderma* 属内に3つの節を設け、そのうちの1つを *Mutatoderma* 節とした. *Mutatoderma* 節は子実体中に結晶を被る隔壁を形成しないシスチジアを有することにより特徴付けられる. その後、Gómez & Loewenbaum (1976) は、本節を *Mutatoderma* 属とし、*H. heterocystidia*, *H. mutatum* および *H. populneum* を *Mutatoderma* 属に転属した. しかし、分子系統解析の結果 (Fig.6),

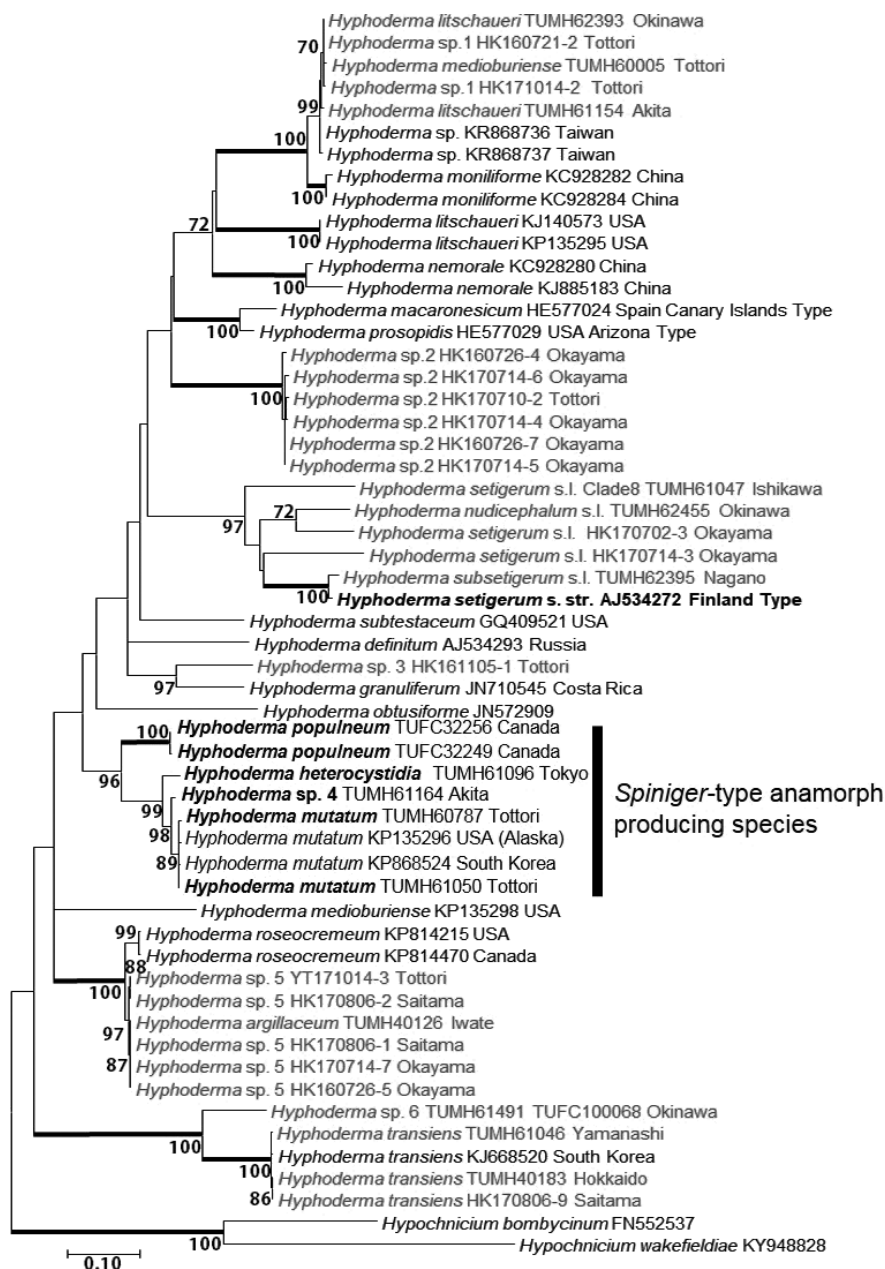


Fig. 6 Maximum likelihood tree based on ITS rDNA of *Hyphoderma* species. Bootstrap values (>70%) from Maximum Likelihood (ML, BS) are indicated at nodes.

Mutatoderma 属は *Hyphoderma* 属に内包されたことから、*Hyphoderma* 属が多系統であり、本属の属レベルの分割の必要性が示唆された。*Hyphoderma* 属の再分類においては、培養菌糸体における *Spiniger* 型アナモルフの形成の有無が属の重要な判別形質になり得ると考える。一方、ベニタケ目では、*Bondarzewia* 属、*Heterobasidion* 属および *Laurilia* 属種において、*Spiniger* 型アナモルフの形成が認められた。*Spiniger* 型アナモルフを形成する4属は、分子系統解析において、それぞれ系統的に異なる単系統群として認められた。これら4属は供試したMA培地、コーンミール培地およびキャロット培地のいずれにおいても *Spiniger* 型アナモルフを形成し、各々の属が形成する *Spiniger* 型アナモルフは培地間での形態的差異が無く、形態的特徴に変異は認められなかった。さらに、4属が形成する *Spiniger* 型アナモルフを比較検討したところ、分生子の形状と表面構造の違いおよび分生子形成細胞の形状によって、4属の判別は可能であることが明らかとなった。したがって、ベニタケ目に所属する *Bondarzewia* 属、*Heterobasidion* 属、*Laurilia* 属およびタマシヨレイタケ目に所属する *Hyphoderma* 属が培養菌糸体に形成する *Spiniger* 型アナモルフは、これら4属の判別形質となり得ることが示唆された。

本研究において、ハラタケ亜門の分類形質として従来あまり重要視されてなかった培養菌糸体に形成されるアナモルフに焦点を当て判別形質としての評価を行った結果、培養菌糸体におけるアナモルフの形成の有無、形成様式および形態が、分類群によっては、科、属あるいは種の判別に有用であることが示唆された。今後、さらに多くの属・種の培養菌糸体におけるアナモルフ形成の有無、アナモルフ形態、分生子形成様式を調査し、どの分類階級（ランク）における何れの分類群において、これらの形質が分類形質として有用であるかを評価する必要がある。分類形質としての有用性の評価に際しては、対象とする分類形質について、分類形質としての安定性および適用できる分類階級・分類群を分子系統解析により検証することが不可欠である。

要 約

本研究では担子菌門ハラタケ亜門に所属する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。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、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、ハラタケ亜門に所属する3綱21目81科442属1,415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1,415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ベニタケ目およびタマシヨレイタケ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いずれかを示した。ハラタケ目の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、テレオモルフにおいて形態的差異が見出せないベニタケ目のウロコタケ科に所属する *Gloeostidiellum porosum-clavuligerum* complex 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、判別可能な種があることが明らかとなった。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。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 小林崇人, 早乙女梢, 中桐昭, 前川二太郎. 2016. *Gloeocystidiellum porosum* 様子実体を形成する担子菌の分類学的検討. 日本菌学会第60回大会. 9月16-18日, 京都.
- 志野遼太郎, 早乙女梢, 遠藤直樹, 前川二太郎, 中桐昭. 2017. *Spiniger* 型アナモルフを持つ担子菌の系統位置と分生子形成の分類学的及び生態学的意義. 第2回環境微生物学会合同大会. 8月29-31日, 仙台.
- Shino, R., Sotome, K., Endo, N., Maekawa, N. & Nakagiri, A. 2017. Systematic position of basidiomycetes forming *Spiniger*-type anamorph and taxonomic and ecological significance of the conidial formation. The 14th International Joint Symposium between Korea and Japan. 8-9 November, Fukuoka, Japan.
- 前川二太郎, 奥田雄大, 遠藤直樹, 早乙女梢, 中桐昭. 2018. シメジ科菌類の培養菌糸体が形成する分節型分生子の分類形質としての評価. 日本菌学会第62回大会. 5月25-27日, 長野.
- 砂川直徹, 遠藤直樹, 早乙女梢, 前川二太郎, 中桐昭. 2018. 異担子菌類のアナモルフの多様性とその分類学的・生態学的意義. 日本菌学会第62回大会. 5月25-27日, 長野.
- 志野遼太郎, 早乙女梢, 前川二太郎, 遠藤直樹, 中桐

- 昭. 2018. 水辺の材上に分生子柄束様構造を形成する担子菌の構造と生態. 日本菌学会第62回大会. 5月25-27日, 長野.
- 7) 志野遼太郎, 早乙女梢, 遠藤直樹, 前川二太郎, 中桐昭. 2018. 担子菌培養株で形成されるアナモルフの分類形質としての意義. — *Spiniger*型アナモルフを持つ担子菌について —. 日本微生物資源学会第25回大会. 6月13-15日, 函館.

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鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センターの上田祥子技術補佐員ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. (eds) 1973. The Fungi. An advanced treatise. Vol. IVB. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. Academic Press, New York.
- Blanco-Dios, J.B. 2011. *Asterophora salvaterrensis* (Basidiomycota, Agaricales), a new species from Galicia (Spain). *Mycotaxon* **118**: 83-88.
- Cléménçon, H. 2004. Cytology and plectology of the Hymenomycetes. J. Cramer, Berlin.
- Cole, G.T. & Samson, R.A. 1979. Patterns of development in conidial fungi. Pitman, London.
- Durand, F. & Nicot, J. 1968. Les chrapignons fongicoles. Observations sur les *Nyctalis*. *Rev. Mycol.* **33**: 96-107.
- GCOE「持続性社会構築に向けた菌類きのご資源活用」編集委員会編 2013. 菌類きのご遺伝資源, 発掘と活用. 丸善プラネット, 東京.
- Gómez, C.E. & Loewenbaum, M. 1976. Mutatoderma (Parmasto) C. Gómez, un nuevo género de Corticiaceae (Basidiomycetes). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **17**: 345-352.
- Hibbett, D.S. 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* **98**: 917-925.
- Jacobsson, S. 1989. Studies on *Pholiota* in culture. *Mycotaxon* **36**: 95-145.
- Kendrick, B. & Watling, R. 1979. Mitospores in Basidiomycetes. In *The whole fungus* (vol. 2.), Kendrick, B. (ed), p. 473-545, the National Museums of Canada, Ottawa.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870-1874.
- Larsson, E. 2002. Phylogeny of corticioid fungi with russuloid characteristics. Botanical Institute, Göteborg University, Göteborg.
- Larsson, E. & Hallenberg, N. 2001. Speies delimitation in the *Gloeocystidiellum porusum-clavuligerum* complex inferred from compatibility studies and nuclear rDNA sequence data. *Mycologia* **93**: 907-914.
- May, T.W. & Fuhrer, B.A. 1995. *Nyctalis mirabilis* (Fungi, Agaricales), a new species from Australia. *Muelleria* **8**: 385-390.
- 長澤栄史, 有田郁夫. 1988. *Hypsizygus ulmarius* (シロタモギタケ) および *H. marmoreus* (ブナシメジ) について. 菌蕈研究所研究報告 **26**: 71-78.
- Nakasone, K.K. 1990. Cultural studies and identification of wood-inhabiting Corticiaceae and selected Hymenomycetes from North America. J. Cramer, Berlin.
- 日本菌学会編. 2013. 菌類の事典. 朝倉書店, 東京.
- Nobles, M.K. 1948. Studies in forest pathology VI. Identification of cultures of wood-rotting fungi. *Can. J. Res.* **26**: 281-431.
- Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* **43**: 1097-1139.
- Parmasto, E. 1968. Conspectus systematis corticiacearum. Institutum Zoologicum et Botanicum, Academiae Scientiarum R.P.S.S., Estonicae, Tartu.
- Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol.* **16**: 1-248.
- Stalpers, J.A., Seifert, K.A. & Samson, R.A. 1991. A revision of the genera *Antromycoopsis*, *Sclerostibum*, and *Tilachlidiopsis* (Hyphomycetes). *Can. J. Bot.* **69**: 6-15.
- Thompson, G.E. 1936. *Nyctalis parasitica* and *N. asterophora* in culture. *Mycologia* **28**: 222-227.
- Thorn, R.G. & Barron, G.L. 1986 *Nematoctonus* and the tribe Resupinateae in Ontario, Canada. *Mycotaxon* **25**: 321-453.
- Walther, G., Garnica, S. & Weiß, M. 2005. The systematic relevance of conidiogenesis modes in the gilled Agaricales. *Mycol. Res.* **109**: 525-544.

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
〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町1-5

Elucidation of the relation between membrane vesicles exfoliated by a thermophilic bacterium and secretory protease complex assemblies, and challenge for their application

Kunihiko Watanabe

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University,
Kyoto 606-8522, Japan

This project focuses on “membrane vesicles” exfoliated from the outer membrane of *Meiothermus ruber* H328. This strain was screened from Arima Hot Spring, Kobe, Japan, and has been found to produce protease complex assemblies that degrade keratin, one of the major proteins in feathers. Two methods preparing for the assemblies and membrane vesicles were developed; Method 1 mainly consisted of ultrafiltration with a membrane filter for higher-weight molecules and a size-exclusion chromatography with Sephacryl S-1000, followed by sucrose density gradient (0-60 %) ultracentrifugation. Two keratinolytic active fractions were separated by the method; one fraction containing membrane vesicles produced by the strain H328 and associated with keratinolytic activity (SU-AF in Peak 1 fraction), and the other fraction containing the assemblies of keratinolytic protease complex (Peak 2 fraction). Membrane vesicles most likely included the assemblies in the bilayer of the membrane and those structures were confirmed by electron microscopy (TEM) analysis. Furthermore, one serine peptidase (Protein B, MrH_874) responsible for keratinolytic activity and its accessory protein (Protein A, MrH_873) were simultaneously identified in MALDI-TOF/MS/MS analysis by use of the information on the whole genome of the strain H328. Their localization in membrane vesicles and the assemblies of keratinolytic protease complex was shown by immunoelectron microscopy analysis. Method 2 was developed for quantitative analysis of membrane vesicles, utilizing a fluorescent dye DiI. To enhance the productivity of membrane vesicles in the strain H328, a heat shock protein *degP* gene was selected from the genome and knocked out in the strain H328. The method clarified that the deletion of *degP* gene in the strain H328 caused four to five-fold increase in their productivity at 60 °C as compared at 55 °C. Candidates for scaffold proteins in membrane vesicles of *M. ruber* H328 were searched and three proteins were finally selected.

Key words: membrane vesicle, protease, Gram-negative bacterium, keratin, assembly

緒 言

細菌が、酵母の出芽のように細胞表層から放出する小胞を“membrane vesicle”と呼び、これを和訳したものを「膜小胞」と言う（渡部, 2014；渡部, 2015）。この研

究の中で、重要なキーワードは「膜小胞」である。当初は、グラム陰性細菌の外膜から膜小胞が放出されることから外膜小胞（outer membrane vesicle (OMV)）と称されることが多かった。ところが昨今の総説では（Kulp & Kuehn, 2010; Brown *et al.*, 2015）、グラム陽性細菌にも膜小胞が存在することが報告されて以来（Dorward & Garon, 1990）、外膜由来に限定せず広く呼ばれ、“extracellular vesicle”と称されることもある。歴史的には半世紀以上前から、似た報告があった（Bladen &

E-mail: kwatanab@kpu.ac.jp

共同研究者：増村威宏（京都府立大学大学院生命環境科学研究科）、
川崎一則（産業技術総合研究所健康科学部門）

Waters, 1963; Knox *et al.*, 1966). しかし実際に細菌細胞より小さい膜小胞に出会って初めてこれらの研究を知るに至ったというのが筆者の場合で、その存在を教えてくれたのは、神戸市北部の有馬温泉泉源からスクリーニングされた好熱性細菌 H328 株である。単離された当初は、ここまで貴重な研究材料になるとは思っていなかった意外な菌株であり、異分野の技術を持つ研究者との共同研究の重要性を、改めて印象付けてくれた菌株でもある。

当初 H328 株は、エラスチンという不溶性タンパク質を強力に分解することでスクリーニングされて来た。長桿菌で、赤い色素を出すコロニー形態、そして 16S rRNA 遺伝子配列から、*Meiothermus ruber* と同定した。好熱性細菌としては、至適生育温度が 50–60°C で、*Thermus* 属細菌が軒並み 70°C 以上 (Brock & Freeze 1969) であることと比べると見劣りがする。そのためこの属は、当初は *Thermus* 属で報告・提案されたものの、「劣る」という意味の接頭語 *Meio* をつけた *Meiothermus* 属が新たに設定されている (Nobre *et al.*, 1996)。微生物分解が難しい不溶性タンパク質を分解するなら、産業廃棄物のトリ羽毛も分解するかも知れないという単純な着想から、培養に工夫を加えてトリ羽毛を分解することを示し、本研究につながっている (Matsui *et al.*, 2009)。引き続き研究の常套ステップとして、トリ羽毛の主成分であるケラチンタンパク質を分解する強力なプロテアーゼの研究へと進んで行ったわけであるが、「膜小胞」との出会いはそのからスタートする。

本研究では、最初に H328 株が産生するケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製の検討とフリーズフラクチャーレプリカ法による電子顕微鏡 (電顕) 解析、次いで蛍光色素を用いた膜小胞の簡便な定量法の検討、そして膜小胞産生の量的コントロールとして *degP* 遺伝子破壊による効果を、質的コントロールとして膜小胞表面提示のための足場タンパク質の検討を報告する。

実験方法

細菌株と培養

本研究では、神戸市北部の有馬温泉泉源から単離した *Meiothermus ruber* H328 株を用いた (Matsui *et al.*, 2009)。16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (1,412bp) が、同種の基準株 DSM 1279^T と 99.9% という高い相同性を有する他、生育温度帯、赤い色素産生能、糖資化性などの共通点を有する。本菌株は、エラスチンなどの不要性タンパク質を強力に分解する特徴を持つことでスクリーニングされてきた。本研究で用いた基本培地として、YS 培地 (0.5% (w/v) 酵母エキス, 0.5% (w/v) ショ糖 (pH8.0)) およびこれにトリ羽毛 (3% (w/v)) を加える場合には、0.5%

CaCO₃ も添加した。培養は、2L 三角フラスコ中、200ml の培地を含み、55 または 60°C で好氣的にロータリーシェーカーで振とう (180rpm) させて行った。

ケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製の検討

基本的には、以前の論文 (Kataoka *et al.*, 2014) の方法に従って調製した。即ち H328 株を、トリ羽毛を添加した培地で 60°C、2 ないしは 3 日間培養した後、遠心で細菌細胞とトリ羽毛分解残渣を取り除いて得られた上清を、限外ろ過濃縮機 (Tangential Flow Filtration (TFF) System, 排除限界ポアサイズ 0.03 μ m (500kDa に相当), ミリポア社) で約 1/30 にまで濃縮した。得られた濃縮液を、巨大分子量用ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000, 排除限界分子量 1 \times 10⁸Da) にかけて、分子量の異なる 2 つの画分 (高分子側, Peak 1 画分; 低分子側, Peak 2 画分) に分けた。高分子側 Peak 1 画分を、シヨ糖密度勾配 (0–60% (w/v)) の超遠心 (4°C, 4h, 116,000 x g) にかけて、その後 0.5ml ずつ回収し、活性、タンパク質量、電子顕微鏡解析を行った (Fig.1, Method 1)。超遠心は、日立工機 himac CP65 β , 同社スイングローター P28S2 を用いて行った。

透過型およびフリーズフラクチャーレプリカ法による電子顕微鏡 (電顕) 解析

上記の方法に従って調製された Peak 1 画分と Peak 2 画分に含まれる構造体 (膜小胞) の外形の様子を調べるために、試料を常法によって 1% 酢酸ウラニルでネガティブ染色し、透過電子顕微鏡 (FEI 社, Tecnai G2 F20) による観察を行った。

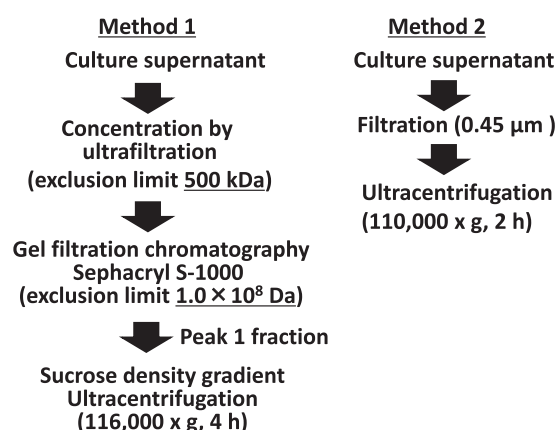


Fig. 1 Preparation methods for the keratinolytic protease fraction containing membrane vesicles from *M. ruber* H328. Method 1, basic method that was employed in our previous report (Kataoka *et al.*, 2014); Method 2, simple method for quantitative analysis by use of a fluorescent dye, DiI.

さらに Peak 1 画分, ショ糖密度勾配超遠心後のケラチン分解活性のある画分(ショ糖密度 35–50%, 以降「超遠心活性画分」(SU-AF))と活性のない画分(ショ糖密度 10%未満, 以降「10%未満画分」(10LF))に対して, フリーズフラクチャーレプリカ法を実施した. 液体ヘリウムによる急速冷凍後, 凍結試料をフリーズフラクチャー装置 (BAF400D, Balzers 社) の真空チャンバー内の冷却試料台に設置して, -110°C で試料をナイフで切断した. 試料を回転させながら, 露出した切断面に白金を蒸着 (約 6.5mm 厚) してレプリカ膜を作製し, 補強のためカーボン蒸着 (約 25mm 厚) させた. フリーズフラクチャー装置から取り出した試料を, 塩素系漂白剤そして希硫酸による付着物の除去を行った後, コロジオンを張った電顕用グリッド (銅, 150mesh) の上にレプリカ膜を回収した. そのグリッドを透過型電子顕微鏡を用いて加速電圧 200kV にて観察した.

H328 株菌体に対する電顕解析 (TEM) は, 以前に示した方法に準拠して実施した (Yamaoka *et al.*, 2014).

膜小胞に含まれるケラチン分解性プロテアーゼの同定と局在性の検討

ケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製により分画された 2 つ (Peak 2 画分と超遠心活性画分) に対し, SDS-PAGE 電気泳動を行い, クマジーブリリアントグリーンで染色, 脱色後, 解析したいバンドを切り出し, 抽出したタンパク質に対し, 還元, アルキル化を行った. その後, トリプシンまたはリジルエンドペプチダーゼによる消化酵素処理を行い, Mono Tip miniC18 を用いて脱塩, トリフルオロ酢酸 (TFA, 0.1% (w/v)), アセトニトリル (60% (w/v)) による溶解の後, MALDI-TOF/MS/MS 解析にかけた (AXIMA Performance, 島津製作所). 得られたデータと H328 株の全ゲノム情報 (Inada & Watanabe, 2013) を照合することで, ケラチン分解性プロテアーゼの同定を行った.

同定された Protein A (MrH_873) および Protein B (MrH_874) の局在性の確認は, Peak 1 画分, Peak 2 画分, 超遠心活性画分, そして 10% 未満画分の 4 つの画分に対して, 直接グリッド (ニッケル, 100mesh) に各サンプルを載せ, グルタルアルデヒド (1% (w/v)) で固定後, 免疫電子顕微鏡解析により行った. 基本的な方法は, 以前の報告に従って行った (Saito *et al.*, 2012; Sasou *et al.*, 2016). 用いた 1 次抗体は, Protein A および Protein B の組換え体タンパク質を, 大腸菌 BL21 (DE3) と発現プラスミド pET11a を利用して大量発現後精製し, これを抗原にして Protein A 抗体はウサギから, Protein B 抗体はマウスから調製した. 2 次抗体は, Protein A 抗体に対しては, 5nm 金コロイドで標識した抗ウサギ IgG ヤ

ギ抗体, Protein B 抗体に対しては, 15nm 金コロイドで標識した抗マウス IgG ヤギ抗体を用いた. ネガティブ染色は, 酢酸ウラニル (2% (w/v)) を用いた.

蛍光色素を用いた膜小胞の簡便な定量法

膜小胞の産生能を培養上清に対して簡便に定量するため, 上記の調製法ではなく, 次に示す方法で行った (Fig. 1, Method 2). トリ羽毛を添加した培地で 60°C , 2, 4, 6 日間培養した後, 各 25ml 抽出し遠心 ($5,800 \times g$, 10 分を 2 回) で除菌とトリ羽毛分解残渣を取り除いて上清を得た. これを, $0.45\mu\text{m}$ のフィルターにかけ, 得られたろ液を超遠心 ($110,000 \times g$, 2 時間) にかけ, 沈殿を 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) $500\mu\text{l}$ に再懸濁し, 膜小胞サンプルとした. これに, 蛍光色素 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) を最終濃度 $5\mu\text{M}$ になるように加え, 37°C で 1 時間反応後, 励起波長 550nm, 測定波長 570nm で蛍光測定を行った.

膜小胞産生の量的コントローラー *degP* 遺伝子破壊による効果

H328 株における *degP* 遺伝子の検索は, H328 株ゲノム情報を基に, 大腸菌 *degP* 遺伝子との相同性 (BLASTP 検索), 局在性, 転写プロモーターの存在について最上位のものを選択した. *degP* 遺伝子破壊株の作成は, *Thermus thermophilus* の相同組換えの方法 (Hashimoto *et al.*, 2001) に準じて行い, 遺伝子破壊を目指す遺伝子の 5' 上流, 3' 上流, それぞれ約 1kb を PCR で断片作製後, カナマイシン耐性遺伝子を両断片の間に挟み込んでプラスミドを構築し, H328 株ゲノムとの間で相同組換えを行わせた. それをカナマイシン耐性でスクリーニングし, 最終的には候補株のゲノムに対して PCR で遺伝子破壊を確認した.

膜小胞表面提示のための足場タンパク質の検索

これまで別途膜小胞を調製する過程のサンプルについて MALDI-TOF/MS/MS 解析を行い, H328 株のゲノム情報 (Inada & Watanabe, 2013) と照合してきた. この照合作業により選択されてきたタンパク質を中心に, 膜タンパク質探索ソフトウェア TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) およびグラム陰性細菌タンパク質に特化した PSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>) により, 候補タンパク質を検索した.

結 果

当初は *M. ruber* H328 株が産生する細胞外のケラチン分解性プロテアーゼを研究するため, これまでの生化学

的手法を駆使して、常套的な精製手段を施してみた。ところがいずれの方法も顕著な効果がなく、研究が立ち往生した状態であった。このプロテアーゼが 10^6 Daをはるかに超える巨大分子量を取り、まるでプロテアソーム様の挙動が認められていたため、排除限界分子量が大きく、大量の培養上清の限外ろ過を可能にする装置TFF systemと、ウイルスやプラスミド精製用のゲルろ過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000) の採用が、進展を後押ししてくれた。

ケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製の検討

限外ろ過濃縮 (TFF system) 後のゲルろ過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000) で2つの画分 (Peak 1画分とPeak 2画分) に分かれた (Fig.2)。この結果は以前若干異なる調製法で行われた時と類似のものであった (Kataoka *et al.*, 2014)。得られた2つの画分のうち、前者が高分子側、後者が低分子側であるが、限外ろ過を分画分子量 500kDa で実施しており、Peak 2画分でも相当の分子量を有すると考えられた。このうち高分子側のPeak 1画分については、シヨ糖密度勾配 (0–60% (w/v)) の超遠心をかけ、その後 0.5ml ずつ分画して回収し、シヨ糖濃度に応じたケラチン分解活性とタンパク質量を調べた。その結果、ケラチン分解活性は、シヨ糖密度 35–50% にあり、シヨ糖密度 10% 以下の画分には活性が見られないもののタンパク質の存在が確認された。このことから、ゲルろ過クロマトグラフィーにより得られた

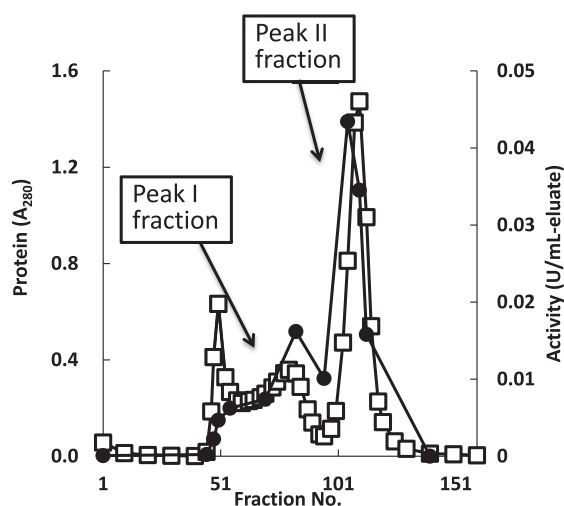


Fig. 2 Elution pattern of the keratinolytic protease fraction containing membrane vesicles from *M. ruber* H328 on Gel filtration chromatography Sephacryl S-1000.

●, keratinolytic activity (U/ml-eluate)

□, protein concentration (A₂₈₀)

Peak 2画分、そしてPeak 1画分をもとにシヨ糖密度勾配超遠心で得られた活性を示した画分 (超遠心活性画分) と活性のない画分 (10%未満画分) の3つについて中心的に以後の調査を行った。

透過型およびフリーズフラクチャーレプリカ法による電顕解析

上で得られた3つの画分について (Peak 2画分、超遠心活性画分、そして10%未満画分)、電顕解析 (TEM) を行った (Fig.3)。Peak 2画分では、直径 10nm 程の小さな顆粒状の粒子が沢山見られるのに対し、Peak 1画分由来の超遠心活性画分と10%未満画分には、直径 100nm 程の球形の構造物が見られた。これをさらにフリーズフラクチャーレプリカ法を行うと、超遠心活性画分の凍結断面では、直径が 100nm 程度の凸面 (convex face) と直径が 100nm 程度の凹面 (concave face) の2種類の像が観察された。生体膜が存在する場合のフリーズフラクチャーでは、膜の脂質二分子層が疎水性界面で劈開されることによって、相補的な凸面と凹面の2種類の断面が観察される。今回得られた結果はこの膜の断面の一般則に一致する。すなわち、シヨ糖密度 35–50% の活性画分で観察される 100nm 程度の構造体には膜小胞が含まれていることを示していた。加えて、超遠心活性画分については、Peak 2画分で観察される粒子状のものがこの2つの面にも見られ、Peak 2画分の 10nm 大の顆粒状粒子は、ケラチン分解性プロテアーゼを含む複合体で、それが超遠心活性画分で、二重膜の間に局在する可能性があることを示唆した。同様に、10%未満画分でも凸面 (convex face) と凹面 (concave face) の2種類の像が観察されたため、脂質二分子層を有する構造物であることが確認できた。しかし、ケラチン分解性プロテアーゼを含む複合体の存在は確認できず、これはケラチン分解活性がない画分であることと合致していた。別途、H328株細胞そのものについても、フリーズフラクチャーレプリカ法を用いた観察を行ったが、外膜と内膜構造が同時に確認され、これらの観察結果とは異なるものであった。以上のことから、Peak 1画分由来の超遠心活性画分と10%未満画分では、直径 100nm 程の膜を持つ小胞を有すること、そして超遠心活性画分ではケラチン分解性プロテアーゼを含む顆粒状粒子を持ち、シヨ糖密度で重い画分 (35–50%) となって活性を示すのに対し、軽い画分 (10%未満) では顆粒状粒子は観察されず活性を示さないことが判った。この結果を基に、直径 100nm 程の膜を持つ小胞は「膜小胞」であることが強く示唆され、H328株細胞表層からこれが放出される電顕写真 (Fig.4) も踏まえて「膜小胞」であると判断された。

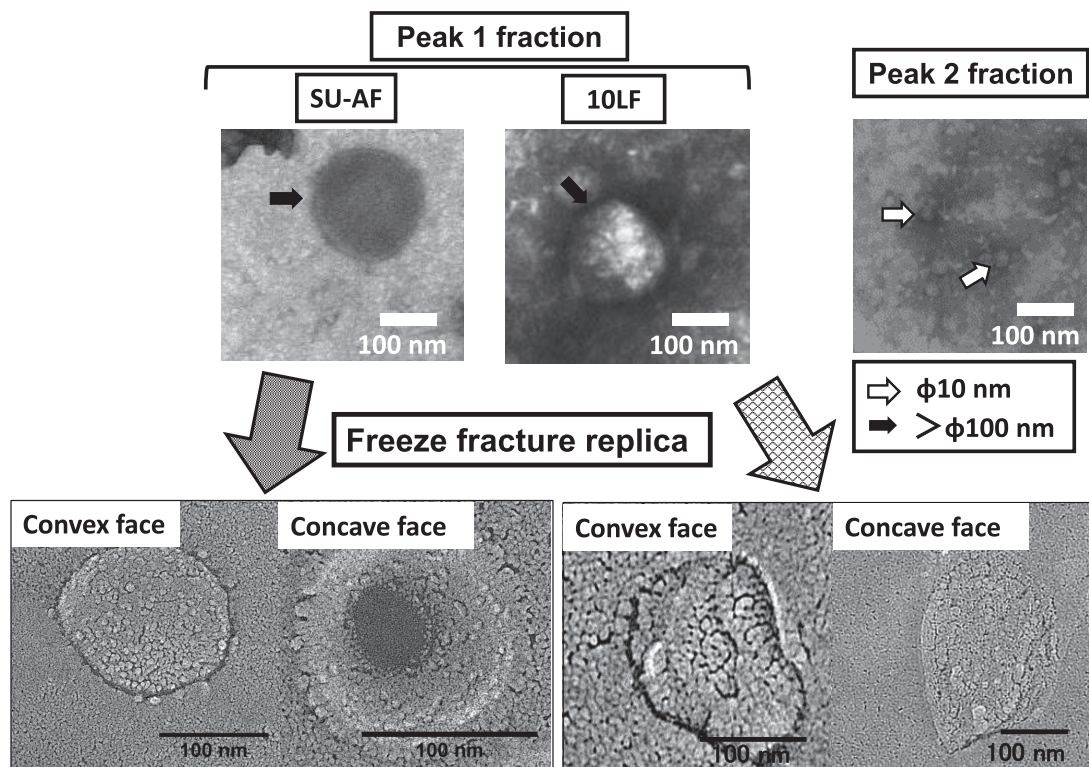


Fig. 3 Electron microscopy (TEM) images and the freeze-fractured-replica method. The samples (Peak 1 and Peak 2 fractions) were derived from the previous step for the preparation method, Method 1. From Peak 1 fraction, two fractions were obtained by sucrose density gradient ultracentrifugation; keratinolytic active fraction (SU-AF) and lower than 10 % sucrose fraction (10LF). The method for the ultracentrifugation was described in the text. Closed arrows indicate membrane vesicles (MVs) and open arrows indicate granular particles in 10nm. The freeze-fractured-replica method was done following the explanation described in the text. TEM preparation are shown in our previous report (Yamaoka *et al.*, 2014). Scale bars represent 100 nm

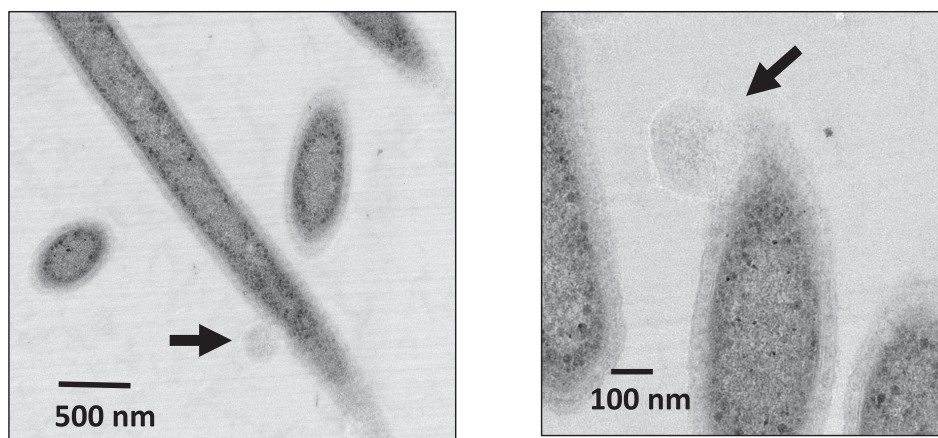


Fig. 4 Electron microscopy (TEM) images of *Meiothermus ruber* H328. The incubation of the strain with chicken feathers and their preparations for the electron microscopy analysis were done as in the previous report (Yamaoka *et al.*, 2014). Arrows indicated membrane vesicles.

膜小胞に含まれるケラチン分解性プロテアーゼの同定と局在性の検討

MALDI-TOF/MS/MS解析とH328株のゲノム情報を照合させた結果、Peak 2画分から25タンパク質が、超遠心活性画分からは16タンパク質が同定され候補として上がってきた。他方でゲノム情報からは、プロテアーゼ遺伝子が全78個見付き、分泌型シグナル、転写プロモーター、局在性予測などから、26遺伝子に絞り込んだ。さらに、予備実験として、培養上清中のケラチン分解性プロテアーゼ活性に対する阻害剤の検討から、セリンプロテアーゼ阻害剤（フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF)）とジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP) が、ほぼすべての活性を阻害することが判り、セリンプロテアーゼに着目することにした。絞り込んだ26候補遺伝子のうち、セリンプロテアーゼは18あることが分かった。この18候補遺伝子をMALDI-TOF/MS/MS解析で確認・同定されたタンパク質と照合したところ、超遠心活性画分とPeak 2画分で共に同定されるセリンプロテアーゼは1つだけゲノムに存在しており (MrH_874

遺伝子 (2,094bp, 697a.a.))、このプロテアーゼ (以後 Protein B) が、ケラチン分解性プロテアーゼとして Peak 1画分と Peak 2画分に含まれる巨大分子複合体にあることを突き止めた。加えて、大変興味深いことに、この遺伝子の5'上流側4bpのところにある機能未知のMrH_873遺伝子 (以後 Protein A, 2,025bp, 674a.a.)) の産物が、プロテオーム解析でいずれの画分でも Protein Bと同時に検出された。この2つの遺伝子は、別途 mRNA の発現解析においてもオペロンとして機能することが明らかになり、Protein Aが Protein B のアクセサリであるいはシャペロンの機能を有するなど、タンパク質のレベルでも何らかの機能的相互作用を持つことが強く示唆された。

同定された Protein A と Protein B について、Peak 1画分、Peak 2画分、超遠心活性画分、そして10%未満画分の4つの画分に対して、局在性の調査を、2つのタンパク質に対するポリクローナル抗体を用いた免疫電顕解析を行って調査した。Protein A と Protein B に対する一次抗体は、二次抗体で識別できるように異なる動物 (マウスとウサギ) から調製した。その結果、Fig.5に示す

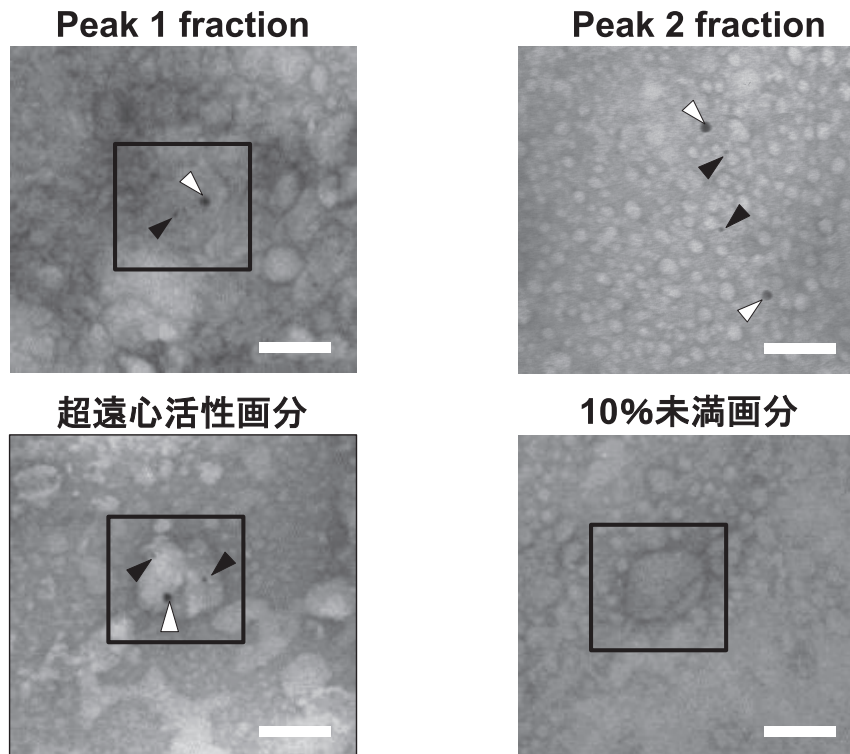


Fig. 5 Immunoelectron microscopy analysis for localization of Protein A and Protein B. The preparation of antibodies to Protein A and Protein B was done according to the method described in the text by use of mouse and rabbit, respectively. The secondary antibodies conjugated with different size of colloidal gold particles (5nm for Protein A and 15nm for Protein B) were employed for the detection of two proteins.

□ : >100nm membrane vesicle ▲ : 5nm gold-colloid (Protein A)
 △ : 15nm gold-colloid (Protein B) white bars : size marker 100nm

ように、Peak 1画分と超遠心活性画分から得られた100nm程の膜小胞には、Protein AおよびProtein Bの存在を示す大小のシグナルが見えるのに対し、10%未満画分ではシグナルが検出されなかった。さらに、Peak 2画分の顆粒状粒子に対して、両タンパク質のシグナルが検出されたことから、Peak 2画分の10nm大の粒子は、両タンパク質を含むことが判明した。このことから、Protein AおよびProtein Bは、Peak 2画分に見られる顆粒状粒子に含まれる形で、膜小胞にも局在する可能性が示唆された。

膜小胞産生の量的コントローラー *degP* 遺伝子破壊による効果

膜小胞産生が、同じグラム陰性細菌である大腸菌において、熱ショックタンパク質かつ翻訳されたタンパク質移送後の分解を担うとされている *degP* 遺伝子の欠損が膜小胞産生能増加に関与することが報告されていた (Schwechheimer & Kuehn, 2013)。そこで本菌株でもまず *degP* 遺伝子の検索を行った結果、HtrA2 peptidase とアノテーションされる遺伝子 (MrH_331, 413 a.a., 推定分子量 44.5kDa) が最上位に選択されてきた。他にも2つの遺伝子が候補として選択されてきたが、特に相同性で MrH_331 が最も高い (36%) のものであった。引き続き MrH_331 について、この遺伝子破壊を相同組換えにより実施し、カナマイシン耐性で選択後、PCRでもこの遺伝子の欠損を確認した。

H328株の変異株である *degP* 遺伝子破壊株の細胞特性を知るため、培養温度 55℃ と 60℃ における生育と細胞形態を調べた。その結果、野生型 H328 株は、両方の温度で良好な生育 (OD₆₆₀ が 1.5 超) を示したが、*degP* 遺伝子破壊株は、55℃ では野生型と同じだったのに対して、60℃ では6日間の培養でも生育を示す OD₆₆₀ が 1 程度までしか上昇せず、細胞形態も異常に長い細胞になることが判った。この後、培養上清から簡便に調製したサンプル (Fig. 1, Method 2) に対し、膜小胞産生量を調べるため、蛍光色素 DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) を用いて、蛍光量の変化を見た。その結果、Fig. 6 に示すように、4日目から 55℃ 培養時と比べ 60℃ 培養時には、培養上清 ml あたり 4-5 倍程度の蛍光強度の上昇が見られ膜小胞産生量が増加していることが示唆された。この現象は、6日目でも同様な増加が継続して確認されていた。次に、同法により調製した膜小胞画分を、電子顕微鏡 (TEM) 解析を行った。Fig. 7 は、野生型株と *degP* 遺伝子破壊株の、55 および 60℃ での膜小胞画分の TEM 画像である。その結果、野生型株の場合は、両温度においていずれの場合も直径 100nm 程の膜小胞と若干の夾雑物が同程度

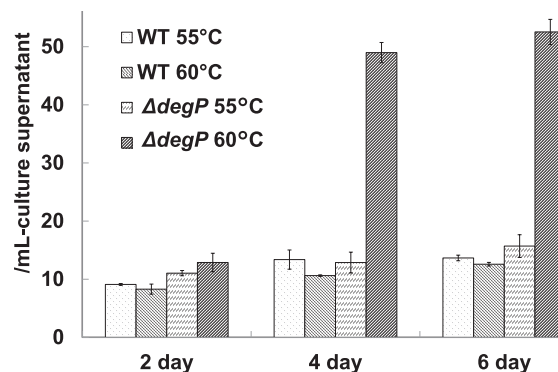


Fig. 6 Fluorescence intensity for quantitative analysis of membrane vesicles produced by the wild type H328 strain and the mutant $\Delta degP$. Two strains were incubated at 55 or 60°C in YS medium. Each sample was prepared from the corresponding culture in the indicated culture time (2, 4, or 6 days). After the procedure explained in the text, each sample was incubated with DiI at 5μM for 1 h at 37°C and then the fluorescence intensity was measured.

□: wild type at 55°C
 ▨: wild type at 60°C
 ▤: mutant $\Delta degP$ at 55°C
 ▩: mutant $\Delta degP$ at 60°C

に散見されるのに対し、*degP* 遺伝子破壊株の方では、55℃ 培養時に対し、著しく膜小胞と見られる小胞が増加していることが分かった。しかし、これらの現象は、トリ羽毛のない YS 培地で観察されるに留まっており、培地にトリ羽毛が存在する時には、羽毛分解物が Method 2 の方法では重篤な夾雑物となり蛍光強度の増加に支障となることから、トリ羽毛が存在する培地での検討に適した調製方法の検討が必要である。

膜小胞表面提示のための足場タンパク質の検索

膜小胞の量的コントロールに続き質的コントロールとして、膜小胞表面へターゲットするタンパク質分子の提示は、新しい膜小胞の応用として重要な課題である。そこで、膜小胞表面に局在するタンパク質を、膜小胞での足場タンパク質として応用できないか検討した。実際には、この足場タンパク質に有用タンパク質を遺伝子融合させて膜小胞表面に発現させることが目的である。膜小胞の応用の一つとして、ワクチン生産のためのツール開発があり、表面提示できるタンパク質を抗原にして、抗原タンパク質の精製や免疫賦活性アジュバントを必要としない簡便な方法の開発が望まれている。加えて、膜小胞を酵素のキャリアーにした系を構築し、新しいナノリアクターともいえる装置になればと考えている。

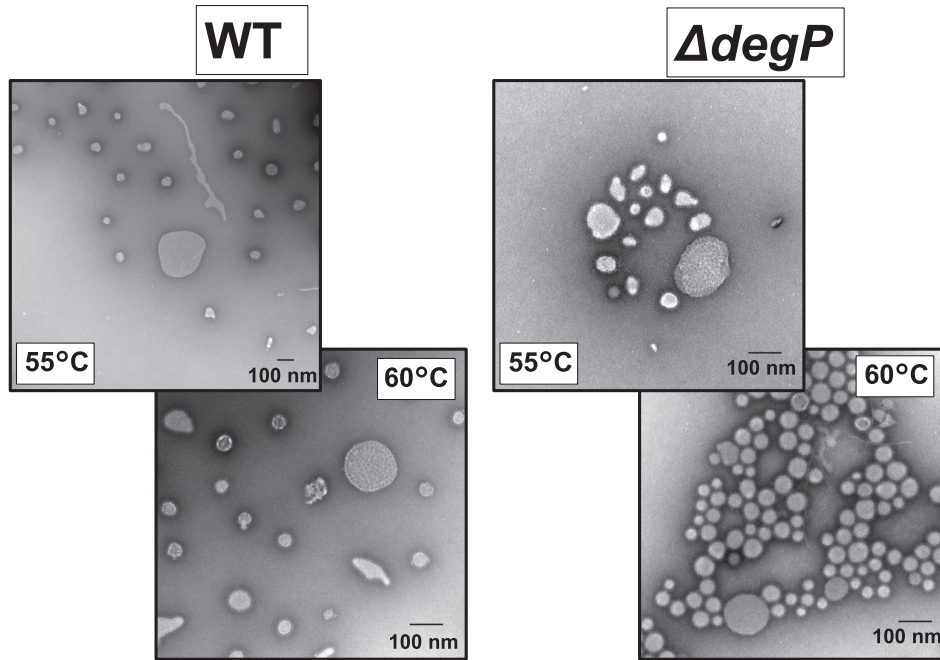


Fig. 7 Electron microscopy (TEM) images of membrane vesicles produced in the wild type (WT) and $\Delta degP$ mutant.

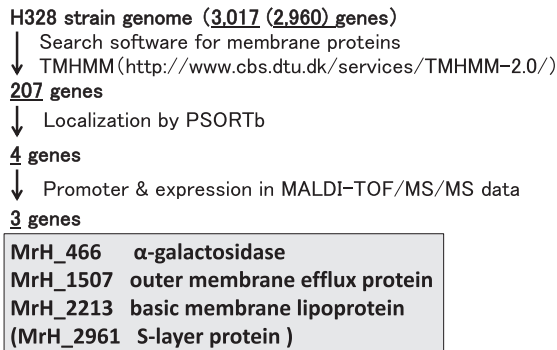


Fig. 8 Search process for candidates of scaffold proteins in membrane vesicles of *M. ruber* H328.

当初は、MALDI-TOF/MS/MS解析とH328株のゲノム情報 (Inada & Watanabe, 2013) と照合する過程で確認され、常に主要なタンパク質候補として上がってきたS-layerタンパク質 (MrH_2961) に焦点を絞り、抗体のあるProtein Aを融合させて検出する方策で検討していた。しかし、この遺伝子がH328株にとって必須遺伝子である可能性が高く、遺伝子破壊株そのものを取得することができないことが判った。そのため、S-layerタンパク質に代わるタンパク質候補を検索することにした

(Fig. 8)。まず膜タンパク質探索ソフトウェアTMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) にH328株の全ゲノム遺伝子情報をかけ、207個のタンパク質遺伝子を候補として選択することができた。引き続き、グラム陰性細菌タンパク質に特化したPSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>) をかけると、上記のS-layerタンパク質を含む4個 (MrH_466, α -galactosidase; MrH_1507, outer membrane efflux protein; MrH_2213, basic lipoproteins) が選択されてきた。S-layerタンパク質については上記理由で除外することとし、MALDI-TOF/MS/MS解析で検出された3タンパク質候補について、現在検討を進めており、膜小胞表面提示の可能性を引き続き検討していく計画である。

考 察

M. ruber H328株が産業廃棄物であるトリ羽毛を強力に分解することからスタートし、その研究を進めていく中で膜小胞を産生することを突き止めた。当初は、ケラチン分解性プロテアーゼを含むプロテアソーム様の巨大分子複合体という解釈で研究を進めたが、これに電子顕微鏡解析を実施したことで、膜小胞に遭遇した。

ケラチン分解性プロテアーゼおよび膜小胞の調製は、Fig.1に示す2つの方法で行った。Method 1は、(i) ケ

ラチン分解性プロテアーゼ活性が、巨大分子複合体となって少なくとも2つの形態（膜小胞と密接に関与する場合（Peak 1 画分）とそうでない場合（Peak 2 画分））があること、そして (ii) 膜小胞の存在（Peak 1 画分）を示すために有効な手段となった。各画分に対してMALDI-TOF/MS/MS解析を行うといずれも複数のタンパク質を含んでいることから、ケラチン分解性プロテアーゼが精製されたのではなく、それらと共に巨大分子複合体として存在することが判った。しかしゲノム情報と照合させることで、MrH_874 遺伝子（Protein B, 2,094bp, 697a.a.）がケラチン分解活性を示す中心であることを示した。加えて、MrH_873 遺伝子（Protein A, 2,025bp, 674a.a.）を同時に見出し、この遺伝子がゲノム上で隣接し、かつオペロンとして発現するものの、Protein B に対してどのような機能を発揮するのか今後明らかにしていくことが必要である。これら2つのタンパク質（Protein A と Protein B）は、存在が明らかになった膜小胞と密接に関与する場合（Peak 1 画分）とそうでない場合（Peak 2 画分）いずれでも共存していることが示され、ケラチン分解活性の本体である Protein B に対するシャペロン機能が Protein A に予想されている。Protein A には、既存のシャペロンやプロテアーゼとは相同領域が確認されておらず、これまでとは異なる手法で新たな相互作用を明らかにすることが課題である。

電子顕微鏡解析等により膜小胞の存在が明らかになったことは、全く意外な発見であったが、直径 100nm 程のサイズはこれまで他の細菌で報告されている膜小胞と同程度のサイズで、細菌細胞とは異なることを示している（Kulp & Kuehn, 2010）。膜小胞の機能として、病原性物質やクオラムセンシングなどの細胞間コミュニケーションシグナル物質の輸送が示されているが、H328 株の場合は、細胞外にある栄養物質のタンパク質を分解する酵素タンパク質の輸送という役割を担っていると考えられる。さらに膜小胞の存在で、ケラチン分解性プロテアーゼは、強力なタンパク質変性剤（SDS やほとんどの有機溶媒）に対して極めて強い耐性を示し、熱安定性も膜小胞により強化されることが判っている（Kataoka *et al.*, 2014）。これらの事実は、膜小胞を安定な酵素キャリアーとして応用することの提案に強力な例示になっている。

膜小胞産生において、*degP* 遺伝子の欠損が量的増加をもたらすことがこの研究で示された。この現象は、熱ショックを与えると *degP* 遺伝子産物を用いて変性タンパク質を分泌する機構が働かず、緩和策としてストレス軽減のため膜小胞の産生増加に繋がったと説明づけられる。この現象は大腸菌で確認されている（Schwechheimer & Kuehn, 2013）が、好熱性細菌である H328 株でも観

察されることから、グラム陰性細菌では共通する現象と考えられる。H328 株では、この研究で開発した Method 2（Fig.1）による簡便な定量法での結果であるが、トリ羽毛を含む培地ではこの方法が適用できないため、膜小胞産生の増加現象を別の方法で確認することが次の課題となる。

膜小胞産生における質的検討として、膜小胞で表面提示するための足場タンパク質の開発を検討した。既に大腸菌では、OmpA タンパク質が外膜にアンカーされている足場タンパク質として研究が進められているが、それとは異なるタンパク質として最初は MALDI-TOF/MS/MS 解析でも確認された S-layer タンパク質で検討した。しかしこの遺伝子の欠損変異株を作製することが不可であったことから、必須遺伝子である可能性が示唆された。そこで、他のタンパク質に目を向け（Fig.8）、現在異なる3タンパク質候補に対して同様のアプローチを行っているところである。

ケラチン分解性プロテアーゼとトリ羽毛分解の関係について調べるため、この研究から明らかになった Protein B の遺伝子欠損株を作製し、トリ羽毛分解を調べた。ケラチン分解活性は減少しトリ羽毛分解もやや弱くなるものの分解は進行することが判明した（未発表データ）。加えて Protein B の遺伝子破壊が行われても、別のプロテアーゼがトリ羽毛分解のために発現・機能していることが推察され、そのプロテアーゼの同定を進めている。またプロテアーゼ以外の他の因子もトリ羽毛分解に大きく影響しており、その因子の一つとしてケラチンタンパク質にも多く含まれるシステインのSH残基の酸化・還元が重要であることが判ってきている。その反応を触媒する protein disulfide oxidoreductase (PDO) の遺伝子発現を強化すると、確実にトリ羽毛の分解が強化されることが判り、タンパク質のジスルフィド結合開裂もトリ羽毛分解に重要な因子であることが明らかになりつつある。

H328 株の場合だけでなく膜小胞を産生する細菌株全般に当てはまることだが、膜小胞の産生量が依然として少ないことが、膜小胞をまだ応用につなげられていない原因の一つである。膜小胞への放出が、積極的あるいは受動的な細胞生理学上の現象か明確にし、膜小胞放出の制御に応用することが今後の課題の一つである。その他、活性汚泥などを含むバイオフィームや細胞間相互作用を解明していくと、膜小胞を大量に生産する細菌が見つかることが期待され、膜小胞のより実用的な応用の道が示されるであろう。トリ羽毛のような産業廃棄物の処理の観点からも大きな可能性を秘めている（Shigeri *et al.*, 2009）。微生物の応用を志す者にとって、スクリーニングは極めて重要な研究ステップであり、スクリーニングの末に自分のオリジナルな菌株を持って新たな可能性を

追究する研究を推進して欲しい。

最後に、膜小胞の発生 (biogenesis) について、現在までに主に2つが議論されている。一つは、オーソドックスな細胞表層から出芽のように放出される手段、そしてもう一つは細胞破裂が元で出来たリン脂質が筏状に断片化後、球になって膜小胞を作るという手段である (Turnbull *et al.*, 2016)。内膜・外膜構造を有さないグラム陽性細菌での膜小胞は、おそらく後者によるものと推察される。今後、細胞の生育期と膜小胞の産生の関係がより詳細に明らかになることや、膜小胞の構造がウイルスやファージに似ていることから、バクテリオファージ関連遺伝子との密接な関係が解明されて行けば、応用だけでなく進化的な視点からも面白い議論が展開されていくことが期待される (Toyofuku *et al.*, 2017)。H328株においても、Protein Bのプロテアーゼあるいはこれらの巨大分子複合体の局在性を、細胞外のみならず細胞内膜および外膜についてより詳細に調査することにより、膜小胞へタンパク質分子がリクルートされる生理学的な意味の解明と共に、膜小胞発生の手がかりがつかめる可能性がある。

日本農芸化学会2015年度大会 (岡山大学) で、「膜小胞 (membrane vesicle) を知っていますか?」というキャッチーな題名で、シンポジウムを筑波大学の野村暢彦先生と世話役として開催した。当時は、細菌における膜小胞の存在アピールのための啓蒙活動と捉えていたものの、膜小胞にかかる研究者も少なく演者を探すのに困るほどであった。それが現在では、多数の研究者が膜小胞関連の研究に携わって推進に貢献していることを知り、喜ぶと共に、自分の研究の進展の遅さに危機感を覚えるほどになってきている。

要 約

この研究では、有馬温泉から単離された好熱性細菌 *M. ruber* H328株によるトリ羽毛の分解機構を研究する過程で見つけられた膜小胞の解析を中心に行った。トリ羽毛の主成分であるケラチンタンパク質を分解する強力なプロテアーゼを研究するうちケラチン分解性プロテアーゼが巨大分子複合体を形成することが判った。まずケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製の検討を行い、2つの方法を使ってこれらを調製した。1つ目の Method 1 では、最終的に巨大高分子用ゲルろ過クロマトグラフィーとそれに引き続くショ糖密度勾配超遠心分離による調製を行い、その後で電顕解析 (TEM) を実施した。ケラチン分解性プロテアーゼの局在性については、他のタンパク質と共に巨大な複合体として存在する場合 (Peak 2画分) と細菌細胞から出芽形式で放出される膜小胞に含まれる場合 (超遠心活性画分) があるこ

とが判った。フリーズフラクチャーレプリカ法を含む電顕解析の結果、超遠心活性画分については、直径100nm程の脂質二重膜構造を有する膜小胞が明らかになり、Peak 2画分については直径10nm程の顆粒状粒子構造が検出された。超遠心活性画分とPeak 2画分に含まれるケラチン分解性プロテアーゼのタンパク質の同定を、MALDI-TOF/MS/MS解析で確認・同定されたタンパク質とH328株のゲノム情報を照合させることで、セリンプロテアーゼ MrH_874 遺伝子であることを突き止めた。加えて、MrH_874 遺伝子とゲノム上でオペロンを構成する MrH_873 遺伝子も同定されてきたが、このタンパク質に関しての機能は不明のままである。

ケラチン分解性プロテアーゼを含む膜小胞の調製法として開発した Method 2 は、蛍光色素 DiI を使った膜小胞の定量化を可能にした簡便法である。膜小胞の応用をめざす上で必要となる膜小胞産生の量的コントロールのため、熱ショックタンパク質である *degP* 遺伝子破壊による膜小胞産生への効果を調べた。その結果、55℃培養時に比べ60℃培養時に4-5倍程度の蛍光量の上昇が見られ、この結果は電顕解析でも著しい膜小胞様構造の増加を確認することが出来た。続いて、膜小胞の質的コントロールとして、膜小胞上で足場タンパク質として機能する候補タンパク質の検索を行った。MALDI-TOF/MS/MS解析でも確実に確認できた S-layer タンパク質は、遺伝子破壊株を取得できないことから、足場タンパク質としての使用が難しいと判断され、膜タンパク質検索ツールなどを用いて、現在3つの候補タンパク質を選び、検討を行っている。

本助成で得られた研究成果の報告

原著論文

Watanabe, K. 2016. Bacterial membrane vesicles (MVs): Novel tools as nature- and nano-carriers for immunogenic antigen, enzyme support, and drug delivery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 9837-9843.

口頭発表

- 1) 武田梨花, 西海斗, 渡部邦彦. 2018. *Meiothermus ruber* H328株由来protein disulfide oxidoreductase (PDO) 発現量増強株の羽毛分解への影響. 日本農芸化学会2018年度大会, 3月, 名古屋.
- 2) 渡部邦彦. 2017. 細菌の高次機能開拓: 細菌が産生する膜小胞の可能性~トリ羽毛分解から出発して~. 平成28年度バイオインダストリー協会3研究会合同講演会, 3月, 東京.
- 3) 武田梨花, 西海斗, 清水歩, 渡部邦彦. 2017. *Meiothermus ruber* H328株由来protein disulfide oxidoreductase (PDO) の発現量増加による羽毛分解の促進について. 日本農芸化学会関西支部例会, 5月, 京都.
- 4) 渡部邦彦, 大西愛航, 清水歩, 西海斗, 川崎一則. 2017. 好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株の *degP* 遺伝子

破壊株を用いた膜小胞産生に関する研究. 日本農芸化学会 2017年度大会, 3月, 京都.

- 5) 清水 歩, 西 海斗, 俣野明日香, 森川拓磨, 増村威宏, 佐生 愛, 川崎一則, 茂里 康, 渡部邦彦. 2016. 膜小胞を産生する *Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛分解に関する研究 ~ケラチン分解性プロテアーゼ遺伝子破壊株の作成とトリ羽毛分解の検討~日本農芸化学会 2016年度大会, 3月, 札幌.

その他

渡部 邦彦. 2016. 細菌が放出する膜小胞 (membrane vesicle) の機能と生合成機構そして応用に向けた研究動向」化学と生物 **54**: 720-725.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、助成いただきました公益財団法人発酵研究所に深く感謝いたします。いつもトリ羽毛を供与頂いている川中公平様 (<http://www.jidori.net>) にも感謝申し上げます。また、プロテオーム解析などでお世話になった京都市産業技術研究所山本佳宏様、泊直宏様にも御礼申し上げます。

文 献

- Bladen, H.A. & Waters, J.F. 1963. Electron microscopic study of some strains of *Bacteroides*. *J. Bacteriol.* **86**: 1339-1344.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 620-630.
- Brock, T.D. & Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**: 289-297.
- Dorward, D.W. & Garon, C.F. 1990. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of Gram-negative but not Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1960-1962.
- Hashimoto, Y., Yano, T., Kuramitsu, S. & Kagamiyama, H. 2001. Disruption of *Thermus thermophilus* genes by homologous recombination using a thermostable kanamycin-resistant marker. *FEBS Lett.* **506**: 231-234
- Inada S. & Watanabe, K. 2013. Draft genome sequence of *Meiothermus ruber* H328 that degrades chicken feathers and identification of proteases and peptidases responsible for feather degradation. *Genome Announc.* **1**: e00176-13.
- Kataoka, M., Yamaoka, A., Kawasaki, K., Shigeri, Y. & Watanabe, K. 2014. Extraordinary denaturant tolerance of keratinolytic protease complex assemblies produced by *Meiothermus ruber* H328. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 2973-2980.
- Knox, K.W., Vesik, M. & Work, E. 1966. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **92**: 1206-1217.
- Kulp, A. & Kuehn, M.J. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Ann. Rev. Microbiol.* **64**: 163-184.
- Loginova, L.G. & Egorova, L.A. 1975. *Thermus ruber* obligate thermophilic bacteria in the thermal springs of Kamchatka. *Mikrobiologiya* **44**: 661-665.
- Matsui, T., Yamada, Y., Mitsuya, H., Shigeri, Y., Yoshida, Y., Saito, Y., Matsui, H. & Watanabe, K. 2009. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 941-950.
- Nobre, M.F., Trüper, H.G. & da Costa, M.S. 1996. Transfer of *Thermus ruber* (Loginova et al. 1984), *Thermus silvanus* (Tenreiro et al. 1995), and *Thermus chliarophilus* (Tenreiro et al. 1995) to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Meiothermus silvanus* comb. nov., and *Meiothermus chliarophilus* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Thermus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 604-606.
- Saito, Y., Shigemitsu, T., Yamasaki, R., Sasou, A., Goto, F., Kishida, K., Kuroda, M., Tanaka, K., Morita, S., Satoh, S. & Masumura, T. 2012. Formation mechanism of the internal structure of type I protein bodies in rice endosperm: relationship between the localization of prolamin species and the expression of individual genes. *Plant J.* **70**: 1043-1055.
- Sasou, A., Shigemitsu, T., Saito, Y., Tanaka, M., Morita, S. & Masumura, T. 2016. Control of foreign polypeptide localization in specific layers of protein body type I in rice seed. *Plant Cell Rep.* **35**: 1287-1295.
- Schwechheimer, C & Kuehn, M.J. 2013. Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **195**: 4161-4173.
- Shigeri, Y., Matsui, T., & Watanabe, K. 2009. Decomposition of intact chicken feathers by a thermophile in combination with an acidulocomposting garbage-treatment process. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 2519-2521.
- Toyofuku, M., Cárcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C., Kurosawa, M., Gademann, K., Pilhofer, M., Nomura, N. & Eberl, L. 2017. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* **8**: e481.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A.L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N.K., Osvath, S.R., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, E.S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L.G., Cavaliere, R., Ahrens, C.H., Charles, I.G., Nomura, N., Eberl, L. & Whitchurch, C.B. 2016. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.* **7**: e11220.
- 渡部邦彦. 2014. トリ羽毛ケラチン分解性プロテアーゼの驚異的な変性剤耐性と巨大分子複合体の実体解明への挑戦. *バイオサイエンスとインダストリー* **72**: 34-36.
- 渡部邦彦. 2015. 細菌が出芽する？いえいえ、放出されるのは膜小胞. *日本生物工学会誌* **93**: 412.
- Yamaoka, K., Kataoka, M., Kawasaki, K., Kobayashi, E., Shigeri Y. & Watanabe, K. 2014. *Meiothermus ruber* H328 enhances the production of membrane vesicles for feather degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**: 1623-1625.

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

〒630-0192 奈良県生駒市高山町8916-5

The synthetic mechanisms and the physiological roles of nitric oxide in fungi

Hiroshi Takagi

Graduate School of Science and Technology Nara Institute of Science and Technology

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous signaling molecule involved in the regulation of many biological processes in higher eukaryotes and microorganisms. In mammalian cells, NO is produced by NO synthase (NOS) that catalyzes the two-step oxidation of arginine. The molecular function of NO in unicellular eukaryotic yeast is poorly understood due to the lack of mammalian NOS orthologues in the genome. Recently, we reported that the flavoprotein Tah18, which was previously shown to transfer electrons to the Fe-S cluster protein Dre2, is involved in the NOS activity in response to elevated temperature and that NO produced from arginine through the Tah18-dependent activity confers high-temperature stress tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* cells. We also proposed a novel regulatory mechanism of NO synthesis mediated by the Tah18-Dre2 complex. In this study, we further analysed the synthetic mechanism and the physiological role of NO in yeasts and fungi.

Our findings raised the possibility that Tah18 acts as a reductase to transfer electrons from NADPH to an unidentified oxygenase protein that oxidizes arginine to citrulline and NO. As results of the experiments using the Yeast Knockout Collection and the specific inhibitor, we individually found candidate genes encoding the oxygenase-like protein among the heme-dependent oxidases and encoding an enzyme involved in NADPH synthesis, both of which are required for the NOS reaction. We also showed that an NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1 (NDOR1) and its interaction partner protein CIAPIN1, which are homologous to Tah18 and Dre2, respectively, are involved in the NOS activity in a manner similar to Tah18-Dre2, suggesting that the Tah18-dependent NO synthesis and its regulatory system are conserved in eukaryotic cells from yeasts to mammals. On the other hand, a high level of H₂O₂ was shown to induce cell death caused by the Tah18-dependent NOS activity. The dual functions (cell survival vs. cell death) of NO found in higher eukaryotic organisms also occur in yeast. NO contributes to physiological events in yeast in a manner dependent on its intracellular level, as well as on the environmental conditions. In mammals, NO is known to act mainly through soluble guanylate cyclase/cGMP-mediated signaling pathways and protein S-nitrosylation, which are involved in the regulation of gene expression and protein functions. To identify S-nitrosylated proteins in yeast, we developed the biotin switch method combined with LC-MS. Using cell extract treated with a NO donor S-nitrosoglutathione, we identified many S-nitrosylated proteins, including enzymes involved in glycolysis and TCA cycle.

In terms of industrial application, the disruption of genes encoding NO detoxification enzymes was supposed to enhance the fermentation ability of yeast, which may be related to intracellular NO level. In research of pathogenic yeasts and fungi, we found that some of multidrug-resistant strains of *Candida* species and clinical strains of *Aspergillus fumigatus* had lower levels of NO or less sensitivity to NO than those of other strains, suggesting that NO is related to pathogenicity.

Key words: nitric oxide, nitric oxide synthesis, nitric oxide signaling, yeasts, fungi

E-mail: hiro@bs.naist.jp

共同研究者：渡辺大輔（奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科）。

那須野亮（奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科）。

川本 進（千葉大学真菌医学研究センター）。
知花博治（千葉大学真菌医学研究センター）

緒言

一酸化窒素 (NO) は大気汚染の原因となる窒素酸化物の一種であるが、様々な生物種の細胞内ではシグナル分子として多様な生命現象に関与しており、哺乳類においては、血圧調節、神経伝達、免疫応答などに寄与している (Francis *et al.*, 2010; Wink *et al.*, 2011). また、植物では形態形成、気孔開閉、感染防御などのシグナルとして機能している (Takahashi & Yamasaki, 2002; Siddiqui *et al.*, 2011). 細菌においても、運動性、病原性、バイオフィーム形成、抗生物質耐性などへの関与が報告されている (Shatalin *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009). NO は哺乳類では主にアルギニンから NO 合成酵素 (NOS) によってシトルリンとともに生成される (Förstermann & Sessa, 2012). NO の作用機序としては、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化することで、サイクリック GMP (cGMP) の合成を介して、様々な生理反応を調節している (Francis *et al.*, 2010). また、NO はタンパク質のシステイン残基と反応し、S-ニトロソ (SNO) 化修飾を行うことでタンパク質の局所的構造を変化させ、その活性や機能を制御している (Heinrich *et al.*, 2013). NO が生理機能を発揮するためには、その濃度や局在を適切にかつ厳密に制御する必要がある。高濃

度の NO はその高い反応性のために細胞毒性を示すため、細胞は NO に対する解毒系や防御系も備えている。

一方、高等生物のモデルとして、また発酵産業において重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、NO とストレス応答との関連性が示唆されているが (Domitrovic *et al.*, 2003), ゲノム上に哺乳類 NOS の相同遺伝子 (オルソログ) が存在しないため、NO の合成機構や生理的役割については不明な点が多い。一般に、製パンや酒類、バイオエタノールの製造に用いられる産業酵母は種々の発酵生産環境 (エタノール、高温、冷凍、乾燥、浸透圧など) において、細胞内に活性酸素種 (ROS) が蓄積する酸化ストレスに曝され、有用機能 (エタノール、炭酸ガス、味・風味成分などの生成) が制限されるため、発酵力の向上には酸化ストレス耐性の強化が必要である。また、真菌感染症の主要な原因菌である病原真菌 (*Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* など) は、ヒトに感染する際、種々のストレス (温度、酸素濃度、栄養など) に対する耐性を獲得し、感染・病原性を示すことから、NO がこれらの現象に関与する可能性が考えられる (Li *et al.*, 2016).

我々は酵母の新規なストレス耐性機構を解析し、産業酵母の育種への応用に取り組んでいる。これまでに、細胞内の ROS レベルが上昇する高温ストレス下において、

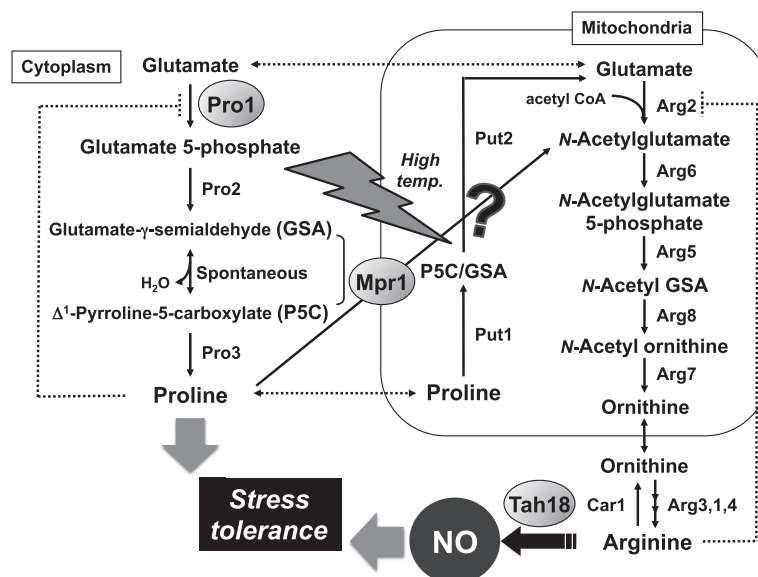


Fig. 1 Metabolic pathway of proline and arginine in *S. cerevisiae*. Protein names: Pro1, γ -glutamyl kinase; Pro2, γ -glutamyl phosphate reductase; Pro3, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) reductase; Put1, proline oxidase; Put2, P5C dehydrogenase; Arg1, arginosuccinate synthetase; Arg2, *N*-acetyl-glutamate synthase; Arg3, ornithine carbamoyltransferase; Arg4, arginosuccinate lyase; Arg5, *N*-acetyl-glutamyl-5-phosphate reductase; Arg6, *N*-acetyl-glutamate kinase; Arg7, *N*-acetyl-ornithine acetyltransferase; and Arg8, *N*-acetyl-ornithine aminotransferase. (Reproduced from Astuti *et al.*, 2016a)

N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的なプロリンからのアルギニン合成が亢進されること (Nishimura *et al.*, 2010), アルギニンからフラボタンパク質 Tah18 依存的に NO が生成し, 細胞の高温ストレス耐性に寄与することを見出した (Nishimura *et al.*, 2013) (Fig.1). Tah18 には NOS 活性に必要なオキシゲナーゼドメインが存在しておらず, 複合体を形成する Dre2 タンパク質の鉄硫黄クラスターに FAD と FMN を介して電子を転移するが (Netz *et al.*, 2010), NO 合成への関与は初めての知見である. また, 我々は「通常, Tah18 と Dre2 は複合体を形成し, 細胞質の鉄硫黄タンパク質生成に関与しているが, 酸化ストレスにตอบสนองして Tah18-Dre2 複合体が解離することで, 遊離した Tah18 に依存的な NO 合成が起こる。」という新規な NO 合成の制御モデルを提唱している (Yoshikawa *et al.*, 2016) (Fig.2). NO の生理機能としては, NO が銅代謝に関与する転写因子 Mac1 を活性化することで, 細胞内の銅含量が増加し, 銅依存型スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 の活性上昇を介して細胞が高温ストレス耐性を獲得することが示された (Nasuno *et al.*, 2014) (Fig.3A). また, 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では, NO の合成系や解毒酵素の同定, 酸化ストレス応答の解析を行い, NO を介したシグナル伝達系の存在を見出した (Astuti *et al.*, 2016b) (Fig.3B).

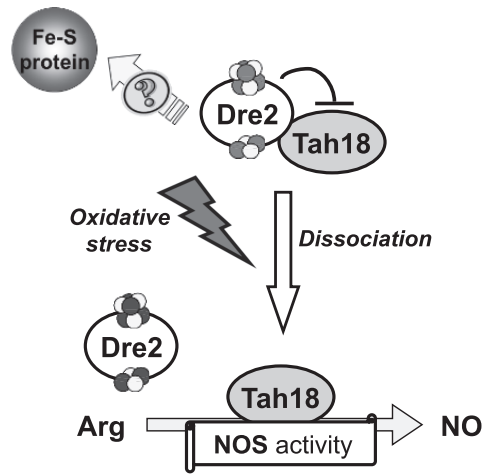


Fig. 2 A proposed model for regulatory mechanism of NO synthesis in *S. cerevisiae*. Under non-stress conditions, Tah18 binds to Dre2 for the early step of electron transfer in cytosolic Fe-S protein biogenesis. In this state, Tah18 cannot use electrons from NADPH for its NOS-like activity. In contrast, oxidative stress, such as high temperature and H₂O₂ treatment, induces the Tah18-Dre2 complex dissociation, and Tah18 released from Dre2 exerts its NOS-like activity using these electrons from NADPH, leading to generation of NO.

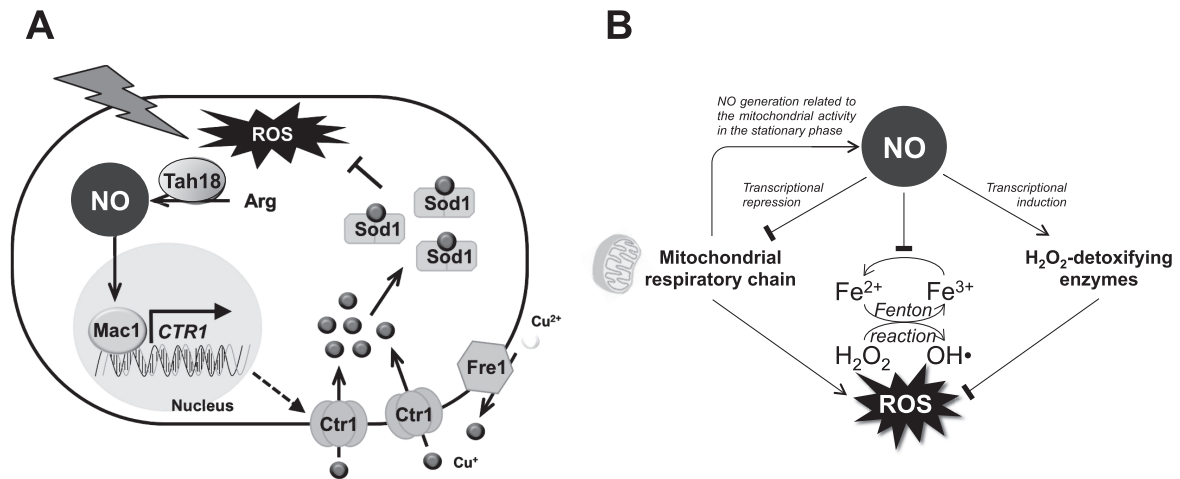


Fig. 3 Proposed models for NO-mediated oxidative stress responses in yeast. (A) When *S. cerevisiae* cells are exposed to high-temperature stress, NO is produced from arginine by an NOS-like activity. NO-mediated Mac1 is activated by post-translational modification, then upregulates the expression of *CTR1*, which encodes a copper transporter. Protein names: Fre1, cupric reductase; Ctr1, copper ion transporter; Sod1, Cu,Zn-superoxide dismutase; Mac1, transcription factor responsible for copper metabolism. (B) In *S. pombe*, NO is mainly generated by the activities of an unidentified NOS and the mitochondrial respiratory chain (MRC) complex III during log phase growth and is detoxified by H₂O₂-detoxifying enzymes in stationary phase. NO triggers at least three antioxidant mechanisms: (i) inhibition of the conversion of Fe³⁺ into Fe²⁺ (ii) upregulation of the genes encoding H₂O₂-detoxifying enzymes, and (iii) downregulation of the MRC genes. (Reproduced from Astuti *et al.*, 2016a)

酵母におけるNO研究は、哺乳類や植物に比べてまだ活発ではないが、酵母のモデル生物、また有用微生物としての重要性を考えた場合、その科学的意義は極めて大きいと考えられる。特に、NOS様活性の責任分子であるオキシゲナーゼは、いまだ同定できておらず、酵母におけるNO研究を加速する上で、新規分子を同定することは緊急の課題である。また、酸化ストレス耐性との関連では、NO依存的な抗酸化機構を応用した産業酵母の育種が期待される。実際に、NO合成系を強化した実用パン酵母を作製したところ(γ -グルタミルキナーゼPro1とMpr1の高機能型変異体の共発現)、親株に比べて製パン過程でのストレス(乾燥、冷凍)に対する耐性が向上し、細胞内NOレベルや発酵力が増加したことから、産業酵母におけるNOの有用性を実証できた(Sasano *et al.*, 2012)。

一方、病原真菌(*C. glabrata*, *C. neoformans*, *A. fumigatus*)においても、*S. cerevisiae*のNO合成関連遺伝子に着目し、機能解析を行った。その結果、*C. glabrata*のTah18発現抑制株は野生型株より毒性が低下すること(カイコ感染実験)、*C. neoformans*のMpr1破壊株は野生型株より熱ショック感受性を示すこと、*C. neoformans*および*A. fumigatus*では過酸化水素処理やアルギニン添加により細胞内でNOが検出されるなど、NOと増殖、感染、病原性との関連を示唆する知見が蓄積されてきた。

このように、NOの合成機構と生理的役割を解明できれば、産業酵母における発酵力の強化、病原真菌の生理特性(増殖、感染、病原性)制御などに繋がること期待される。そこで本研究では、*S. cerevisiae*に見出したNOの合成制御機構の解明を目指すとともに、NO産生が酵母や病原真菌の生理特性に及ぼす効果、影響について解析を行った。

実験方法

菌株、プラスミド、および培地

本研究では、酵母*S. cerevisiae*のS288C系統株(BY4741株)および Σ 1278b系統株(L5685株)を用いた。また、非必須遺伝子の破壊株コレクションであるYeast MATa Collection(Dharmacon社)を適宜用いた。Tah18の過剰発現株(TAH18-OE)およびHisタグ融合型Tah18の過剰発現株(6His-TAH18-OE)は、L5685株にpAG414GPD-TAH18もしくはpAG414GPD-6HisTAH18を導入後、ゲノム上のTAH18遺伝子を破壊して、それぞれ構築した。TAH18遺伝子をNDOR1遺伝子に、DRE2遺伝子をCIAPIN1遺伝子にそれぞれ置換した株(NC)は、L5685株にpRS414-CIAPIN1、pRS415-NDOR1を導入後、ゲノム上のTAH18遺伝子およびDRE2遺伝

子を破壊して、それぞれ構築した。タンパク質相互作用の解析に用いたCIAPIN1過剰発現株、NDOR1過剰発現株およびCIAPIN1/NDOR1共過剰発現株は、L5685株にpAG414GPD-3HA-CIAPIN1またはpAG416GPD-EGFP-NDOR1、もしくはその両方を導入して、それぞれ構築した。

各菌株が有する栄養要求性の相補には、pRS416およびpRS414を用いた。pAG414GPD-TAH18、pAG414GPD-6HisTAH18、pAG414GPD-3HA-CIAPIN1、およびpAG416GPD-EGFP-NDOR1は、Tah18、N末端に6Hisタグを融合したTah18、N末端に3HAタグを融合したCIAPIN1、およびN末端にEGFPタグを融合したNDOR1をそれぞれ恒常的に発現するプラスミドであり、Gateway technology(Invitrogen社)のBP反応およびLR反応を用いて構築した。pRS414-CIAPIN1は、DRE2遺伝子のプロモーター、ターミネーターとともに、CIAPIN1遺伝子をクローニングして、pRS415-NDOR1は、TAH18遺伝子のプロモーター、ターミネーターとともに、NDOR1遺伝子をクローニングして、それぞれ構築した。

酵母の培養には、栄養培地のYPD(2%グルコース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン)、最少培地のSD(2%グルコース、0.5%硫酸アンモニウム、0.16%Yeast Nitrogen Base without Amino Acids and Ammonium Sulfate)などを用いた。

フローサイトメトリー(FCM)による細胞内NOの定量

酵母の培養液(OD₆₀₀=1.0)をNO特異的な蛍光プローブDiaminofluorescein-FM diacetate(DAF-FM DA)で15 μ M、30分間処理し、2mM過酸化水素処理後、経時的にBD Accuri C6 Flow Cytometer(Becton Dickinson Bioscience社)に供し、平均蛍光強度を測定した。

Tah18と相互作用するタンパク質の同定

SD培地で対数増殖期まで培養した酵母を、2mM過酸化水素で30分間処理した後、集菌・洗浄し、細胞抽出液をBuffer A:TNETG buffer(10mM Tris-HCl(pH7.4)、2.5mM EDTA、150mM NaCl、10%(v/v) glycerol、0.5%(v/v) Triton X-100)で平衡化したNi Sepharose 6 Fast Flow(GEヘルスケア社)と混合した。50mM imidazoleを含むBuffer Aで洗浄した後、結合タンパク質をBuffer B(10mM Tris-HCl(pH7.4)、2.5mM EDTA、150mM NaCl、10%(v/v) glycerol、0.5%(v/v) Triton X-100、500mM imidazole)で溶出した。溶出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、ゲルからペプチドを回収し、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)に供してタンパク質の同定を行った。

タンパク質相互作用の解析

SD培地で対数増殖期まで培養した酵母から抽出したタンパク質溶液を、TNETG buffer (10mM Tris-HCl (pH7.4), 2.5mM EDTA, 150mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100) で平衡化した10 μ lの anti-GFP magnetic beads (Medical & Biological Laboratories 社) と混合し、15分間室温でインキュベートした。TNETG buffer で3回洗浄した後、SDS-PAGE sample buffer (50mM Tris-HCl (pH6.8), 10% (w/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.1% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol) で溶出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供した。

SNO 化タンパク質の探索と同定

対数増殖期までSD培地で培養した酵母から抽出したタンパク質溶液をNOドナーとして作用する2mM S-ニトロソグルタチオン (GSNO) で3時間処理したものに、1.8% SDS, 0.15% N-methylmaleimideを加えて50℃で20分間インキュベートした(ブロッキング処理)。アセトン沈殿で得たタンパク質をHENS buffer (100mM HEPES, 1mM EDTA, 0.1mM Neocuproine, 2% SDS (pH8.0)) に懸濁し、0.082mM CuCl₂, 0.41mg/ml Biotin-HPDP, 47.9mM アスコルビン酸を加えて、3時間処理した。再度、アセトン沈殿を行い、タンパク質を1/10 HENS buffer (10mM HEPES, 0.1mM EDTA, 0.01mM Neocuproine, 2% SDS (pH8.0)) 250 μ lに溶解し、Neutralization buffer (25mM HEPES, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% TritonX-100 (pH7.5)) 750 μ lを加えてビオチン化サンプルとした。

続いて、ビオチン化サンプルを1/10 HENS buffer と Neutralization buffer の混合溶液(1:5)で平衡化した Neutravidin-agarose beads 50 μ lと混合し、4℃で18時間インキュベートした。600mM NaClを含むNeutralization buffer でビーズを洗浄後、DTTを含んだ1/10 HEN buffer (10mM HEPES, 0.1mM EDTA, 0.01mM Neocuproine (pH8.0))により、結合したビオチン化タンパク質を溶出した。溶出液をSDS-PAGEに供した後、ゲルからペプチドを回収し、LC-MSに供してタンパク質の同定を行った。

A. fumigatus におけるNOシグナルの検出

A. fumigatus の胞子を Czapek-Dox (CD) 培地に2 \times 10⁶個/mlとなるように植菌し、37℃で24時間振とう培養を行った。その後、DAF-FM DAを最終濃度15 μ Mとなるように添加し、20分後に48℃の恒温槽に移動、または過酸化水素(最終濃度0.3%)を添加、1時間後に水洗し、Axio observer 蛍光顕微鏡システム (Zeiss 社)

で画像を取得した。RNA-sequencing 解析については、CD培地で37℃、24時間振とう培養後、SNAP (最終濃度100 μ g/ml) を添加し、1時間後に菌体を回収してRNA抽出を行った。その後、Miseq システム (Illumina 社) によりRNA-sequencing を行い、CLC Genomics Workbench (CLC 社) にてデータ解析を行った。二次代謝遺伝子クラスターの発現解析については、Brilliant Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Roche 社) を用いて、リアルタイムPCR (CFX Connect, BioRad 社) により行った。また、臨床から分離した *A. fumigatus* 株については、千葉大学真菌医学研究センターに分与していただき、各菌株のNO感受性を検討した。

結果および考察

NOの合成制御機構：ヘム依存的酸化酵素がNO産生に及ぼす影響

哺乳類NOSにおいて、基質であるアルギニンはオキシゲナーゼドメインのヘムを含んだ活性中心において酸化され、NOが合成される (Förstermann & Sessa, 2012)。我々はこれまでに、酵母のNOS様活性に関わる分子としてフラボタンパク質Tah18を同定したが (Nishimura *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2016)、Tah18はレダクターゼ様タンパク質であり、オキシゲナーゼドメインと相同なアミノ酸配列を有していない (Fig.4)。そこで、ヘム依存的な酸化酵素がNO産生に及ぼす影響を解析した。まず、ヘム結合および酸化酵素であると報告されている酵素、または推測される酵素をコードする遺伝子をリストアップし、Yeast MATa Collectionの当該遺伝子破壊株をYPD培地でOD₆₀₀=1.0まで培養し、過酸化水素処理下でのNO産生を評価した。その結果、野生型株においては過酸化水素処理時間に伴って蛍光強度が上昇

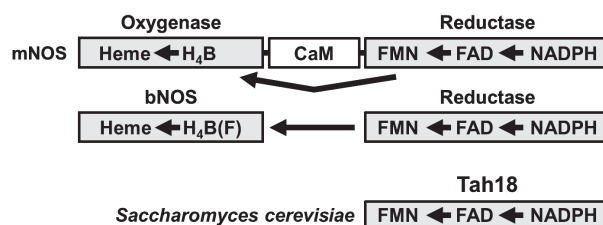


Fig. 4 Structure of mammalian nitric oxide synthase and Tah18. Primary structures of mammalian NOS (mNOS), bacterial NOS (bNOS), and Tah18 were shown. Arrows show electron flow. H₄B and H₄F indicate tetrahydrobiopterin and tetrahydrofolate, respectively. Tah18 is homologous only to the reductase domain of mNOS.

したが、ある遺伝子 (X) の破壊株では蛍光強度がほとんど上昇しなかった (Fig. 5A). 続いて、その遺伝子産物の阻害剤を酵母の培養液に加え、NO 産生に及ぼす影響を解析したところ、阻害剤未処理条件下では過酸化水素処理に伴って蛍光強度が上昇したが、阻害剤処理条件下では、蛍光強度の上昇は完全に阻害された (Fig. 5B). 以上のことから、ある種のヘム依存的酸化酵素が、NOS 活性が発現する際にオキシゲナーゼ様の機能を果たしている可能性が考えられた。今後、この遺伝子産物が Tah18 活性に依存した NO 合成機構にどのように関与するかについて、詳細な解析を行う予定である。

NO の合成制御機構：Tah18 と相互作用するタンパク質の同定と NO 産生に及ぼす影響

Tah18 の過剰発現株 (TAH18-OE) および His タグ融合型 Tah18 の過剰発現株 (6His-TAH18-OE) を、それぞれ過酸化水素処理し、過酸化水素処理条件下で特異的に Tah18 と相互作用するタンパク質を網羅的に同定した (Fig. 6A). 次に、同定したタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を Yeast MATa Collection より選出し、過酸化水素処理条件下での NO 産生について評価した。その結果、ある遺伝子 (Y) の破壊株においては、過酸化水素に反応した NO 産生がほぼ完全に阻害された (Fig. 6B). その遺伝子産物は NADPH の代謝に関連する酵素であり、ある種の NADPH 代謝関連酵素が NOS 活性の発現に重要である可能性が考えられた (論文準備中). 今後、この遺伝子産物が Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構にどのように関与するかについて、詳細な解析を行う予定である。

NO の合成制御機構：Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構の生物間保存性

我々はこれまでに、Tah18 依存的な NO 合成が、Tah18 と Dre2 の相互作用によって負に制御されることを報告している (Yoshikawa *et al.*, 2016). 哺乳類は主に NOS により NO を合成しているが、Tah18 のオルソログとして NADPH 依存性ジフラビンオキシドレダクターゼ 1 (NDOR1) を、Dre2 のオルソログとしてサイトカイン誘導性アポトーシスインヒビター 1 (CIAPIN1) をそれぞれ有している (Banci *et al.*, 2013). そこで、NDOR1 および CIAPIN1 を酵母で発現させて、その機能を解析することで、Tah18-Dre2 複合体による NO 合成制御機構が、酵母以外の生物においても存在しているかどうか検証した。

まず、TAH18 遺伝子を NDOR1 遺伝子に、DRE2 遺伝子を CIAPIN1 遺伝子にそれぞれ置換した株 (NC) を作製し、過酸化水素処理条件下での NO 産生を評価した。その結果、NC 株は野生型株と同様に、過酸化水素処理に伴って NO を産生した (Fig. 7A). 次に、この条件下での NDOR1 および CIAPIN1 の挙動を解析するため、免疫共沈降法を用いて両者の相互作用について評価した。その結果、過酸化水素処理に伴い、NDOR1 による免疫沈降画分中、および細胞抽出液中の CIAPIN1 タンパク質量が低下した (Fig. 7B). これらのことから、NDOR1 と CIAPIN1 は過酸化水素処理に伴って解離し、また CIAPIN1 は同時に分解されることが明らかになった。この結果は、NDOR1-CIAPIN1 が Tah18-Dre2 と同様の機構で、既知の NOS とは異なる NO 合成に寄与することを示唆している。また、Tah18-Dre2 複合体に依存的な NO 合成とその制御機構が、哺乳類を含む高等生物にも広く保存されている可能性が示された (論文投稿中)。

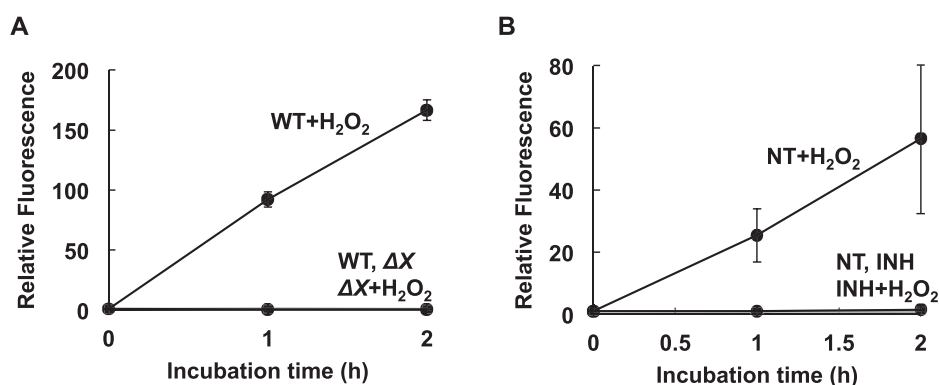


Fig. 5 Effect of the heme-dependent oxygenase-like enzyme on NO production in yeast. The intracellular NO production was measured by FCM. The relative fluorescence intensity was calculated with the average fluorescence at 0 h as 1. (A) WT and ΔX indicate the wild-type and the X gene-disrupted strains, respectively. (B) The relative fluorescence intensity of the X gene-disrupted strain. NT and INH indicate non-treatment and treatment conditions with the inhibitors of the X gene product, respectively.

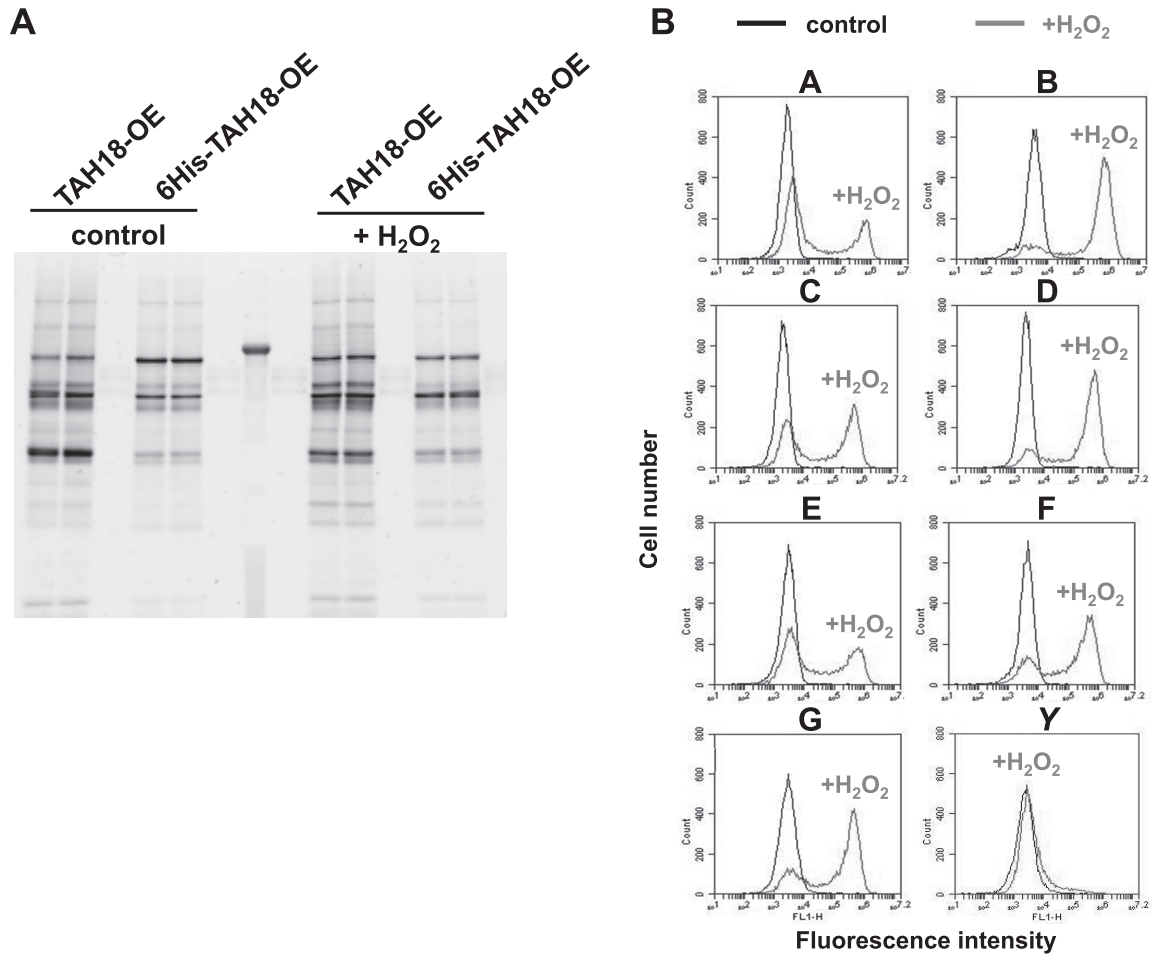


Fig. 6 Effect of proteins interacting with Tah18 on NO production in yeast. (A) Identification of the proteins, which interact with Tah18 under H₂O₂ treatment. Interaction proteins of Tah18 were subjected to SDS-PAGE, followed by identification with LC-MS analysis. (B) Disruptants of the genes encoding the proteins, which were identified as a protein interacting with Tah18, were cultured in SD medium and then their NO production under H₂O₂ treatment was measured with FCM. The *Y* gene encodes the protein involved in NADPH metabolism.

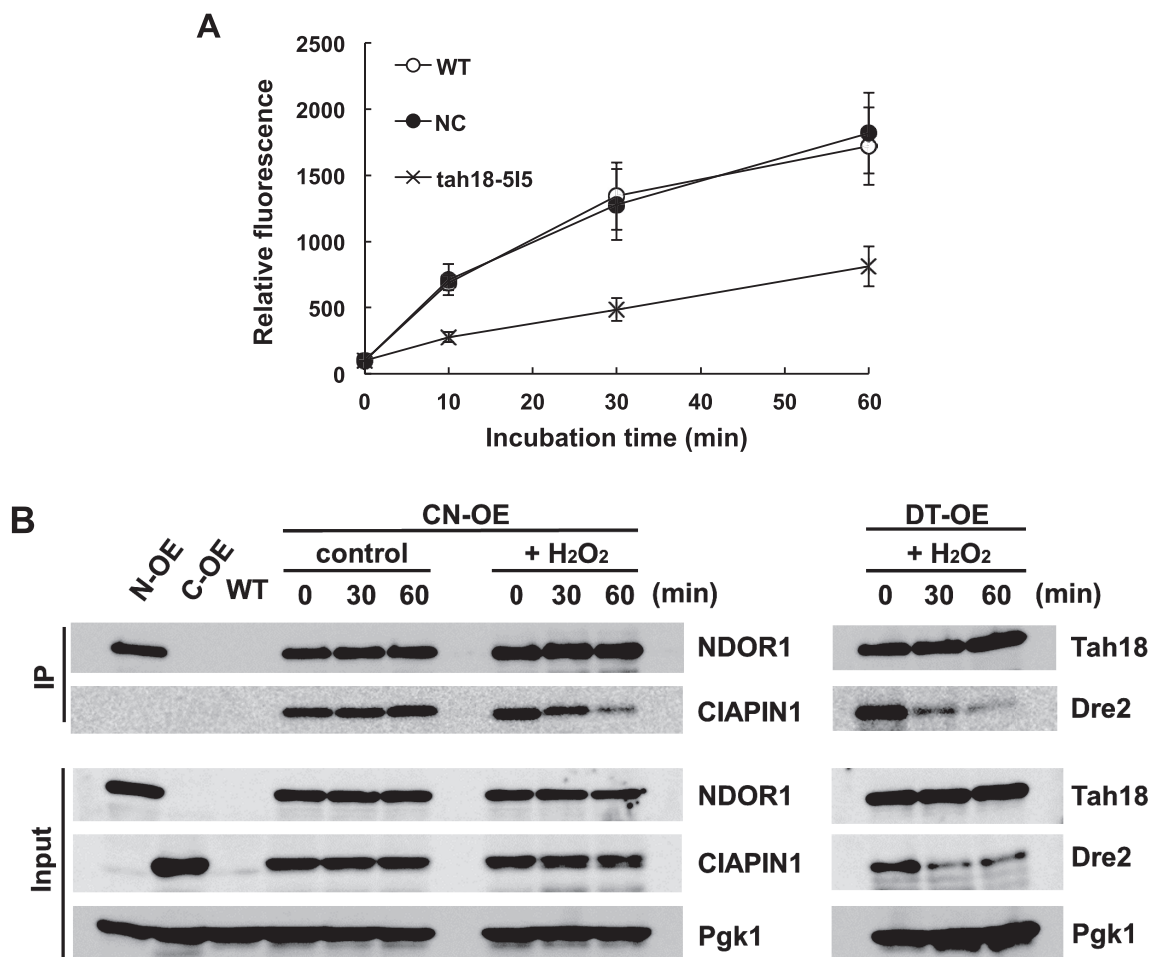


Fig. 7 Effect of NDOR1 and CIAPIN1 on NO production. (A) NO production of WT, NC, and tah18-515 strains was measured with FCM. (B) Interaction of NDOR1 with CIAPIN1 under H₂O₂ treatment. Cell extract was subjected to co-immunoprecipitation followed by western blotting. IP means co-immunoprecipitation using anti-GFP antibody conjugated beads.

NOの生理的役割：NOによりS-ニトロソ化されるタンパク質の探索と同定

NOが生理機能を発現する作用機序としては、sGC/cGMP経路によるものやタンパク質のSNO化によるものがある。酵母ゲノム上にはsGCのオルソログが保存されていないことから、酵母においてはタンパク質のSNO化が特に重要であると考えられる。そこで、ビオチンスイッチ法 (Forrester *et al.*, 2009) を用いたSNO化タンパク質のスクリーニング系を確立することを試みた。酵母抽出液を2mM GSNOで3時間処理したものをビオチンスイッチ法に供し、抗ビオチン抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果、GSNOの濃度依存的にビオチン化されたタンパク質が検出された (Fig. 8A)。さらに、Neutravidin-agarose beadsを用いたプルダウンアッセイにより回収したタンパク質をLC-MS解析に供

し、SNO化タンパク質を同定したところ、複数のタンパク質が同定された (Fig. 8B)。同定されたタンパク質には、TCA回路や解糖系の酵素が多く含まれていたことから、SNO化修飾により炭素代謝の中央経路が制御を受ける可能性が考えられた。

NOの生理的役割：正負二面性 (細胞保護・細胞死誘導)

*S. cerevisiae*では、過酸化水素処理に反応したTah18依存的な細胞死誘導が報告されている (Vernis *et al.*, 2009)。そこで、Tah18の発現抑制株およびTah18-Dre2融合株を高濃度 (2mM) の過酸化水素で処理し、細胞生存率を測定したところ、いずれも野生型株と比較して顕著に細胞死の割合が低下した (Yoshikawa *et al.*, 2016)。この結果は、高濃度の過酸化水素処理に伴いTah18依存的に合成されるNOが細胞死を誘導すること

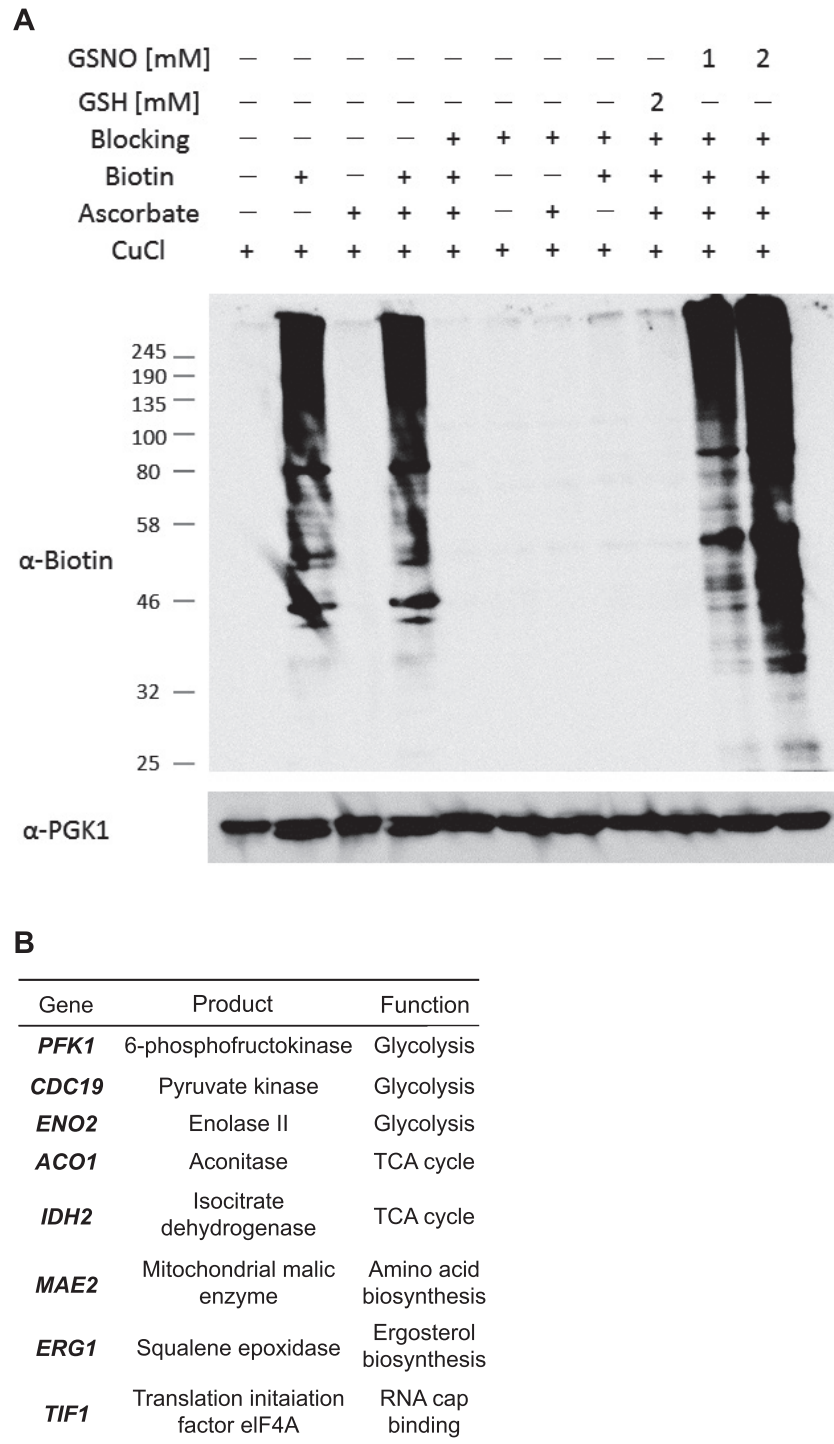


Fig. 8 Identification of S-nitrosylated protein in yeast. (A) Development of the biotin switch method using protein extract treated with GSNO. (B) List of identified gene products as S-nitrosylated proteins.

を示しており、NOは細胞保護だけでなく、細胞毒性にも関与することが明らかになった (Astuti *et al.*, 2016a; 2018) (Fig.9). これまでの研究から、酵母におけるNOの機能には哺乳類と同様に (Pacher *et al.*, 2007), 正負二面性がある点は注目すべきである。高温に対する細胞保護 (Nishimura *et al.*, 2013; Nasuno *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015) と過酸化水素処理時の細胞死誘導 (Almeida *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2016) は一見すると矛盾しており、NOはTah18依存的に合成されるにも関わらず、相反する機能 (細胞保護, 細胞死誘導) を有している。おそらく、細胞内NO濃度の違い (高温処理では、過酸化水素処理に比べてNOレベルが低い)、NOが生理機能を発現する環境の違い (高温処理と過酸化水素処理におけるROSレベルの違い) などが二面性を引き出す要因になっている可能性がある。

NO代謝が酵母の発酵特性に及ぼす影響

NOが酵母の発酵生産性に及ぼす影響を解析する目的で、NOの合成 (制御) や耐性、シグナル下流経路に関

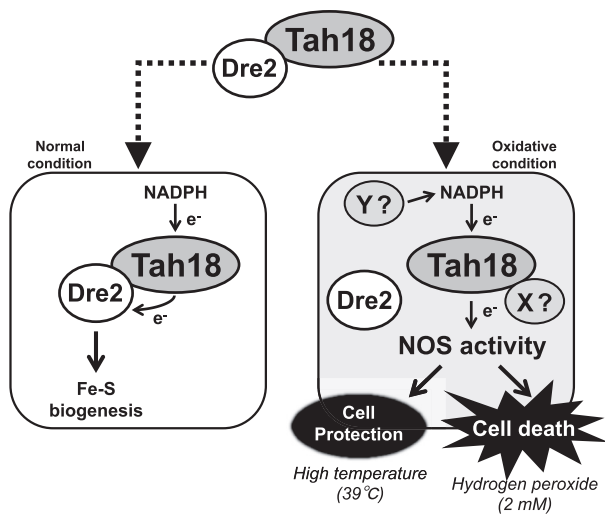


Fig. 9 The Tah18-Dre2 complex regulates cell protection and cell death through its NO-generating ability. Tah18 transfers electrons from NADPH to Dre2 for Fe-S cluster biogenesis under normal conditions. Oxidative stress induces the dissociation of Tah18 from Dre2, leading to a functional change of Tah18. Tah18 uses electrons from NADPH, which might be synthesized by the Y gene product, and exhibits the NOS-like activity that is dependent on the availability of NADPH. NO production derived from the Tah18-dependent NOS-like activity required for the X gene product as oxygenase is involved in cell protection or cell death. (Modified from Astuti *et al.*, 2016a)

わる遺伝子の破壊株 (実験室酵母) を用い、培養中に発生する炭酸ガス量をファーマグラフ (ATTO 社製) で測定することで、発酵力を評価した。その結果、反応性の高いNOの解毒に関与するNOジオキシゲナーゼ Yhb1 およびGSNOレダクターゼ Sfa1の遺伝子を同時に破壊した株では、炭酸ガスの発生速度および総発生量が野生型株に比べて有意に増加しており、発酵力が向上する傾向が見られた (data not shown)。今後、各菌株が生成するNO量を測定し、NOと発酵力との関連を詳細に解析する。また、Yhb1およびSfa1の遺伝子を破壊・過剰発現させた産業酵母 (パン酵母、清酒酵母、バイオエタノール酵母など) を作製し、発酵特性への影響を調べる予定である。

病原真菌におけるNOの合成機構と生理的役割

近年、*Candida* 属酵母の薬剤耐性が問題になっており、新たな予防法や治療法の開発が求められている。NOは貪食細胞や血管内皮細胞から分泌されており、感染防御やアポトーシスにも作用を示すことが知られている。そこで、酵母 *S. cerevisiae* (S288C株) に加え、*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. auris* の日本、韓国、インド、米国の株についてNO寛容性やNO産生量の解析を行った。その結果、過酸化水素処理に伴うNO産生は、*S. cerevisiae* では誘導が、*C. albicans* では抑制が、*C. krusei* および *C. tropicalis* では促進がそれぞれ見られたことから、*Candida* 属酵母ではNOの多様な産生誘導経路の存在が示唆された (論文投稿中)。また、NOに高い感受性を示す *Candida* 属酵母も存在しており、今後はNOを用いた真菌感染症の治療について検討する予定である。

Cryptococcus neoformans においては、NOの生成機構や生理機能を理解する目的で、生化学的手法によりNOの検出を試みたが、明瞭かつ再現性のある結果は得られていない。しかしながら、その過程で *C. neoformans* とNOの相互作用が示唆される結果を得た。YNB/10mM KPB (pH7.4) 培地にNOドナーのSodium nitroprusside (SNP) を添加後、インキュベートすると (30°C, 24時間)、培地中にNOの産生が認められた。一方、同じ培地に *C. neoformans* の菌体を共存させると、NOは全く検出されなかった (data not shown)。この結果から、*C. neoformans* がNOの分解酵素やスカベンジャーを培地に分泌、またはNOを細胞内に取り込み、分解するなどの可能性が考えられる。NOは宿主によって産生され、免疫システムとして機能するが、*C. neoformans* は一種のスカベンジャー機能を有しており、感染時に宿主の免疫機構 (NOを介した感染防御など) から逃れることが可能なのかも知れない。今後は *C. neoformans* における

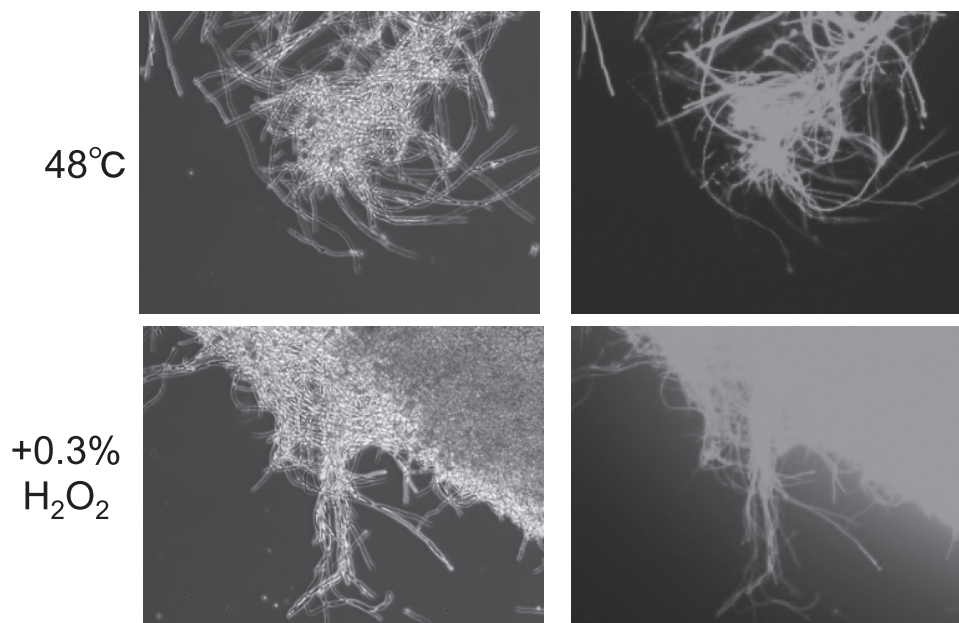


Fig. 10 Detection of fluorescent signal using DAF-FM DA in *A. fumigatus* upon stress treatments. The conidia of *A. fumigatus* were inoculated in liquid CD medium and cultured at 37°C, for 24h. DAF-FM DA was added in the medium (final concentration, 15μM). After 20 min the mycelia were cultured at 48°C for 1h or upon H₂O₂ treatment (final concentration, 0.3%) for 1h. The mycelia were harvested and washed with distilled water, and then observed under fluorescent microscope.

NOの機能を詳細に解析する予定である。

*Aspergillus fumigatus*においては、ストレスがNO産生を誘導するか検討した。その結果、高温または過酸化水素処理によって、DAF-FM DA由来の蛍光シグナルが検出され、菌糸内でNOが発生することが示された (Fig.10)。糸状菌のNO産生機構は不明であるため、*S. cerevisiae*のMpr1およびTah18のオルソログの関与について検討した。Mpr1, Tah18のアミノ酸配列をもとに、MprA (Afu2g0585), AfTah18 (Afu5g07290)をオルソログ候補としてそれぞれ見出し、遺伝子破壊株の作製を試みた。その結果、MprAの遺伝子破壊株 ($\Delta mprA$)を取得できたが、AfTah18の遺伝子破壊株は得られなかった。次に、 $\Delta mprA$ 株を用いて、高温や過酸化水素処理によるNO産生を観察したところ、野生型株と同様の表現型を示したことから、MprAはこれらの条件でのNO産生に重要でないことが示された。

また、NOに対する*A. fumigatus*の応答を解析するため、NOドナーのS-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)を添加1時間後に菌体からRNAを抽出し、RNA-sequencing解析を行った。その結果、*has*および*fsq*の二次代謝遺伝子クラスターの発現が誘導されることが明らかになった (data not shown)。これらのクラスター遺伝子は、NOC18やSNPなど他のNOドナーによって

も活性化された。現在、これらの二次代謝クラスターにより生合成される化合物の産生量が、NOに応答して変化するか解析中である。また、臨床から分離した*A. fumigatus*株 (16株)を対象に、NOドナーに対する感受性を検討したところ、超感受性を示す株を1株見出した (Hagiwara *et al.*, in press)。今後、超感受性機構を解明することで、糸状菌のNO応答機構に関する知見が得られるものと期待される。

要 約

本研究では、酵母におけるNOの合成機構と生理的役割の解明を目指すとともに、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解析を行った。その結果、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合成機構を提唱することができた。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、詳

細な解析を進めている。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により特異的にS-ニトロ化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た。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ていることから、NOと病原性との関連が強く示唆された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史. 2016. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素合成の制御機構. 酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会, 9月9-11日, 神戸
- 2) Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Watanabe, D. & Takagi, H. 2016. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. The 14th International Congress on Yeasts, 11-15 September, Hyogo, Japan
- 3) Takagi, H. 2017. Synthetic Mechanism and Physiological Role of Nitric Oxide in Yeast. Gordon Research Conference "Nitric Oxide", 19-24 February, Ventura, CA, USA
- 4) 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史. 2017. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素の合成制御機構と生理機能解析. 日本農芸化学会2017年度大会, 3月17-20日, 京都
- 5) Takagi, H. 2017. Nitric oxide in yeast: a double-edged sword "cell protection vs. cell death". The 12th International Meeting on Yeast Apoptosis, 14-18 May, Bari, Italy
- 6) 吉川雄樹, 那須野 亮, 渡辺大輔, 高木博史. 2017. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素の合成制御機構と細胞死誘導機構. 第17回日本NO学会学術集会, 5月19-20日, 徳島
- 7) 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2017. 酵母に見出した一酸化窒素の合成制御機構と細胞死誘導メカニズムの解析. 酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会, 9月11-13日, 東京
- 8) 示野誠也, 高木博史. 2017. 一酸化窒素によりS-ニトロ化されるタンパク質の同定. 第35回イーストワークショップ, 11月24-25日, 高松
- 9) 多和田健人, 高木博史. 2017. Tah18依存的な一酸化窒素合成に関与する因子の探索. 第35回イーストワークショップ, 11月24-25日, 高松
- 10) 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2017. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導機構. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 12月6-9日, 神戸
- 11) Hagiwara, D., Kowalski, C. H., Cramer, R. A., Takahashi, H., Takagi, H., Watanabe, A. & Kamei, K. 2018. Diversity of *Aspergillus fumigatus* clinical strains in the potential pathogenicity-related properties. The 8th Advances Against Aspergillosis, 1-3 February, Lisbon, Portugal
- 12) 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2018. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素合成の制御機構と細胞死誘導. 日本農芸化学会2018年度大会, 3月15-18日, 名古屋
- 13) 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2018. 酵母に見出したフラボタンパク質Tah18依存的な一酸化窒素の合成制御機構の解析. 第18回日本NO学会学術集会, 5月17-18日, 京都
- 14) 示野誠也, 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2018. 酵母におけるS-ニトロ化タンパク質の同定. 第18回日本NO学会学術集会, 5月17-18日, 京都
- 15) 示野誠也, 吉川雄樹, 那須野 亮, 高木博史. 2018. 酵母におけるS-ニトロ化タンパク質の探索・同定・機能解析. 第65回日本生化学会近畿支部例会, 5月26日, 西宮

原著論文

- 1) Hagiwara, D., Takahashi, H., Takagi, H., Watanabe, A. & Kamei, K. 2018. Heterogeneity in pathogenicity-related properties and stress tolerance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates. *Med. Mycol. J.* in press.

その他（総説・書籍）

- 1) Astuti, R. I., Nasuno, R. & Takagi, H. 2016. Nitric oxide signaling in yeast. *Appl. Microbiol. Biotech.* **100**: 9483-9497.
- 2) 高木博史. 2017. 酵母における一酸化窒素の分子機能と応用. *バイオサイエンスとインダストリー* **75**: 214-218.
- 3) 那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史. 2017. 酵母に見出した一酸化窒素 (NO) の合成制御機構と生理機能. *化学と生物* **55**: 617-623.
- 4) Astuti, R. I., Nasuno, R. & Takagi, H. 2018. Nitric oxide signalling in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* **72**: 29-63.
- 5) 那須野 亮, 吉川雄樹, 高木博史. 2018. 酵母における一酸化窒素シグナルを介したストレス応答機構. *生化学*, 印刷中.

保存機関に寄託した菌株

なし

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる助成をいただきました公益財団法人発酵研究所に深く感謝申し上げます。また、*Aspergillus fumigatus*に関する解析を行っていただいた千葉大学・真菌医学研究センターの萩原大祐特任助教（現・筑波大学生命環境系准教授）に厚くお礼申し上げます。

文 献

- Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Osorio, N. S., Kollau, A., Mayer, B., Leão, C., Laranjinha, J., Rodrigues, F., Madeo, F. & Ludovico, P. 2007. NO-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Sci.* **120**: 3279–3288.
- Astuti, R. I., Nasuno, R. & Takagi, H. 2016a. Nitric oxide signaling in yeast. *Appl. Microbiol. Biotech.* **100**: 9483–9497.
- Astuti, R. I., Watanabe, D. & Takagi, H. 2016b. Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nitric Oxide* **52**: 29–40.
- Astuti, R. I., Nasuno, R. & Takagi, H. 2018. Nitric oxide signalling in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* **72**: 29–63.
- Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Giachetti, A., Jaiswal, D., Mikolajczyk, M., Piccioli, M. & Winkelmann, J. 2013. Molecular view of an electron transfer process essential for iron–sulfur protein biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: 7136–7141.
- Domitrovic, T., Palhano, F. L., Barja-Fidalgo, C., DeFreitas, M., Orlando, M. T. & Fernandes, P. M. 2003. Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. *FEMS Yeast Res.* **3**: 341–346.
- Forrester, M. T., Foster, M. W., Benhar, M. & Stamler, J. S. 2009. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 119–126.
- Förstermann, U. & Sessa, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**: 829–837.
- Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. & Sibley, D. 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* **62**: 525–563.
- Heinrich, T. A., da Silva, R. S., Miranda, K. M., Switzer, C. H., Wink, D. A. & Fukuto, J. M. 2013. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br. J. Pharmacol.* **169**: 1417–1429.
- Li D. D., Yang, C. C., Liu, P., Wang, Y. & Sun, Y. 2016. Effect of nitric oxide on the antifungal activity of oxidative stress and azoles against *Candida albicans*. *Indian J. Microbiol.* **56**: 214–218.
- Liu, W. C., Yuan, H. M., Li, Y. H. & Lu, Y. T. 2015. *CKA2* functions in H₂O₂-induced apoptosis and high-temperature stress tolerance by regulating NO accumulation in yeast. *FEMS Yeast Res.* **15**: fov051.
- Nasuno, R., Aitoku, M., Manago, Y., Nishimura, A., Sasano, Y. & Takagi, H. 2014. Nitric oxide-mediated antioxidative mechanism in yeast through the activation of the transcription factor Mac1. *PLoS One* **9**: e113788.
- Nishimura, A., Kotani, T., Sasano, Y. & Takagi, H. 2010. An antioxidative mechanism mediated by the yeast *N*-acetyltransferase Mpr1: Oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. *FEMS Yeast Res.* **10**: 687–698.
- Nishimura, A., Kawahara, N. & Takagi, H. 2013. The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**: 137–143.
- Netz, D. J., Stümpfig, M., Doré, C., Mühlhoff, U., Pierik, A. J. & Lill, R. 2010. Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 758–765.
- Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**: 315–424.
- Patel, B. A., Moreau, M., Widom, J., Chen, H., Yin, L., Hua, Y. & Crane, B. R. 2009. Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 18183–18188.
- Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. & Takagi, H. 2012. Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. *Microb. Cell Fact.* **11**: 40 doi:10.1186/1475-2859-11-40.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. & Basalah, M. O. 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* **248**: 447–455.
- Shatalin, K., Gusarov, I., Avetissova, E., Shatalina, Y., McQuade, L. E., Lippard, S. J. & Nudler, E. 2008. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 1009–1013.
- Takahashi, S. & Yamasaki, H. 2002. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett.* **512**: 145–148.
- Vernis, L., Facca, C., Delagoutte, E. & Soler, N. 2009. A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PLoS One* **4**: e4376.
- Wink, D. A., Hines, H. B., Cheng, R. Y., Switzer, C. H., Flores-Santana, W., Vitek, M. P., Ridnour, L. A. & Colton, C. A. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukoc. Biol.* **89**: 873–891.
- Yoshikawa, Y., Nasuno, R., Kawahara, N., Nishimura, A., Watanabe, D. & Takagi, H. 2016. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide* **57**: 85–91.

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

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Molecular genetics studies of wood lignin degradation by the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus*: Towards systems synthetic biology

Takehito Nakazawa

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Oiwake-cho, Kita-shirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

In nature, white-rot fungi efficiently degrade lignin contained in wood biomass. Elucidation of molecular mechanisms underlying wood lignin biodegradation by white-rot fungi would contribute to the development of efficient and ecofriendly methods of producing valuable chemical products from wood biomass. In this study, we conducted molecular genetics studies to identify factors that play important roles in wood lignin degradation by the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus*, which will lead us to establish heterologous degradation of wood by non-white-rot fungi in future. We first created double-gene disruptants for *vp2* and *vp3* transcripts of which were shown to predominantly accumulate when *P. ostreatus* PC9 is grown on the beech sawdust medium in this study. However, it was suggested that these genes are dispensable for wood lignin degradation. Based on this result, we then performed comparative RNA-seq analyses among *P. ostreatus* strains that are defective in wood lignin degradation, which suggested the possibility of involvement of some extracellular enzyme genes in wood lignin degradation. We then created single- and double-gene disruptants for these genes. Furthermore, considering that lignin and hemicellulose are linked by covalent bonds in wood biomass, we also created single-gene disruptants for putative xylanase genes. However, we found only one gene, *xyn11b*, the disruption of which significantly decreased the ability to degrade wood lignin contained in the beech sawdust medium. Considering that the number of each of the aforementioned genes that is present in the genome of *P. ostreatus* as well as many other white-rot fungi are large, there remains the possibility that the paralogous genes of the disrupted gene(s) are involved in lignin degradation. In future, it appears to be necessary to create more multi-gene disruptants to identify factors that are important in lignin degradation.

Key words: lignin, white-rot fungi, wood biomass, molecular genetics

緒 言

木質は主に、多糖であるセルロース、ヘミセルロースおよび芳香族高分子リグニンという主要三大成分と呼ばれる高分子から構成される。セルロースは、 β -1,4-グルカンが水素結合によって同じ向きに集合して形成された繊維状構造（結晶性セルロース）の形状で主に存在して

いる（Kolpak & Blackwell, 1976）。ヘミセルロースは、アルカリで抽出される多糖の総称（この場合、結晶性セルロースは、ほとんど抽出されない）を表し、樹木の種類によって異なる。一般的には、広葉樹ではグルクロノキシランが、針葉樹ではガラクトグルコマンナンがそれぞれ主要なヘミセルロースであると報告されている（Girio *et al.*, 2010）。一方でリグニンは、基本的にはフェニルプロパン（C₆-C₃ユニット）骨格のリグニンモノマーが、結合および重合することで生合成される（Boerjan *et al.*, 2003）。主なりグニンモノマーとして3種類（近

E-mail: tnakazaw@kais.kyoto-u.ac.jp

共同研究者：井鷲裕司（京都大学大学院農学研究科）

年では4種類)知られており、樹木の種類によっても異なるが、一般には広葉樹はG核(Guaiacyl unit)とS核(Syringyl unit)、針葉樹はG核のみから成るとされている。このリグニンは、セルロースを被覆する形で存在しており、さらにヘミセルロースの構成成分であるいくつかの糖との間で共有結合が報告されている(Watanabe and Koshijima, 1988; Watanabe *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 2018)。また、一部のヘミセルロースは、セルロース繊維中の水酸基と水素結合を介して会合することで、セルロース繊維間をつなぐ役割を果たしていると考えられている(Zhang *et al.*, 2011; 2015)。このように、木質はセルロース、ヘミセルロース、リグニンが相互に会合しあって強固な構造を形成している。

自然界において、上述のように強固な木質は、多くの“きのこ”が含まれる真正担子菌の一部である“木材腐朽菌”によって主に分解される。木材腐朽菌は、木材の腐朽パターンから、原則的には褐色腐朽菌と白色腐朽菌に分類される。褐色腐朽菌は、木質中の結晶性セルロースを積極的に分解(低分子化)し、結果的に木はリグニンの色である褐色に腐朽される。この場合、リグニンは修飾された形で残存する(Arantes & Goodell, 2014; Jin *et al.*, 1990)。この褐色腐朽菌によるセルロース分解は、いわゆるセルラーゼ(β -1, 4-グルカナーゼ)による分解ではなく、フェントン反応などによって生成する菌体外ラジカルを介した、酵素によらない機構によるものだとされている。木質中の一部の多糖成分に関しては、分解可能な微生物が、木材腐朽菌以外にも報告されている。軟腐朽菌と呼ばれる、子のう菌である*Chaetomium*および*Trichoderma*属などは、上述の木材腐朽菌が腐朽しにくい、水分を多く含む木材中の多糖を分解可能であるとされている(Levy, 1966)。これらの菌類による腐朽は、いわゆるセルラーゼによる酵素分解であると考えられている。一方で白色腐朽菌は、木質中の多糖も分解可能だが、リグニンを優先的に分解し、結果的に木は多糖成分の色である白色に腐朽される。木質中のリグニンを単独で効率的に分解可能な生物は、現時点では白色腐朽菌のみとされている。

近年、石油や石炭などの化石燃料に替わる持続可能エネルギーとして、地球上に膨大な量が存在する木質バイオマスの活用が注目されている。木質に含まれる多糖は、今までも主に紙パルプなどの原材料となっていたが、サトウキビやトウモロコシなどの食糧と競合しないバイオエタノール原料として期待されている。しかし、木質中におけるリグニンと多糖の強固な結合は、植物バイオマス中の多糖類を利用する上で大きな障害となる。紙パルプをはじめとして、効率的な多糖類の工業的利用と高品質化成品の製造のためには、“不純物”となるリグニ

ンを除去することが求められる。リグニン除去方法として、現時点では高温高压処理に加えて強烈な薬品を用いた化学処理による方法が行われている。現行の方法では、エネルギー消費および環境負荷が大きいため、より省エネルギー・低環境負荷な形でのリグニンの効率的除去が求められる。また、多糖を利用する際の“邪魔者”扱いだったリグニンも、近年では化成品への利用が注目され始め、最近ではSIP-Lignin(<http://lignin.ffpri.affrc.go.jp>)をはじめとする大型国家プロジェクトも進行している。

樹木の主要三大成分に関して、その構造の一部を模倣した分子(および、木質中に含まれる成分を変性ならびに低分子化して可溶化させたもの)を分解する微生物由来酵素について、豊富な研究知見がある(Rytioja *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2015)。例えば、特定の多糖を分解する酵素(グルカナーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼなど)が単離され、酵素特性が調査されてきた。リグニン分解酵素に関しても、モデル化合物(リグニン中の構造の一部を合成した低分子化合物)を利用して、特定のリグニンモノマー間の結合を切断する活性を示す酵素、および芳香環を修飾ならびに開裂する活性を示す酵素に関する研究知見が豊富に存在する(Pollegioni *et al.*, 2015)。これらの酵素の研究は、木質バイオマスの化学処理と併用することで、効率的なリグニン由来の芳香族分子の除去および有用物質への変換などに寄与することが期待されている。しかし木質構造は、多糖とリグニンが相互に会合しあつた複雑かつ強固なものであることを踏まえると、微生物由来の酵素反応だけで木質バイオマスを処理し、効率的なリグニン除去および変換を達成することは困難である。

環境負荷が少なく、かつ効率的な木質バイオマス中のリグニン除去および変換方法への応用を目指して、白色腐朽菌によるリグニン分解の分子機構の解明を目指した研究が行われてきた。白色腐朽菌の間でも、生産される分泌酵素のパターンなどに違いが報告されている(Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012; Hori *et al.*, 2014)が、現時点では白色腐朽菌のみが分泌生産するとされている、いわゆるリグニン分解酵素と呼ばれるリグニンペルオキシダーゼ(LiP)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)、多機能型ペルオキシダーゼ(VP)が知られている(Pollegioni *et al.*, 2015)。その他に、ラッカーゼ(Lacc)やDye Peroxidase(DyP)も、しばしばリグニン分解酵素とみなされるが、これらの酵素は、褐色腐朽菌ならびに他の微生物なども生産することが報告されている(Ahmad *et al.*, 2011; Kersten & Cellen, 2014)。しかし、各白色腐朽菌のゲノム上に存在する、これらのリグニン分解酵素遺伝子のコピー数も様々であり、白色腐朽菌と

されている *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) など一部の白色腐朽菌では、上述のリグニン分解酵素をコードする遺伝子が存在しない場合もある (Kersten & Cullen, 2014)。

白色腐朽菌によるリグニンの効率的な分解機構は、いわゆるリグニン分解酵素の存在だけによって説明できる単純なものではないことも、同時に知られている。いくつかの白色腐朽菌においては、リグニン分解酵素が関与しないラジカル発生機構、メディエーターの存在、低分子化したリグニン断片を細胞内に取り込み代謝する機構などが、同様に重要であるとも考えられている (Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Kersten & Cullen, 2014)。例えば、Copper radical oxidase (CRO) の一部に分類されるグリオキサル酸オキシダーゼ (GLX) をコードする遺伝子は、現時点では白色腐朽菌ゲノム上にもみ分布していることが知られている。この酵素は、リグニン分解酵素が活性を示すために必要な菌体外 H_2O_2 の生成に関与していると考えられている (Kersten *et al.*, 2014)。その他の CRO をコードする遺伝子は、褐色腐朽菌も保有しているが、それらのタンパク質および遺伝子の機能と役割は不明である。木質中におけるキシランとリグニンとの間の共有結合の存在を踏まえると、キシラナーゼがリグニン分解にも影響する可能性も考えられる。また、そもそも上述のリグニン分解酵素は、リグニン誘導体およびモデル化合物などに対する反応性は報告されてきたが、実際の木質中のリグニンを分解していることを支持する証拠は乏しい。

以上のように、白色腐朽菌による木質中のリグニン分解に関して、過去から現在に至るまで、生化学、細胞生物学、ゲノム科学など多岐に渡る研究報告があるにも関わらず、実際のリグニン分解に不可欠な因子の同定までは行われてこなかった。この主要な原因は、木材腐朽菌 (担子菌) を用いた分子遺伝学研究の難しさにある。特に、狙った遺伝子を破壊することが難しかった。このため、先行研究において木質中のリグニン分解に重要だと“考えられる”因子が発見されたとしても、その機構 (遺伝子) だけが特異的に変異および喪失した場合に、実際の木質中のリグニン分解能力が低下するかを明確に示すことが難しかった。しかし、Salame *et al.* (2012) によって、リグニン分解酵素遺伝子をゲノム中に多コピー保有する典型的な白色腐朽菌の一種であるヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) において、効率的な遺伝子ターゲティング実験が可能になった。しかし、ヒラタケを含む大部分の白色腐朽菌ゲノム上には、リグニンを含む木質成分の分解に関与しそうな酵素 (例えば、前述のリグニン分解酵素やトランスポーターなど) をコードする遺伝子が複数コピー存在する 경우가多い。実際に、MnP および VP の間

での機能の冗長性を示唆する報告も存在する (Salame *et al.*, 2013)。このことから、遺伝子ターゲティングが可能になったとしても、遺伝子の単独破壊だけでは木材腐朽 (今回の場合は、白色腐朽菌によるリグニン分解) の研究への適応が難しいことが示唆されていた。しかし、Salame *et al.* (2012) の報告に続いて、ヒラタケではマーカーリサイクル法による多重遺伝子破壊 (Nakazawa *et al.*, 2016) および新規薬剤選択マーカー (Matsunaga *et al.*, 2017) も利用可能となり、本菌によるリグニン分解機構を分子遺伝学から研究することが可能な基盤が整備された。また一方で、古典的な遺伝学技術と近年の次世代シーケンサー解析技術を組み合わせることで、ヒラタケにおける効率的な順遺伝学研究が可能になった。現在までに真正担子菌で高く保存されている Zn finger モチーフを有する真正担子菌に特徴的な推定上の DNA 結合性転写因子をコードする *wtr1*, 推定上のクロマチン構造変換因子をコードする *chd1*, ペルオキシソーム形成に必須なタンパク質をコードする *pex1* の遺伝子変異が、アントラキノン系色素 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) ならびにアゾ系色素 Orange II の脱色能力に欠陥を生じることが示された。これらの遺伝子変異および破壊株では、ブナ木粉培地中のリグニン分解活性も実際に低下していた (Nakazawa *et al.*, 2017a; Nakazawa *et al.*, 2017b)。

近年、ゲノム科学および微生物および植物を用いた物質生産関連の研究では、合成生物学という言葉がしばしば用いられるようになった。この言葉は主に、「微生物ゲノムを、一から合成的につくる」「生合成遺伝子群を異種発現させることで、有用成分を異種生産する」研究に用いられている。リグニン化学の分野でも、植物細胞壁中のリグニン生合成に関与する遺伝子を遺伝子組換えによって操作し、人為的に構造変化させる研究が行われはじめた。このような研究が、しばしば合成生物学として記述される (Eudes *et al.*, 2014)。白色腐朽菌によるリグニン分解機構に不可欠な因子を遺伝学研究によって特定し、より取り扱いが容易な非木材腐朽性担子菌および軟腐朽菌に該当する一部の子のう菌でリグニンの“異種分解系”を構築することができれば、より効率的な木質処理につながると考えられる。本研究では、リグニンの異種分解系構築 (リグニン分解の合成生物学) へと繋げて行くことを最終目的として、分子遺伝学研究が可能になった白色腐朽菌ヒラタケにおけるリグニン分解機構を成立させている重要な因子を明らかとする研究を行った。

実験方法

菌株、培養条件および遺伝学実験法

ヒラタケ野生型株 PC9 (Larraya *et al.*, 2000) 由来プ

ロトプラストへのUV照射によるRBBRの脱色不全突然変異体の取得は、Nakazawa *et al.* (2017b)に従って行った。このRBBR脱色能力は、ヒラタケにおいてリグニン分解能力とある程度相関する指標として、しばしば用いられている (Vyas *et al.*, 1995; Salame *et al.*, 2010)。得られた変異体の遺伝分析のため、野生型株PC15 (Larraya *et al.*, 1999) と交配させてF₁子孫を得た。このF₁子孫集団を用いて、色素脱色不全の表現型と連鎖する遺伝マーカー (Nakazawa *et al.*, 2017b) の同定を行った。

ヒラタケにおける相同組換えによる遺伝子破壊は、PC9由来の*ku80*破壊株である20b株 (Salame *et al.*, 2012)を用いて行った。20b株由来の*vp2*破壊株は、Salame *et al.* (2014) で作成されたものを用いた。各遺伝子の破壊カセット作成は、Nakazawa & Honda (2015) に従って行った。遺伝子破壊の際は、形質転換マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子 (Salame *et al.*, 2012) およびピアラフォス耐性遺伝子 (Matsunaga *et al.*, 2017) を用いた。形質転換体を得た後、ハイグロマイシン含有培地上で二次選抜を行なった後、得られた株からゲノムDNAを抽出し、PCRによって遺伝子破壊の確認を行なった。

本研究では、先行研究 (Nakazawa *et al.*, 2017a; Nakazawa *et al.*, 2017b) で作成された20b株由来の*wtr1*遺伝子破壊株である*wtr1d#1*株、PC9由来の*chd1-1*変異体であるUVJ3-3株、20b/1株 (Nakazawa *et al.*, 2016) 由来の*pex1*破壊株であるD14d#1を、RNA-seq解析のために用いた。

上記で得られた変異体および遺伝子破壊株をブナ木粉培地上で培養した際の菌体外酵素活性および木質中のリグニン分解能力について、野生型株もしくは親株 (PC9もしくは20b株) と比較解析を行った。この場合、各ヒラタケ株は、直径4cm ガラスシャーレに、6% (木粉重量比) の小麦ふすまを添加したブナ木粉培地上で18もしくは28日間静置培養した (プレート1枚あたり、4.4gの木粉培地と10.8mlの水を加えた)。酵素活性測定を行う場合は、予めトルエン・エタノール処理を80℃にて1時間4回行って脱脂した、6% (木粉重量比) の小麦ふすまを添加したブナ木粉培地を用いた (プレート1枚あたり、2gの脱脂木粉培地と6mlの水を加えた)。リグニン分解量を定量する場合は、30-55メッシュのブナ木粉 (脱脂処理は行っていない) を用いて木粉培地を作成した。酵素活性測定を行う場合は、木粉の粒径は揃えていない (おおよそ直径2mm以下)。本研究では、培養は暗黒下28℃で行った。

変異体ゲノムのリシーケンス解析およびバイオインフォーマティクス処理

各ヒラタケ突然変異体から、Nakazawa *et al.* (2017b)

に従ってゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサー (HiSeq2500) を用いてゲノムリシーケンスを行った。得られたデータは、Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) を用いて、PC9ゲノム配列上にアライメントさせた。これから得られたSAMファイルは、Samtools (Li, 2011) を用いてBAMファイルに変換し、ソートした。これによって得られたデータを、Integrative genome viewer (IGV) 上で可視化した。PC9由来の変異体とPC15間から得たF₁子孫を用いた遺伝分析の結果に基づき、原因変異遺伝子が存在すると考えられるゲノム領域周辺を調査し、原因変異遺伝子候補となる遺伝子を同定した。

菌体外酵素活性の測定

ヒラタケPC9株のゲノム上には、MnPおよびVPをコードする遺伝子を合計9種類あり、LiPは存在しないことがわかっている (Knop *et al.*, 2015)。従って、本菌における主要なリグニン分解酵素の活性は、Mn²⁺依存性ペルオキシダーゼ活性で評価できると考えられている。いずれも親株である20bと同等の菌体外Mn²⁺依存性ペルオキシダーゼ活性を示した。予め脱脂したブナ木粉培地上で、各ヒラタケ株を13および20日間培養した。培養後、菌体を含む木粉培地を0.1M乳酸バッファー (pH4.5) に懸濁し、遠心して得られた上澄み液を用いて酵素活性測定を行なった。基質として、2-メトキシフェノールを用いた。1分間で465nmの吸光度を1上昇させる酵素活性を、本研究では1Uと定義した。Mn²⁺依存性ペルオキシダーゼ活性測定の手順は、Kamitsuji *et al.* (2004) に従って行った。酵素活性は、木粉プレート1枚あたりの酵素活性で計算した。

腐朽ブナ木粉培地に含まれる残存リグニンの定量

ブナ木粉培地上で、各ヒラタケ菌株を28日間培養した。培養後の木粉培地に含まれる残存リグニン量の定量は、Klason法にて行った。培養終了後、まずトルエン・エタノール (2:1 v/v) を用いて脱脂処理を行った (室温にてスターラー攪拌を1時間2回)。乾燥後、残存木粉培地の重量 (菌体も含む) を正確に測定した。この一部 (約0.5g) を測りとり、74% (w/w) 硫酸を7.5ml加えて室温で2時間膨潤させた。その後、250mlの水を加えて、2時間120℃オートクレーブをかけた。沈殿物を吸引ろ過で回収し、24時間以上50℃で乾燥させた酸不溶性リグニン (Klasonリグニン) 重量を正確に測定した。以上の測定値をもとに、木粉培地1プレートあたりのKlasonリグニン量を計算した。ヒラタケ株を植菌していないプレートと比較した場合のKlasonリグニン減少量を計算することで、各ヒラタケ株による木質中のリグ

ニン分解量を評価した。

全 RNA の抽出および RNA-seq 解析と定量 RT-PCR 解析

予め脱脂したブナ木粉培地上で、各ヒラタケ株を 13 日間培養したサンプルから全 RNA を抽出した。木粉と菌糸を一緒に回収し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて全 RNA を抽出した後、DNase 処理を行った。得られた RNA の品質チェックの後、RNA-seq 解析および定量 RT-PCR 解析を行った。PC9 および 20b 株については、同じ木粉培地上で 6、20 および 28 日間培養したプレートの菌体からも全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 解析 (Paffl, 2001) に用いた。

RNA-seq 解析は、次世代シーケンサー (HiSeq2000) を用いて得たデータをトリミング処理後、PC9 のゲノムおよび遺伝子アノテーション情報を利用し、Tophat (Langmead *et al.*, 2009) を用いてアライメントを行なった。得られた BAM ファイルは、featureCount (Liao *et al.*, 2014) を用いて、遺伝子毎のリードカウント数を計算し、FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) を算出した。この値は、各株における転写量を比較する際の指標となる。

また、各遺伝子の発現解析のため、リアルタイム PCR を用いた比較定量も行なった。各遺伝子に特異的なプライマーを用いた場合の cDNA 増幅効率を計算した上で、Paffl *et al.* (2001) に従って、転写産物の量について比較定量を行なった。本研究では、 β -tubulin 遺伝子を用いて、各遺伝子の転写量を標準化した。

Pichia pastorias を用いた酵素の分泌生産およびキシランナーゼ活性測定

分泌発現プラスミドを作成し、*Pichia pastorias* X33 株

に導入した。遺伝子組換え体の培養およびメタノールによる酵素の分泌発現誘導は、EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, CA, USA) に従って行った。発現させた酵素を含む培養液上清をマイクロチューブにとって遠心し、上澄み 100 μ L と 100 μ L の 0.1M 乳酸バッファー (pH4.5) に溶解させた市販の基質 (ブナ由来キシラン) 2mg とを混合し 37 $^{\circ}$ C 1 時間反応後、2 倍量の DNS 試薬 (還元末端量を定量する試薬) と 95 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ、535 nm の吸光度変化からキシラン分解活性 (還元末端生成量) を評価した。この際、発現ベクターを導入していない株 (X33 株) を培養した培養液を用いて、同様の操作を行ったサンプルの吸光度を 0 とした。なお、本研究におけるキシラン分解酵素活性は、上述の反応条件において 1mol の還元末端を生成する酵素活性を 1U と定義した。本研究では、既知濃度のキシロース溶液の希釈系列を用いて検量線を作成することで、各反応サンプルに含まれる還元末端量を決定した。

結 果

vp2、*vp3* の二重破壊が、ブナ木粉培地中のリグニン分解能力に与える影響

ヒラタケ PC9 株、20b 株、ならびに 20b/1 株を、ブナ木粉培地で 13 日間 (これらの株では、リグニン分解進行と相関する木粉培地の白化が十分に観察される培養期間) 培養した場合の全 RNA サンプルを用いて RNA-seq 解析を行った。この結果、当該培養条件では推定リグニン分解酵素 [3 種の VP、6 種の MnP、10 種のラッカーゼ (Lac)、4 種のダイペルオキシダーゼ (DyP)] をコードする遺伝子の全転写量 (FPKM 値で計算) のうち、*vp2* と *vp3* が全体の約 85% 程度を占めることが明らかとなった (Fig. 1)。

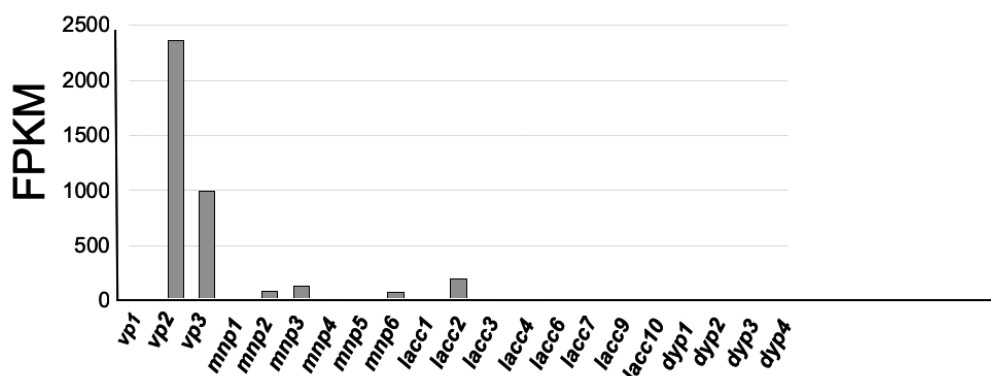


Fig. 1 Transcript accumulation of putative ligninolytic enzyme genes. *P. ostreatus* PC9 was grown on sawdust medium for 13 days. FPKM value for each ligninolytic gene was calculated based on RNA-seq data (n=1). “vp”, “mnp”, “lacc”, and “dyp” indicate versatile peroxidases, manganese peroxidases, laccases, and dye peroxidases, respectively.

以上を踏まえて、*vp3* 遺伝子の単独および *vp2*, *vp3* の二重破壊株を作成し、ブナ木粉培地中のリグニン分解能力を調査した。その結果、上記の重破壊株を木粉培地で18日間および28日間培養した場合、親株である20b株と比較して、顕著な木質中のリグニン分解能力の量的な減少は確認されなかった (Fig.2)。また、*vp2* 単独破壊株および *vp2*, *vp3* 二重遺伝子破壊株では、2-メトキシフェノールを基質とした場合の Mn^{2+} 依存性ペルオキシダーゼ活性 (MnP および VP の活性だと考えられる) がほとんど消失していた。また、*vp3* 単独破壊株においても減少していた (Fig.3)。

RBBR 脱色不全をきたす突然変異体の原因変異遺伝子の同定

ヒラタケ PC9 株に対して、致死率が約 90% になるように UV 照射を行なった。この場合、およそ 100 から 200 株につき 1 株の割合で、RBBR 脱色不全をきたす突然変異体が得られた。リグニン分解能力に不全をきたす突然変異体 UVRM5, UVRM22, UMRM25, UVRM28 を得た。これらの変異体と PC15 を交配した二核菌糸 (ダイカリオン) より子実体を発生させることで胞子を得て、 F_1 子孫を取得した。また、それぞれの変異体と PC15 株を交配させて得た二核菌糸の表現型を観察した結果、UVRM22 の変異表現型は優性形質であり、それ以外の突然変異体は劣性形質であることが示唆された。それぞれの F_1 子孫のうち、顕著な RBBR 脱色能力不全をきたす株ならびに、野生型株である PC9 と同等の脱色能力を示す株を選び出し、簡易マーカーを用いた連鎖解析を

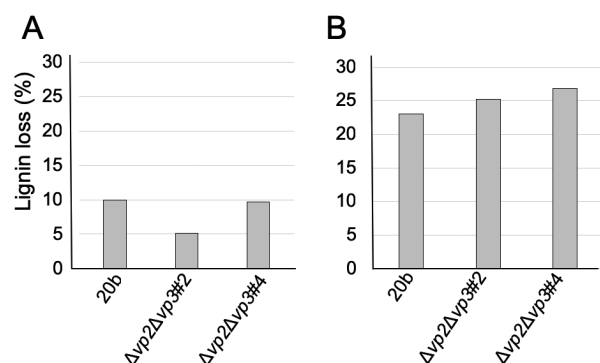


Fig. 2 Effects of *vp2/vp3* double-gene disruption on the ligninolytic activity. The degradation of wood lignin was determined after the growth in sawdust medium for 18 days (A) and 28 days (B) ($n=1$). Lignin loss indicates decrease in the weight of Klason lignin per plate compared with the plate without inoculation of *P. ostreatus* strain (0.8310 g/plate).

行うことで、原因変異遺伝子が存在する領域を推定した。なお、UVRM22 に関しては、優性的に子実体発生不全であったため、 F_1 分析を行うことができなかった。その後、変異体のゲノム・リシーケンス解析を行った。上記の実験を通して推定された領域に存在する遺伝子変異 (この時点では、推定原因変異遺伝子) を特定した後、それら遺伝子の破壊株を作成した。遺伝子破壊株の表現型を観察した結果、現時点までに新たに2種類のリグニン分解能力に影響を与える遺伝子が同定された。UVRM22 由来の変異遺伝子 (優性的だと考えられる) を野生株に導入した場合、RBBR 脱色不全および子実体発生不全になることが示された (data not shown) ことから、原因変異遺伝子と特定された。この原因変異遺伝子は、真正担子菌において高く保存されている推定状の Zn finger モチーフを有する DNA 結合性転写因子をコードしており、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) において、子実体形態形成関連遺伝子 *gat1* と命名されたものに相当する (Ohm *et al.*, 2011)。UVRM28 の推定原因変異遺伝子は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において、HIR 複合体に含まれる因子である HIRA (ヒストンシャペロンだと考えられている) のホモログをコードする遺伝子であった (Gal *et al.*, 2015)。

リグニン分解不全株間の比較 RNA-seq 解析

ブナ木粉培地上で13日間培養した UVJ3-3 変異体およびその野生型株である PC9, *wtr1* および *pex1* 破壊株とそれらの親株由来の RNA を用いて、比較 RNA-seq 解析を行った。本研究では、変異体および破壊株において、

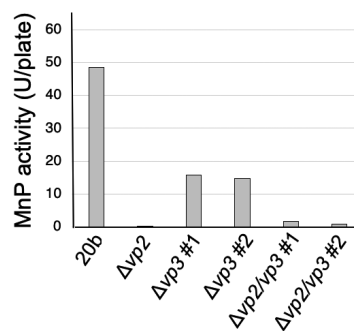


Fig. 3 Extracellular Mn^{2+} -dependent peroxidase activity when 20b and each *vp2* and/or *vp3* disruptant was grown on sawdust medium for 13 days ($n=1$). One unit (1U) of activity for guaiacol oxidation was defined as the amount of enzyme that increased the absorbance at 465 nm by 1.0 per min in this study. MnP activity indicates Mn^{2+} -dependent peroxidase activity, which was calculated by subtracting the activity determined in the absence from that in the presence of 0.2 mM Mn^{2+} .

それぞれの野生型株と比較してFPKM 値（RNA-seq 比較解析時の転写発現量の指標となる値）が1/10以下となった遺伝子を転写発現が顕著に減少した遺伝子、発現が10倍以上になっていた遺伝子を顕著に転写発現が増加した遺伝子とした。リグニン分解不全で共通して転写発現が著しく減少している遺伝子の中に、これらの3株がリグニン分解不全の原因となった遺伝子が存在する可能性を考えた。

GLXを含む、2種類のCROをコードすると推定される遺伝子が、リグニン分解不全株で共通して転写減少していることが明らかとなった。また、別のもう一つのCRO遺伝子が、UVJ3-3と*pex1*破壊株において共通して転写減少していた。以上を踏まえて、これらのCRO遺伝子を破壊候補とした（Table 1）。また、2種類のJacalin-like lectin domainを有する機能未知タンパク質をコードする遺伝子が、共通して転写減少していた。このレクチンドメインは、Mannose-binding lectin domainだとアノテーションされているが、現時点で実際の機能は不明である。しかし、木質バイオマス中には、リグニン間と共有結合が報告されているヘミセルロースが存在すること、ならびに白色腐朽菌では、多くの多糖分解酵素に多糖結合モジュールを有していることを踏まえると、このようなドメインを持つタンパク質の機能不全がリグニン分解不全に関与しているかもしれない。以上より、これらの2つの遺伝子も破壊対象とした（Table 1）。また、Cupredoxinをコードすると推定される遺伝子およびHemopexinをコードすると推定される遺伝子も、リグニン分解不全株3株で共通して転写減少していた。Cupredoxinは、銅を活性中心に持つ酸化還元酵素であり、いくつかのオミックス解析の文献において、白色腐

朽菌と褐色腐朽菌の両方において木質バイオマスの分解に関与する可能性が示唆されていた（Alfaro *et al.*, 2016; Gaskell *et al.*, 2016）。HemopexinはMnP, VP, LiPのようなペルオキシダーゼの活性に必要なヘム輸送に関わる可能性が考えられることから、これらの遺伝子も破壊対象とした（Table 1）。

本研究で破壊対象とした上述の遺伝子の転写発現量は、上記のRNA-seq解析（n=1）以外にも、複数サンプルを用いた定量RT-PCRによって再現性を確認した。また、本研究で新たに同定した2種類のリグニン分解不全変異株（および遺伝子破壊株）においても、同様に転写量が顕著に減少していることが明らかとなった（data not shown）。

各遺伝子破壊株が木質中のリグニン分解能力に与える影響

前項で破壊対象とした遺伝子の単独および二重破壊株を作成した。まず、本研究で得た破壊株を脱脂木粉培地上で13日間培養し、2-メトキシフェノールを基質とした際の菌体外Mn²⁺依存性ペルオキシダーゼ活性を測定した（Fig. 4）。次に、木粉培地中に含まれるリグニン分解能力の比較解析を行った。各遺伝子の単独および二重破壊株ならびに親株である20b株を、28および18日間木粉培地上で培養し、プレートあたりのリグニン減少量を計算した（Figs. 5 and 6）。これらの結果からは、本研究で調査した全ての単独および二重遺伝子破壊株において、20b株と比較した場合の木質中のリグニンの分解能力が顕著に低下しないことが明らかとなった。

Table 1 Genes disrupted in this study.

Protein ID ¹	annotation
62347	Glyoxal oxidase
64440	Jacalin-like lectin domain
78864	CCCH zinc finger
96655	Glyoxal oxidase
115531	Cupredoxin
117427	Jacalin-like lectin domain
133592	Hemopexin

¹Protein ID of the *P. ostreatus* PC9 genome database

(http://genome.jgi.doe.gov/PleosPC9_1/PleosPC9_1.home.html).

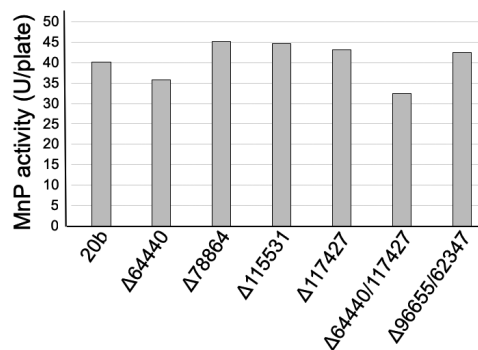


Fig. 4 Extracellular Mn²⁺-dependent peroxidase activity when each strain was grown on sawdust medium for 13 days (n=1). One unit (1U) of activity for guaiacol oxidation was defined as the amount of enzyme that increased the absorbance at 465 nm by 1.0 per min in this study. MnP activity indicates Mn²⁺-dependent peroxidase activity, which was calculated by subtracting the activity determined in the absence from that in the presence of 0.2mM Mn²⁺. Mutants are indicated by the Protein IDs (Table 1).

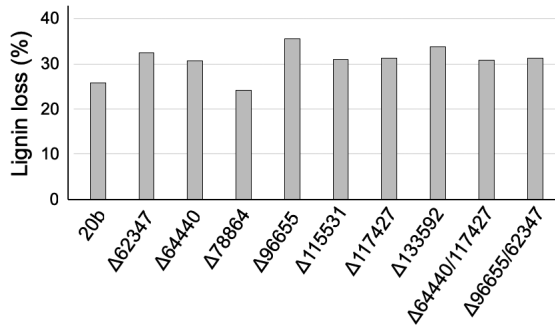


Fig. 5 Effects of each single- and double-gene disruption on the ligninolytic activity (28 days). Graph showing the ability of each strain to degrade wood lignin contained in sawdust medium when grown on sawdust medium for 28 days (n=1). Lignin loss indicates decrease in the weight of Klason lignin per plate compared with the plate without inoculation of *P. ostreatus* strain (0.8310g/plate). Mutants are indicated by the Protein IDs (Table 1).

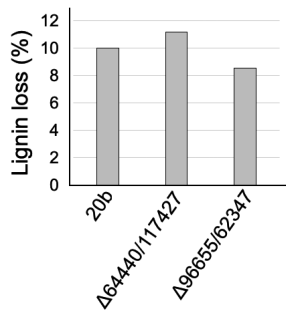


Fig. 6 Effects of each double-gene disruption on the ligninolytic activity (18 days). Graph showing the ability of each strain to degrade wood lignin contained in sawdust medium when grown on sawdust medium for 18 days (n=1). Lignin loss indicates decrease in the weight of Klason lignin per plate compared with the plate without inoculation of *P. ostreatus* strain (0.8310g/plate). Mutants are indicated by the Protein IDs (Table 1).

キシラナーゼ (GH10 および GH11) をコードする各遺伝子の単独および多重破壊が、リグニン分解に与える影響木質中において、リグニンとヘミセルロースの間に共有結合が報告されていることを踏まえて、ヘミセルロース分解酵素遺伝子の単独および多重破壊が、ヒラタケによる木質中のリグニン分解能力に与える影響の解析を行った。本研究で用いたブナ木粉の構成糖分析を行い、セルロース由来のグルコースに次いで、キシロースが主要な構成糖成分であることを確認した (data not shown)。

JGI のゲノムデータベースに基づく、ヒラタケ PC9 株のゲノム上には、推定上の GH10 および GH11 をコー

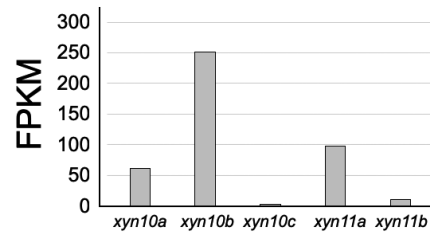


Fig. 7 Transcript accumulation of GH10 and GH11 genes when *P. ostreatus*PC9 was grown on sawdust medium for 13 days. FPKM value for each gene was calculated based on RNA-seq data (n=1).

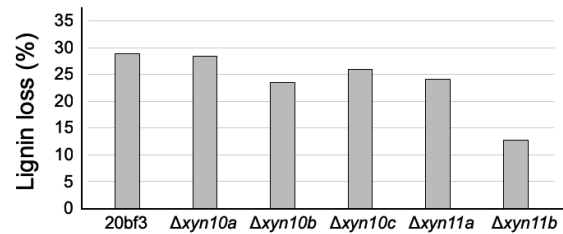


Fig. 8 Effects of each *xyn10* and *xyn11* single-gene disruption on the ligninolytic activity. Each bar indicates wood-lignin degradation ability of a disruptant grown for 28 days in sawdust medium (n=1). Lignin loss indicates decrease in the weight of Klason lignin per plate compared with the plate without inoculation of *P. ostreatus* strain (0.8310g/plate).

ドする遺伝子が合計 5 種類 (*xyn10a*, *xyn10b*, *xyn10c*, *xyn11a*, *xyn11b*) 存在する。RNA-seq 解析の結果からは、この 5 種類の遺伝子のうち、PC9 株をブナ木粉培地上で 13 日間培養した場合、*xyn10a*, *xyn10b*, *xyn11a* の転写産物が主に蓄積していることが示された (Fig.7)。また、JGI のゲノムデータベース上で推定されているタンパク質の一次構造を見ると、Xyn10a, Xyn10c, Xyn11a は多糖結合モジュール (CBM) を有することが示されていた。ここで、我々が行った RNA-seq 解析から推定した各遺伝子の ORF から推定すると、新たに Xyn11b (JGI のアノテーションでは、CBM を有さない) の C 末側に CBM を有することが明らかとなった。RNA-seq 解析による ORF の修正を踏まえて、まず上記 5 種類の推定キシラナーゼのうち *xyn10c* 以外の 4 種類の酵素を *P. pastoris* を用いて分泌生産させた。その結果、確かにキシラン分解活性を有することを確認した (data not shown) この結果は、本研究で破壊対象とした遺伝子がコードするタンパク質が、確かにキシラン分解活性を有するタンパク質であることを示している。

次に、20b3 株 (Nakazawa *et al.*, 2016) から各キシラナーゼ遺伝子の単独破壊株を作成し、ブナ木粉培地上で

培養した際の、木質中のリグニン分解能力に与える影響を調査した (Fig.8). この結果、上述の RNA-seq データからは、転写量が多かった *xyn10a*, *xyn10b*, *xyn11a* 遺伝子の単独破壊株においては、リグニン分解能力は 20bf3 株と変わりなかった。一方、転写量が低かった *xyn11b* 単独破壊株においては、リグニン分解能力の低下が示された。この *xyn11b* 単独破壊株は、親株である 20bf3 株と比較して、YMG (麦芽, 酵母エキス, グルコース) 寒天培地上における生長速度が若干遅かった (data not shown)。

考 察

本研究では、近年分子遺伝学研究が可能になった白色腐朽菌ヒラタケを用いた研究によって、木質中のリグニン分解機構に重要な因子を明らかとすることを試みた。将来の異種リグニン分解系構築という“合成生物学”を志向した基礎研究を行った。

本研究では、ブナ木粉培地上でヒラタケを培養した際に、主に転写発現している *vp2*, *vp3* (Fig.1) の二重遺伝子破壊株について、木質中のリグニンの化学構造および分子量に与える影響までは調査していないが、少なくとも量的な木質中のリグニン分解能力は、野生株と同等であることが示された (Fig.2)。このことについて、考えられる可能性が三つある。一つ目は、VP2, VP3 は、少なくとも本研究で用いたブナ木粉培地上でのリグニン分解に重要ではないという可能性である。この場合、いわゆるリグニン分解酵素以外によるラジカル生成などが、本研究における木質中のリグニン分解に対する寄与が大きいかもかもしれない。二つ目は、主要なリグニン分解酵素 VP2, VP3 の機能喪失が、他のリグニン分解酵素遺伝子 (ラッカーゼなども含む) を活性化させ、リグニン分解能力を相補したという可能性である。MnP の一部には、転写レベルでの制御だけでなく、分泌レベルでの制御を示唆する知見 (Mancilla *et al.*, 2004) も存在する。しかし、仮に活性化があったとしても、VP2 および VP3 の機能喪失を補うほどの菌体外酵素活性には結びついていない (Fig.3) ことから、後者の可能性は低いと考えられるが、今後も注意深く解析することが必要である。三つ目として、今回破壊対象としなかった、*vp2*, *vp3* と比較すると転写発現が高くない他の *mnp*, *vp* 遺伝子のみでも、本研究で用いたブナ木粉培地に含まれるリグニンを十分に分解できる能力がある可能性も考えられる。この可能性を検証するためには、さらなる多重遺伝子破壊株を作成し、リグニン分解能力への影響を調査する必要がある。

上記の結果を踏まえて本研究では、リグニン分解酵素以外に木質中のリグニン分解に重要な因子の同定を試み

た。リグニン分解不全をきたすヒラタケの遺伝子破壊ならびに変異体の間で比較 RNA-seq 解析を行い、共通して転写減少している遺伝子を (なるべく菌体外酵素をコードすると推定される遺伝子を中心に) を絞り込んだ (Table 1)。その後、遺伝子破壊を行い、木質中のリグニン分解能力に与える影響を調査した。しかし、本研究で行なった限りでは、木質中のリグニン分解に不全をきたす遺伝子破壊株を見いだすことはできなかった。CRO や Cupredoxin はゲノム上にコピー数が多く、これらの中の他の酵素がリグニン分解に関与する可能性も残されている。(Kersten *et al.*, 2014; Alfaro *et al.*, 2016)。この場合、上述の酵素が木質中のリグニン分解に重要かどうかを明らかにするためには、さらなる多重遺伝子破壊株の作成が必要であると考えられる。しかし、相同組換えを通じた多重遺伝子破壊は、多大な労力と時間がかかるため現実的ではない。今後は、より効率的な多重破壊株を作成するため、最近担子菌で達成された担子菌類におけるゲノム編集 (Sugano *et al.*, 2017) を用いる必要がある。

また本研究では、先行研究で得られていたリグニン分解不全株 3 株を用いた RNA-seq 解析から、これらの不全株に共通して顕著に転写減少する遺伝子グループに含まれる遺伝子を対象を絞って遺伝子破壊を行った。この 3 株の中で、*pex1* 破壊株は、ブナ木粉培地に含まれるリグニンの分解能力をほとんど失っていた (Nakazawa *et al.*, 2017a) 一方で、*chd1-1* 変異体である UVJ3-3 並びに *utr1* 破壊株では、培養 28 日目時点で野生型株の半分程度リグニンを分解する能力を有していた (Nakazawa *et al.*, 2017b)。このため、これらの 3 株間で共通して転写減少する遺伝子の中から、顕著なリグニン分解能力低下をもたらす遺伝子 (破壊対象) を選ぶことが不適當だったと考えられる。本研究で取得した新たなリグニン分解不全株 (UVRM22 およびその原因変異遺伝子の破壊株) では、*pex1* と同様にリグニン分解能力がほとんど失っていたものが存在していた。これらのリグニン分解能力がほとんど失われていた株を用いた比較 RNA-seq 解析を再度行うことで、破壊対象となる遺伝子 (複数ある可能性もある) の絞り込みを、より効率的に行うことができると考えられる。

本研究では、木質中でのリグニンとヘミセルロース間の共有結合の存在に関する知見を踏まえて、GH10 および GH11 遺伝子の単独および二重遺伝子破壊が、ヒラタケによるリグニン分解能力に与える影響を調査した。その結果、GH11 の一つである *xyn11b* 遺伝子を破壊した場合に、本研究で用いたブナ木粉培地中の木質リグニン分解能力がある程度減少することが判明した (Fig.8)。しかし一方で、RNA-seq 解析の結果、他の *xyn10* および

xyn11 遺伝子と比較して、木粉培地上で培養した際の *xyn11b* の発現は、少なくとも転写レベルでは高くはないことが示された (Fig.7). 生長速度がリグニン分解に影響している可能性も考えられる。以上のことも踏まえながら、リグニン分解におけるキシラナーゼの役割 (および、キシラナーゼ遺伝子欠損の影響) を合理的に説明することが、今後の課題である。

以上のように、本研究では白色腐朽菌によるリグニン分解能力を他の菌に移植することを最終目標とし、ヒラタケによる木質中のリグニン分解に重要な菌体外酵素を同定すべく、分子遺伝学アプローチから研究を行った。今後は、冗長性の問題を克服すべく、CRISPR/Cas9 系を用いたさらなる遺伝子の多重破壊などを行うことで、白色腐朽菌ヒラタケによる木質中のリグニン分解能力に重要な因子の同定を行う予定である。

要 約

担子菌の一部である白色腐朽菌は、自然界において、木質バイオマスに含まれるリグニンを効率よく分解可能な生物である。白色腐朽菌によるリグニン分解の分子機構を解明することは、木質バイオマスを高付加価値な化学品などへと変換するために役に立つ可能性がある。本研究では、ヒラタケを用いた分子遺伝学研究を通して、白色腐朽菌ヒラタケが、木質中のリグニンを効率よく分解するために重要な役割を果たしている因子を同定し、将来的には、非木材腐朽性担子菌などにリグニン分解能力を移植する「木材腐朽の合成生物学」を目指した研究を行なった。ブナ木粉培地上でヒラタケ株を培養した際に、リグニン分解酵素遺伝子の中で転写量の大部分を占めていた *vp2*, *vp3* の二重破壊株を作成し、野生型株とリグニン分解能力を比較した。しかし、これらの2つのリグニン分解酵素は、ブナ木粉培地中のリグニン分解に重要ではないことが示唆された。この結果を踏まえて、リグニン分解酵素以外で、木質中のリグニン分解に重要だと考えられる遺伝子を、リグニン分解不全株を用いた比較 RNA-seq 解析の結果から絞り込んだ。これらの遺伝子の単独および二重破壊株を作成し、リグニン分解能力の比較解析を行なった。しかし、リグニン分解能力を不全化する遺伝子を特定するには至っていない。リグニンとのヘミセルロース間の共有結合を踏まえて、褐色腐朽菌と比較した場合に、白色腐朽菌で発達しているキシラナーゼ遺伝子群 (GH10 および GH11) の単独および二重破壊株を作成した。本研究の培養条件において、転写量が多くなかった一つの GH11 の単独破壊株において、リグニン分解能力の減少が示されたが、他の転写量が多い他の GH10, GH11 遺伝子の破壊株については、リグニン分解能力の減少は示されなかった。今回破壊候

補とした上述の遺伝子は、ヒラタケおよび他の白色腐朽菌ゲノム上に多コピー存在する。このことは、単独および二重遺伝子破壊では、破壊した遺伝子以外の他の遺伝子コピーが分解に関与する可能性も残されている。以上のことから、それぞれの因子が、ヒラタケによる木質中のリグニン分解に重要なかを調査するためには、今後さらなる多重遺伝子破壊株を作成し、表現型を調査する必要性が考えられた。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 中沢威人, 小寺里奈, 西村裕志, 坂本正弘, 渡辺隆司, 本田与一. 2016. 順遺伝学アプローチを起点とした、リグニン生分解に重要な新たな因子の探索. 第61回リグニン討論会, 10月27-28日, 京都
- 2) 小寺里奈, 中沢威人, 西村裕志, 渡辺隆司, 坂本正弘, 本田与一. 2016. 白色腐朽菌ヒラタケにおける *wtr1* 遺伝子変異がリグニン分解システムに与える影響. 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 11月17-18日, 京都
- 3) 中沢威人, 村口元, 本田与一. 2016. 担子菌キノコの順遺伝学研究から示唆されてきた、リグニン生分解と子実体形成の関連性. 第16回糸状菌分子生物学コンファレンス, 11月17-18日, 京都
- 4) 中沢威人, 伊津野彩子, 井鷲裕司, 栗野達也, 高部圭司, 宮崎安将, 村口元, 西村裕志, 渡辺隆司, 本田与一. 2017. 白色腐朽菌ヒラタケにおける *pex1* 遺伝子の機能喪失が、木質生分解および子実体発生に与える影響. 第67回日本木材学会大会, 3月17-19日, 福岡
- 5) 湯村直樹, 中沢威人, 大沼広宜, 泉津弘佑, 入江俊一, 福田泰久, 白坂憲章, 坂本正弘, 本田与一. 2017. 白色腐朽菌ヒラタケにおける GH10・GH11 の機能喪失がリグニン分解に及ぼす影響について. 第62回リグニン討論会, 10月26-27日, 名古屋
- 6) 中沢威人, 堀井雅人, 森本亮太, 辻祥子, 西村裕志, 小寺里奈, 坂本正弘, 渡辺隆司, 本田与一. 2017. キノコによる木質リグニン分解と有性形態形成との間に、関係性はあるのか? . 第62回リグニン討論会, 10月26-27日, 名古屋
- 7) Honda, Y. & Nakazawa, T. 2018. Recent progress in molecular genetic approaches for mushroom science. Satellite workshop on Basidiomycetes in European Conference on Fungal Genetics 14, Feb. 25-28, Haifa, Israel
- 8) Nakazawa, T. & Honda, Y. 2018. Efficient forward genetics studies to identify mutations that cause defects in the ligninolytic activity in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. Satellite workshop on Basidiomycetes in European Conference on Fungal Genetics 14, Feb. 25-28, Haifa, Israel
- 9) 中沢威人, 伊津野彩子, 森本亮太, 井鷲裕司, 坂本正弘, 本田与一. 2018. 新旧実験法の融合による、白色腐朽菌ヒラタケにおける効率的な順遺伝学実験系の確立. 第12回日本ゲノム微生物学会年会, 3月5-7日, 京都
- 10) 中沢威人, 小寺里奈, 竹中敦紀, 森本亮太, 坂本正弘, 本田与一. 2018. ヒラタケにおけるリグニン分解不全変異が、多糖分解酵素関連遺伝子群の転写に与える影響の解析. 第68回日本木材学会大会, 3月14-16日, 京都

原著論文

- 1) 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.
- 2) Nakazawa, T., Izuno, A., Kodera, R., Miyazaki, Y., Sakamoto, M., Isagi, Y. & Honda, Y. 2017. Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Microbiol.* **19**: 261–272.
- 3) Nakazawa, T., Izuno, A., Horii, M., Kodera, R., Nishimura, H., Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Miyazaki, Y., Awano, T., Muraguchi, H., Watanabe, K., Sakamoto, M., Takabe, K., Watanabe, T., Isagi, Y. & Honda, Y. 2017. Effects of *pep1* disruption on wood lignin biodegradation, fruiting development and the assimilation of carbon sources in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus* and non-wood decaying *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* **109**: 7–15.

保存期間に寄託した菌株

該当なし

謝 辞

本研究に対して大型研究助成のご支援を賜りました、公益財団法人発酵研究所の関係者の皆様に深く感謝致します。本研究実施に尽力して頂いた、京都大学大学院農学研究科・森林生化学分野の学生の皆様（都築雅美、小寺里奈、竹中敦紀、森本亮太、湯村直樹、呉紅麗、坂知奈美、井上智香子）に深くお礼申し上げます。また、本研究を進める上で、様々なご助言およびご助力頂いた、井鷲裕司博士（京都大学大学院農学研究科）、伊津野彩子博士（同上 現・森林総合研究所）、渡辺隆司博士（京都大学大生存圏研究所）、西村裕志博士（同上）、辻祥子博士（同上）、山田美紗登博士（同上）、ならびに京都大学大学院農学研究科・森林生化学分野の本田与一博士、坂本正弘博士に深く感謝申し上げます。本研究で使用した $\Delta vpb2$ 株を分与頂いた、Hebrew University of Jerusalem の Yitzhak Hadar 教授に深く感謝申し上げます。

文 献

- Ahmad, M., Roberts, J.N., Hardiman, E.M., Singh, R., Elite, L.D. & Bugg, T.D.H. 2011. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biotechnology* **50**: 5096–5107.
- 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.
- Arantes, V. & Goodell, B. 2014. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. *In* Schutz, T.P., Goodell, B. & Nicholas, D.D. (eds.), *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*, pp. 3–21, ACS publications, Washington.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Eudes, A., Liang, Y., Mitra, P. & Loqué, D. 2014. Lignin bioengineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**: 189–198.
- Fernandez-Fueyo, E., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Floudas, D., Hobbitt, D.S., Canessa, P., Larrondo, L.F., James, T.Y., Seelenfreund, D., Lobos, S., Polanco, R., Tello, M., Honda, Y., Watanabe, T., San, R.J., Kubicek, C.P., Schmoll, M., Gaskell, J., Hammel, K.E., St John, F.J., Vanden Wymelenberg, A., Sabat, G., Splinter Bondurant, S., Syed, K., Yadav, J.S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lavin, J. L., Oguiza, J.A., Perez, G., Pisabarro, A.G., Ramirez, L., Santoyo, F., Master, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Lombard, V., Magnuson, J.K., Kues, U., Hori, C., Igarashi, K., Samejima, M., Held, B.W., Barry, K.W., Labutti, K.M., Lapidus, A., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Riley, R., Salamov, A.A., Hoffmeister, D., Schwenk, D., Hadar, Y., Yarden, O., de Vries, R.P., Wiebenga, A., Stenlid, J., Eastwood, D., Grigoriev, I.V., Berka, R.M., Blanchette, R.A., Kersten, P., Martinez, A.T., Vicuna, R. & Cullen, D. 2012. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5458–5463.
- Gal, C., Moore, K.M., Paszkiewicz, K., Kent, N.A. & Whitehall, S.M. 2015. The impact of the HIRA histone chaperone upon global nucleosome architecture. *Cell Cycle* **14**: 123–134.
- Gaskell, J., Blanchette, R.A., Stewart, P.E., BonDurant, S.S., Adams, M., Sabat, G., Kersten, P. & Cullen, D. 2016. Transcriptome and secretome analyses of the wood decay fungus *Wolfiporia cocos* support alternative mechanisms of lignocellulose conversion. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 3979–3987.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. & Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicellulose for fuel ethanol: A review. *Biores. Technol.* **101**: 4775–4800.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P. & Martínez, A.T. 2012. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 1395–1410.
- Hori, C., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Suzuki, H., Master, E., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Held, B., Canessa, P., Larrondo, L.F., Schmoll, M., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Gaskell, J.A., Kersten, P., Jphn, F.S., Glasner, J., Sabat, G., BonDurant, S.S., Syed, K., Yadav, J., Mgbeahurike, A.C., Kovalchuk, A., Asiegbu, F.O., Lackner, G., Hoffmeister, D., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Sun, H., Lindquist, E., Barry, K., Riley, R., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., Kües, U., Berka, R.M., Martínez, A.T., Covert, S.F., Blanchette, R.A. & Cullen, D. 2014. Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* genome, transcriptome and secretome provides insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS Genet.* **10**: e1004759.
- Jin, L., Nicholas, D.D. & Kirk, T.K. 1990. Mineralization of the methoxyl carbon of isolated lignin by brown-rot fungi under solid substrate conditions. *Wood Sci. Technol.* **24**: 263–276.

- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. & Kuwahara, M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**: 287–294.
- Kersten, P. & Cullen, D. 2014. Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decaying Agaricomycetes. Fungal Genet. Biol. **72**: 124–130.
- Knop, D., Yarden, O. & Hadar, Y. 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. **99**: 1025–1038.
- Kolpak, F.J. & Blackwell, J. 1976. Determination of the structure of cellulose II. Macromolecules **9**: 273–278.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie2. Nat. Methods **9**: 357–359.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. **10**: R25.
- Larraya, L.M., Pérez, G., Peñas, M.M., Baars, J.J.P., Mikosch, T.S.P., Pisabarro, A.G. & Ramirez, L. 1999. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 3413–3417.
- Levy, J. 1966. The soft rot fungi: their mode of action and significance in the degradation of wood. Adv. Bot. Res. **2**: 323–357.
- Li, H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics **27**: 2987–2993.
- Liao, Y., Smyth, G.K. & Shi, W. 2014. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics **30**: 923–930.
- Mancilla, R.A., Canessa, P., Manubens, A. & Vincuna, R. 2010. Effects of manganese on the secretion of manganese-peroxidase by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Fungal Genet. Biol. **47**: 656–661.
- Matsunaga, Y., Ando, M., Izumitsu, K., Suzuki, K., Honda, Y. & Irie, T. 2017. A development and an improvement of selectable markers in *Pleurotus ostreatus* transformation. J. Microbiol. Methods **134**: 27–29.
- Nakazawa, T. & Honda, Y. 2015. Absence of a gene encoding cytosine deaminase in the genome of the agaricomycete *Coprinopsis cinerea* enables simple marker recycling through 5-fluorocytosine counterselection. FEMS Microbiol. Lett. **362**: fnv123.
- 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.
- Nakazawa, T., Izuno, A., Horii, M., Kodera, R., Nishimura, H., Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Miyazaki, Y., Awano, T., Muraguchi, H., Watanabe, K., Sakamoto, M., Takabe, K., Watanabe, T., Isagi, Y. & Honda, Y. 2017a. Effects of *pex1* disruption on wood lignin biodegradation, fruiting development and the utilization of carbon sources in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus* and non-wood decaying *Coprinopsis cinerea*. Fungal Genet. Biol. **109**: 7–15.
- Nakazawa, T., Izuno, A., Kodera, R., Miyazaki, Y., Sakamoto, M., Isagi, Y. & Honda, Y. 2017b. Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. Environ. Microbiol. **19**: 261–272.
- Nishimura, H., Kamiya, A., Nagata, T., Katahira, M. & Watanabe, T. 2018. Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. Sci. Rep. **8**: 6538.
- Ohm, R.A., deJong, J.F., deBekker, C., Wösten, H.A. & Lugones, L.G. 2011. Transcription factor genes of *Schizophyllum commune* involved in regulation of mushroom formation. Mol. Microbiol. **81**: 1433–1445.
- Paffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. **29**: e45.
- Pollegioni, L., Tonin, F. & Rosini, E. 2015. Lignin-degrading enzymes. FEBS J. **282**: 1190–1213.
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., DeVries, R.P. & Mäkelä, M.R. 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **78**: 614–649.
- Salame, T.M., Yarden, O. & Hadar, Y. 2010. *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolorization of Orange II. Microbiol. Biotechnol. **3**: 93–106.
- 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.
- Salame, T.M., Knop, D., Levinson, D., Yarden, O. & Hadar, Y. 2013. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. **79**: 2405–2415.
- Salame, T.M., Knop, D., Levinson, D., Levinson, D., Mabeesh, S., Yarden, O. & Hadar, Y. 2014. Inactivation of a *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase-encoding gene (*mnp2*) results in reduced lignin degradation. Environ. Microbiol. **79**: 2405–2415.
- Sugano, S.S., Suzuki, H., Shimokita, E., Chiba, H., Noji, S., Osakabe, Y. & Osakabe, K. 2017. Genome editing in the mushroom forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. Sci. Rep. **7**: 1260.
- Vyas, B. R. W. & Molitoris, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 3919–3927.
- Watanabe, T. & Koshijima, T. 1988. Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complex by DDQ-oxidation. Agric. Biol. Chem. **52**: 2953–2955.
- Watanabe, T., Ohnishi, J., Yamasaki, Y., Kaizu, S. & Koshijima, T. 1989. Binding-site analysis of the ether linkages between lignin and hemicelluloses in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. Agric. Biol. Chem. **53**: 2233–2253.
- Zhang, N., Li, S., Xiong, L., Hong, Y. & Chen, Y. 2015. Cellulose-hemicellulose interaction in wood secondary cell-wall. Modelling Simul. Mater. Sci. Eng. **23**: 085010.
- Zhang, X., Yang, W. & Blasiak, W. 2011. Modeling study of woody biomass: Interactions of cellulose, hemicellulose, and lignin. Energy Fuels **25**: 4786–4795.

平成 24 年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：平成 24 年 10 月～平成 30 年 3 月

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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Innovating microorganism metabolite production: Development and practice of new methods for using the microbial metabolic potential

Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

With the progress of genome analysis technology, the potential of microorganisms is drawing increasing attention. Actinomycetes are soil microorganisms that produce various secondary metabolites with different physiological activities, such as antibacterial activity. These metabolites are often used in pharmaceuticals and have made a great contribution to human medicine. To explore the potential practical use of the secondary metabolism of actinomycetes, we started “The Laboratory of Microbial Metabolic Potential (Onaka lab)” at the University of Tokyo in 2012. In our lab, we focus on the activation mechanism of secondary metabolism in combined-culture, which is one of the co-culture methods for secondary metabolism induction. We also study the biosynthetic machinery of Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides (RiPPs), and apply it to combinatorial biosynthesis. Here, our summary report is divided into ten sections as follows: (1) Innovating microorganism metabolite production: Development and practice of new methods for using the microbial metabolic potential, (2) Requirement of live mycolic acid-containing bacteria for induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture, (3) RNA sequencing analysis of contact-dependent secondary metabolism responses by *Streptomyces coelicolor*, (4) Analysis of response deficient mutants of *Streptomyces coelicolor* generated by heavy ion beam induced mutagenesis to contact-dependent stimuli by *Tsukamurella pulmonis*, (5) Studies on the biosynthesis of novel alkaloids derived from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* HEK616 and *Tsukamurella pulmonis*, (6) A new sideromycin-like antibiotic from combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*, (7) Goadsporin, a specific inhibitor of actinomycetal signal recognition particle, (8) Dissection of goadsporin biosynthetic machinery by *in vitro* reconstitution leading to *in vivo* production of designer analogues, (9) Genome mining to reveal a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles, (10) Analysis of lanthipeptide biosynthetic enzymes responsible for formation of novel goadionin structure.

第一章 はじめに

生物の産生する低分子化合物は一次代謝産物と二次代謝産物の二つにおおまかに分けられる。そのうち一次代

E-mail: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

教員：浅水俊平：(現 東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在酵素寄付講座)

尾崎太郎：(現 北海道大学理学研究院)

菅井佳宣：(現 京都大学学術研究支援室)

謝産物は生育に必須な化合物を総称したものであり、アミノ酸、糖、核酸、脂質などが挙げられる。一方、二次代謝産物は、生育自体には必ずしも必須ではない化合物群を指し、抗生物質やシデロフォア、アルカロイド化合物などが含まれる。現在までに、何らかの生理活性を有する天然物は22,500種類ほどであると報告されている(Berdy, 2005)。土壌微生物である放線菌は、微生物の中でも特に多様な二次代謝産物を生産することが知られている。1943年に抗結核薬であるストレプトマイシン

が米国のワクスマン博士により *Streptomyces griseus* の産生する二次代謝産物から発見されて以来、現在に至るまで10,100種類以上の二次代謝産物が放線菌から発見され、そのうち *Streptomyces* 属放線菌からは実に7,630種類が発見されている (Berdy, 2005)。これら生理活性物質のいくつかは抗生物質のみならず抗がん剤、免疫抑制剤、抗真菌剤、抗寄生虫薬、生活習慣病治療薬などとして多数実用化され、人類の健康に大きく貢献してきた。

ゲノム解読技術の進展は、微生物の有する潜在能力が我々の想像を超えて高いことを明らかにした。例えば放線菌においては、これまでに明らかになっている二次代謝産物の数に比べはるかに多い二次代謝生成遺伝子群が、ゲノム内に存在していることが明らかとなった。一例として、エバメクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* のゲノム内には38種類の二次代謝生成遺伝子クラスターが存在していることが明らかにされた (Nett *et al.*, 2009)。しかしながら、実際に化合物が同定されているものは13種類にとどまり、残りの25種類、実に6割以上の二次代謝産物が未同定である。このことは、放線菌の二次代謝潜在能力は、従来考えられている以上に高いことを端的に示しているとともに、潜在的二次代謝産物を効率的に発見する手法の開発が必要であることを示している。

そこで、微生物潜在機能探索寄付講座では、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を目指し、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成酵素群をコンビナトリアル生合成に応用する研究を2012年10月より開始した。本研究は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、2、複合培養による新規二次代謝産物の発見、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、4、Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides (RiPPs) 生合成：中分子創薬へ向けた新規 RiPPs アナログの効率的な合成システムの確立の4部から構成されている。

第二章 研究概要

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

Streptomyces 属放線菌は1株あたり40個前後の二次代謝生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。自然環境中では、放線菌は様々な微生物と同じ土壌中で生育しており、周囲の微生物の影響を受けながら生育していると考えられる。それに対して、実験室環境は純粋培養であり、他の微生物の影響を全く受けずに生育する。二次代謝産物のいくつかは抗生物質活性を有することを考えると、放線菌の二次代謝が周囲の微生物に影響を受けている可能性が考えられる。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、放線菌 *Streptomyces lividans* の赤色色素生産誘導を指標に、二次代謝を活性化する微生物の探索を行い、約400株のスクリーニングの結果から *Tsukamurella pulmonis* を発見した。*T. pulmonis* はミコール酸を細胞表層に有する微生物 (MACB: Mycolic Acid-Containing Bacteria) であり、*T. pulmonis* 以外の MACB も赤色色素生産誘導が観察されたことからミコール酸が誘導活性に関与していることが強く示唆された。また、*S. lividans* 以外の放線菌109株においても二次代謝誘導が引き起こされるかを調査したところ、そのうちの86株、9割近くの放線菌において二次代謝パターンに変化が起こることが明らかとなった。この発見から、MACBは広く放線菌の二次代謝を活性化することが明らかとなったため、MACBと放線菌の共培養法を複合培養 (combined-culture) と命名することとした (Onaka *et al.*, 2011)。本誘導活性はMACB培養抽出物では引き起こされないことから、ケミカルコミュニケーションではないことが示唆された。その後の研究から *S. lividans* と MACB との直接接触が本誘導活性には必要であることが明らかとなった。複合培養現象は目も耳も持たない微生物が自分の周りの他者を認識し、接触応答反応として二次代謝活性化をしていると捉えることができる。このような微生物による接触応答による他者認識機構はこれまでに全く報告されていない現象であり、極めて興味深い。本寄付講座ではこの接触応答機構についての知見を集め、最終的には分子レベルで本作用機構を明らかにすることを目指した。

液体培養にて複合培養を行った際に、その様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) 撮影すると MACB が放線菌の菌糸にびっしりと付着している状態が観察された。当初、この付着状態は MACB が外層に持つミコール酸の疎水的な形質がもたらした物理的吸着なのではでないかと予想されたため、細胞表層がミコール酸に覆われた状態であれば、MACB の生死に関係なく、放線菌は接触応答するのではないかと考えた。そこで、細胞構造を維持した状態の MACB をホルマリン固定法およびガンマ線滅菌法により調製して接触試験を行った (Asamizu *et al.*, 2015)。この結果に関しては本報告書各論内の「ミコール酸含有細菌死菌体は放線菌の二次代謝を誘導しない」

にまとめた。しかし、死菌体では二次代謝が誘導されなかったことから、放線菌においては生死を判別する機構が存在することが強く示唆され、基礎生物学的にも興味深い結果が得られた。そこで次に、複合培養時にどのような遺伝子が作用することによって接触応答機構が働いているかを明らかにするために、RNA-seq解析による遺伝子発現量比較を純粋培養と複合培養の間で行った。本結果については「ミコール酸含有細菌に対する放線菌二次代謝応答機構の網羅的転写解析」にまとめた。RNA-seq解析によると純粋培養と比較して、複合培養においては、接触7時間半後には全遺伝子の約5%が変動することが明らかとなり、複合培養は予想以上に多くの遺伝子の発現に影響を与えていることが明らかとなった。また、RNA-seq解析では接触応答制御に関わる遺伝子の同定までは至らなかったため、重イオンビーム法で *S. lividans* 変異株を152,000株作製し、接触応答欠損変異株、すなわち *T. pulmonis* との接触においても赤色素生産を誘導しない118株を取得した。それら変異株から16株を選抜し9箇所の変異点を同定した。本結果については「重イオンビーム変異導入法による *T. pulmonis* への赤色素非生産応答性 *Streptomyces coelicolor* 突然変異株の解析」にまとめた。変異株解析は現時点ではまだ完了していないが、機能未知遺伝子、膜タンパク質遺伝子、一次代謝や翻訳に必要な遺伝子など、変異箇所が多岐にわたっていることから、接触応答は二次代謝特異的な活性化機構ではなく、細胞の代謝全体に影響を与える、一種のストレス応答であることが示唆された。

2. 複合培養による新規二次代謝産物の発見

前述の通り、*T. pulmonis* との複合培養により約9割の放線菌において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い、現在までに8種類の放線菌から23種類の新規二次代謝産物を発見した。*Streptomyces endus* S522と *T. pulmonis* との複合培養においては、*Micrococcus luteus* に対して0.06 μ g/mLの極低濃度で抗菌活性を示す alchivemycin A, B を発見した (Igarashi *et al.*, 2010)。同様に *T. pulmonis* と *Streptomyces cinnamonus* NBRC 13823 との複合培養からは、殺細胞活性を有するインドロカルバズール化合物 arcyriaflavin E (Hoshino *et al.*, 2015c)、*Streptomyces* sp. CJ-5 との複合培養では、殺細胞活性を有する chojalactone A-C (Hoshino *et al.*, 2015b)、*Micromonospora wenchangensis* HEK-797 との複合培養においては、doraolactam A, B、*Streptomyces* sp. NZ-6 との複合培養では niizalactam A-C (Hoshino *et al.*, 2015a)、*Streptomyces nigrescens* HEK616 との複合培養で

は抗真菌活性を有する8種類のアルキル側鎖の異なる 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline類 (5aTHQs) (Sugiyama *et al.*, 2015) 及び抗菌活性を有する streptoaminal A-C (Sugiyama *et al.*, 2016)、*Streptomyces* sp. HOK021 との複合培養では抗 MRSA 抗生物質 harundmycin を発見した。これら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、多様な潜在的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。本報告書においては *S. nigrescens* HEK616 における 5aTHQs 及び streptoaminal の生合成経路に関して「複合培養を用いた新規アルカロイドの同定と生合成に関する研究」及び、*Streptomyces* sp. HOK021 由来抗 MRSA 抗生物質 harundmycin の単離同定について「放線菌複合培養液からの抗生物質-シデロフォア縮合体化合物の発見」として以下の各論においてまとめた。

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、1 μ M 以下の低濃度では放線菌に広く二次代謝と形態分化を誘導し、1 μ M 以上では生育阻害を引き起こす (Onaka *et al.*, 2001)。著者らは以前より行っていた GS 生合成研究において、GS 生産菌における GS 自己耐性遺伝子が Signal Recognition Particle (SRP) をコードする *ffh* 遺伝子であることを明らかにしていた (Onaka *et al.*, 2005)。このことは、GS が SRP の阻害剤であることを強く示唆するため、本研究において GS と SRP との結合を実験的に証明することとした。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。本研究の詳細は各論の「ゴードスポリン作用機構の解析」にまとめた。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、新規作用機序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っており、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、新規作用機序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、リボソーム翻訳系を使うものと非リボソ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 (Arnison *et al.*, 2013)。RiPPs 生合成においては、リボソ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、直鎖アゾール環含有ペプチドに分類されるゴードスポリン (GS)、同じく GS 生産菌が生産していた新規架橋構造を有するランチペプチド・ゴードペプチン、*Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 ゲノム中に存在していた潜在的二次代謝生合成遺伝子群により産生される新規チオペプチド・ラクタゾールの3種類の RiPPs を研究対象とした。

まず、GS 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 を合成できるシステムを確立した (Fig.1)。本システムは、*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、リーダーペプチド切断、N 末アセチル化) を順次行う事で実現した (Ozaki *et al.*, 2017)。本システムでは、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*

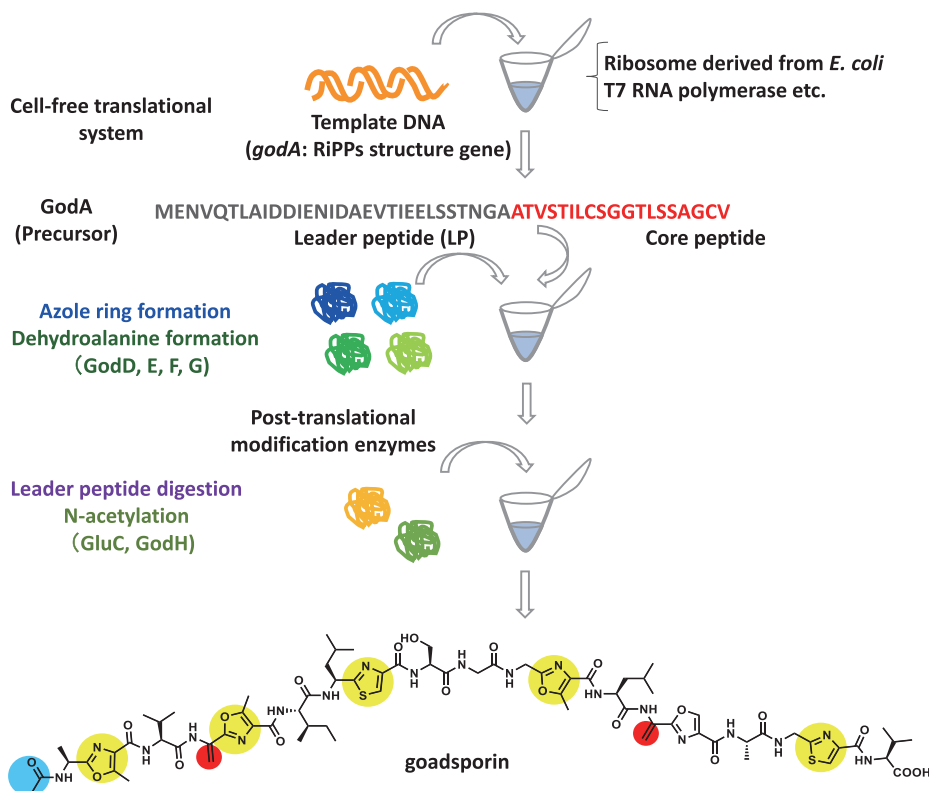


Fig. 1 Outline of RiPPs biosynthesis by *in vitro* reconstitution system coupled with cell-free translational system. This scheme is an example of reconstitution of goadsporin biosynthesis. To input a template DNA corresponding to RiPPs structure gene into the reconstitution system resulted in goadsporin production by sequential enzymatic reactions.

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。本研究に関しては「*In vitro* 再構成系を用いたゴードスポリン合成酵素の解析と合理的な類縁体設計」として各論にまとめた。更に、*S. lactacystinaeus* OM-6519 ゲノム中に存在する、休眠状態にある潜在的チオペプチド合成遺伝子群を同定し、*S. lividans* TK23 を用いた異種発現によりラクタゾール A, B, C を同定した (Hayashi *et al.*, 2014)。本研究に関しては各論の「ゲノム探索による 32 員環新規チオペプチド・ラクタゾールの発見」にその詳細を記した。最後にゴードペプチン合成に関しては「新規ラビオネン構造の形成に関与するランチペプチド合成酵素の解析」にまとめた。ラクタゾール、ゴードペプチンにおいても GS 同様に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、産物を合成できるシステムの構築に既に成功している。以上のことから、*in vitro* 合成系を用いた類縁体生産性の迅速な評価と、*in vivo* 生産系を組み合わせることで、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。

第3章 終わりに

本寄付講座で行われた複合培養の研究は、当初は潜在的二次代謝の活性化機構という産業利用に向けた実用研究の側面が強かったが、共凝集状態の観察より接触応答機構の存在を示唆する結果を得たことから、微生物相互作用に関する基礎的な研究へと展開した。すなわち、放線菌は他微生物に対して抗生物質を生産する「抗生」作用により、他者に対して影響を与えているだけでなく、MACB からの接触刺激を受けることにより抗生物質をはじめとした二次代謝生産の誘導を受けているということが本研究によって明らかになり、放線菌二次代謝は一

方的に他微生物に影響を与えるだけでなく、他微生物からも影響を受ける相互作用の様式であることが明らかとなった (Fig.2)。

放線菌由来二次代謝産物の中には、人類にとって有用な活性を有する化合物の存在が少なくないことから、これらの生理活性は決して偶然に備わったものではなく、生産する放線菌自身においても、その生存のために有効に利用されているのではないかという仮説を唱える研究者も多く存在する。しかしながら、実際にそれを証明するような直接的な実験的証拠は未だ存在せず、真偽のほどは定かではないのが現状である。今回明らかとなった放線菌二次代謝に介在する微生物間相互作用は、上記のような仮説を裏付けるものの一つである。今後も本研究で得られた接触応答機構現象を切り口に、自然環境における放線菌二次代謝の役割を明らかにできればと考えている。

謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって開設された微生物潜在機能探索寄付講座においてなされたものであります。本助成を賜った発酵研究所に対して、ここに篤く御礼申し上げます。また、本寄付講座世話人である東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・大西康夫教授のご支援とご協力に感謝の意を表します。最後に、本寄付講座の浅水俊平特任助教、尾崎太郎特任助教、菅井佳宣特任助教、林昌平特任研究員、並びに、大学院生、学部生の皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Goransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Muller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Sussmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M. & van der Donk, W.A. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**: 108-160.

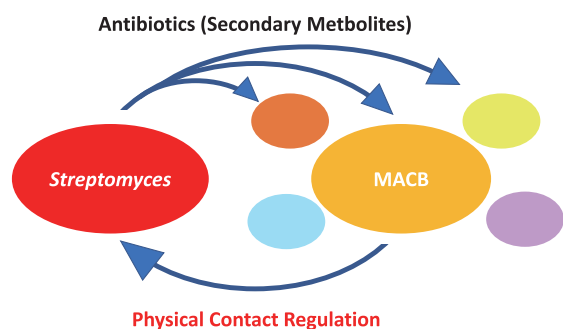


Fig. 2 Bacterial communication between *Streptomyces* and Mycolic acid containing bacteria (MACB). Antibiosis is not unilateral action but a mutual interaction.

- Asamizu, S., Ozaki, T., Teramoto, K., Satoh, K. & Onaka, H. 2015. Killing of mycolic acid-containing bacteria aborted induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture. *PLoS One* **10**: e0142372.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **58**: 1-26.
- Hayashi, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Ikeda, H., Omura, S., Oku, N., Igarashi, Y., Tomoda, H. & Onaka, H. 2014. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.* **21**: 679-688.
- Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Onaka, H. & Abe, I. 2015a. Niizalactams A-C, multicyclic macrolactams isolated from combined culture of *Streptomyces* with mycolic acid-containing bacterium. *J. Nat. Prod.* **78**: 3011-3017.
- Hoshino, S., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015b. Chojalactones A-C, cytotoxic butanolides isolated from *Streptomyces* sp. cultivated with mycolic acid containing bacterium. *Org. Lett.* **17**: 1501-1504.
- Hoshino, S., Zhang, L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015c. Arcyriaflavin E, a new cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated by combined-culture of mycolic acid-containing bacteria and *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823. *J. Antibiot. (Tokyo)* **68**: 342-344.
- Igarashi, Y., Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Kan, Y., Fujita, T., Iwashita, T., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. 2010. Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **12**: 3402-3405.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 1362-1384.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**: 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Ozaki, T., Yamashita, K., Goto, Y., Shimomura, M., Hayashi, S., Asamizu, S., Sugai, Y., Ikeda, H., Suga, H. & Onaka, H. 2017. Dissection of goadsporin biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogs expressed *in vivo*. *Nature Commun.* **8**: 14207
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Kakeya, H. 2015. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Org. Lett.* **17**: 1918-1921.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Kakeya, H. 2016. Discovery and total synthesis of streptoaminals: Antimicrobial [5,5]-spirohemiaminals from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**: 10278-10282.

ミコール酸含有細菌死菌体は放線菌の二次代謝を誘導しない

浅水 俊平, 尾崎 太郎, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Requirement of live mycolic acid-containing bacteria for induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture

Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

Streptomyces co-culture with mycolic acid-containing bacteria (MACB), which we termed “combined-culture,” alters the secondary metabolism in *Streptomyces* and has been useful for the discovery of bioactive natural products. Our investigation to identify the inducing factor(s) of MACB had shown that production of pigments in *Streptomyces lividans* was not induced by small molecules, including mycolic acids. Although dynamic changes in culture conditions were caused by co-culture with MACB, the activation of pigment production by *S. lividans* was observed in a limited area where colonies of both species were in direct contact. This suggested that direct attachment of cells is a requirement and that components of the MACB cell membrane may play an important role in inducing the response of *S. lividans*. Here we examined whether this response was influenced by dead MACB that possess intact mycolic acids. Formaldehyde fixation and γ -irradiation were used to prepare dead cells that retain their shape and mycolic acids using three MACB species: *Tsukamurella pulmonis*, *Rhodococcus erythropolis*, and *Rhodococcus opacus*. Both solid and liquid culture tests verified that *S. lividans* did not respond to the intact dead cells of three MACB. Observation of combined-culture by scanning electron microscopy (SEM) indicated that adhesion of live MACB to *S. lividans* mycelia was a significant interaction that resulted in co-aggregation. In contrast, dead cells were not observed to adhere to *S. lividans* mycelia. Therefore, direct attachment by live MACB cells is proposed as one of the possible factors that causes *Streptomyces* to alter its secondary metabolism in combined-culture.

Key words: *Streptomyces*, mycolic acid containing bacteria, ^{60}Co γ -irradiation, co-aggregation

緒 言

Streptomyces 属放線菌は、通常、土壌に生息し、菌糸状に生育するグラム陽性細菌であり、臨床的に重要な生物活性二次代謝産物の生産者としてもよく知られている

る。*Streptomyces* 属を主とする放線菌由来の天然物は創薬において重要な役割を果たしている (Berdy, 2005)。また最近のゲノム解析から、*Streptomyces* 属放線菌単一株につき 20–40 個もの潜在的な二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが示唆されており、多数の二次代謝産物のほんの一部しか実際には発見していないことが示唆されている (Nett *et al.*, 2009)。

E-mail: 浅水俊平 (asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

尾崎太郎 (ozaki@sci.hokudai.ac.jp)

尾仲宏康 (aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

共同研究者：佐藤勝也 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所)。

寺本華奈江 (日本電子株式会社, 現 株式会社島津製作所)

二次代謝の活性化機構に関しては、環境ストレスまたは低分子化合物による機構が存在することが知られている (Liu *et al.*, 2013)。 γ -ブチロラクトン系低分子化合物 (A-factor など) は、*Streptomyces* 属の形態分化および二次代謝制御に関与しており、微生物ホルモン物質として知

られている(Horinouchi & Beppu, 2007). *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるウンデシルプロディギオシン (RED) またはアクチノロージン (ACT) をコードする遺伝子クラスターの活性化につながる他の因子についても、過去にいくつか研究例が存在する。例えば、培地中のリン酸を制限することでいくつかの抗生物質生産は活性化される例がある(Martin, 2004)。またペプチドグリカン構成成分である *N*-アセチルグルコサミンは最少培地条件下で *S. coelicolor* A3(2) における RED および ACT の産生を活性化する (Rigali *et al.*, 2008)。PI 因子 (Recio *et al.*, 2004)、goadsporin (Onaka *et al.*, 2001)、hormaomycin (Andres *et al.*, 1990)、およびいくつかの合成化合物 (Ahmed *et al.*, 2013) なども低分子化合物として *Streptomyces* の二次代謝に影響を及ぼすことが見出されている。

微生物間相互作用における二次代謝産物の役割についての研究も報告されており、細菌-細菌または細菌-真菌間の相互作用における二次代謝産物の役割が注目されている (Bertrand *et al.*, 2014; Marmann *et al.*, 2014)。*Bacillus subtilis* は、*S. coelicolor* A3(2) の気中菌糸形成を阻害する界面活性剤様の低分子サーファクチンを分泌し (Straight *et al.*, 2006; Willey *et al.*, 2006)、*Streptomyces* sp. Mg1 株はこのサーファクチンを特異的に分解する酵素を分泌し、対抗している (Hoefler *et al.*, 2012)。*B. subtilis* との相互作用に対して *S. coelicolor* A3(2) (または *S. lividans*) は RED を生産するが、*B. subtilis* がバシラエンを生産すると、その RED 生産は阻害される (Vargas-Bautista *et al.*, 2014)。*S. coelicolor* A3(2) と他の放線菌間の相互作用ではまた、シデロフォアとして利用されているデスフェリオキサミン誘導体の産生などによる環境中の Fe³⁺ の競合なども知られている (Traxler *et al.*, 2013)。

潜在的二次代謝産物の活性化の試みについての多くの報告があるが、微生物における二次代謝の活性化に関与する直接的相互作用を提唱する報告は依然として数が少ない。Brakhage らの研究グループは、*Streptomyces rapamycinicus* が *Aspergillus nidulans* によるポリケチド抗生物質生合成の活性化の間に *A. nidulans* 菌糸に直接付着している SEM 画像を示した (Schroeckh *et al.*, 2009)。この *A. nidulans* ポリケチド抗生物質生合成遺伝子の発現活性化は、ゲノムのヒストン修飾に関わる主要なヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体である Saga/Ada complex を介して起こることが示された (Nutzmann *et al.*, 2011)。これらの結果は、ケミカルコミュニケーション (Straight & Kolter, 2009) 以外にも、直接的な物理的相互作用が微生物間のコミュニケーション手段として普遍的に存在していることを暗示している。しかしながら、物理的付着によってどのようなシグ

ナルが生成し、どのように最終的に二次代謝の活性化に伝達されるかは未だ不明である。

我々は、放線菌の潜在的二次代謝産物遺伝子クラスター活性化による新規天然物の発見を目的とした、共培養法に関する研究を行っている。微生物間相互作用による放線菌潜在的二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの発現の覚醒・活性化を目的とした本方法論は、複雑な微生物群からなる自然生育環境を模倣することに着想を得ている。これまで、放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株とミコール酸含有細菌 *Tsakumurella pulmonis* TP-B0596 株の異属細菌間の相互作用が *S. lividans* による二次代謝産物の産生に強く影響を与えることを見いだしていた (Onaka *et al.*, 2011)。

2 種類の色素性抗生物質 (RED および ACT) の生合成遺伝子をゲノム中に有するが普段は発現していない *S. lividans* を二次代謝誘導細菌株スクリーニングのための指標株として使用した。そのスクリーニングの過程で、土壌から分離されたミコール酸含有細菌 (以下 MACB) である *T. pulmonis* TP-B0596 は、*S. lividans* による色素生産を強く誘導することが見いだされた。興味深いことに、この効果は多様な属種の MACB によって誘導されたが、例えば、枯草菌 *Bacillus subtilis*、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、真菌 *Candida albicans* は誘発効果を示さなかった (Onaka *et al.*, 2011)。潜在的二次代謝の活性化における放線菌と MACB の共培養の効果、この方法を「複合培養 (combined-culture)」と称した。

その後の実験で、更に *T. pulmonis* は広範囲の放線菌における純粋培養では生産されない「潜在的」抗生物質の生産を活性化することが明らかになり、新規天然物として、alchivemycin A (Igarashi *et al.*, 2010)、arcyriaflavin E (Hoshino *et al.*, 2015c)、chojalactone A-C (Hoshino *et al.*, 2015b)、niizalactam A-C (Hoshino *et al.*, 2015a)、dracolactam A-B (Hoshino *et al.*, 2017)、omezawamide A-B (Hoshino *et al.*, 2018)、5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline 類 (Sugiyama *et al.*, 2015)、streptoaminal 類 (Sugiyama *et al.*, 2016) などが単離された。また最近では本方法に着想を得て、放線菌とミコール酸含有細菌の組み合わせから、Bachmann らの研究グループは ciromicin 類を発見し (Derewacz *et al.*, 2015)、Bugni らの研究グループは keyicin を発見している (Adnani *et al.*, 2017)。

MACB はコリネバクテリウム亜目に属し、病原菌である *Mycobacterium tuberculosis* (Smith, 2003)、工業的グルタミン酸生産株 *Corynebacterium glutamicum* (Kimura, 2003)、および有機汚染物質分解者である *Rhodococcus* 属 (Martinkova *et al.*, 2009) を含むグラム陽性桿菌の一

群である。MACBの細胞膜外膜は、脂質に富む構造を有する(Marrakchi *et al.*, 2014)。例えば、*Mycobacterium*の外膜は、グリコペプチドリビッド、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、トレハロース 6,6'-ジミコレート、およびミコール酸を主成分とする(Bansal-Mutalik & Nikaido, 2014)。これらの外膜脂質のうち、ミコール酸はMACBに特異的に保存された成分である。

尾仲ら(2011)は、MACBによる放線菌に対する二次代謝誘導因子を同定する試みとして、*T. pulmonis*のミコール酸を含む脂質抽出物の添加実験を行ったが、ミコール酸のみでは放線菌の二次代謝は誘導されなかった。また、*T. pulmonis*によって産生された拡散性の低分子化合物による活性化を検証するために、*T. pulmonis*の培養液ブタノール抽出物およびフィルターろ過した培養上清の添加実験を行ったが、これらも誘導活性を示さなかった。さらに、*T. pulmonis*および*S. lividans*の2つの培養層を透析膜やメンブレンフィルターで分離することができる二層式フラスコを用いた実験では、*T. pulmonis*の生育による培地状態の変化(主要栄養では炭素源、窒素源、リン酸、やpHなど)の増減の影響を検証したが、*S. lividans*はこの場合においても色素生産をしなかった。また、*C. glutamicum*の細胞膜ミコール酸層を欠損した変異株(*pksI3::Km^r*)がその誘導能を消失していることも明らかになっていた。この結果は、外膜に存在するミコール酸成分が*S. lividans*による色素誘導において重要な役割を果たすことを示唆した。

以上の結果、*S. lividans*の色素生産活性化現象は、これまで知られている放線菌二次代謝活性化因子とは異なる機構を有していることが考えられた。本研究では、誘導因子を明らかにすることを目的として、ミコール酸成分を含有するMACB細胞のミコール酸外膜層との物理的な接触が*S. lividans*の二次代謝をもたらすことを予測し、検証を行った。*S. lividans*がMACBのミコール酸含有細胞外膜層との直接的相互作用に対して二次代謝応答するかどうかを試験するために、ホルムアルデヒド固定および⁶⁰Co線源を用いたγ線照射によりMACB死細胞を調製した。*Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus opacus* B4, および*T. pulmonis*の3種のMACBを実験に使用した。死細胞の細胞形状およびミコール酸成分の保存を確認した後、MACB無傷死細胞による放線菌色素生産誘導を、生育細胞と比較した。複合培養液中における放線菌と、MACB生育細胞または死細胞との相互作用様式について走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

実験方法

使用した培地及び菌株

S. lividans TK23を2種の色素(REDおよびACT)生産の指標株として使用した。3つのMACB株、*T. pulmonis* TP-B0596, *R. erythropolis* PR4, *R. opacus* B4を誘導株として用いた。TSB培地(Trypto-Soya Broth)を種培養に用いた。*S. lividans*による色素の生産培養およびSEMによる細胞間相互作用の観察には、A3MまたはYGGs培地を用いた。A3M培地は、0.5%グルコース、2%デンプン、2%グリセロール、1.5%ファーマメディア、0.3%酵母エキス、1%HP-20を含み、pH7.2に調整した。A3M寒天培地では、1.8%寒天を添加し、HP-20を添加しなかった。YGGs培地は、0.5%グルコース、2%デンプン、2%グリセロール、0.3%酵母エキス、pH7.2に調整した。YGGs寒天培地は1.8%寒天を添加した。

ホルムアルデヒド固定化MACBの作製法

T. pulmonis, *R. erythropolis*, および*R. opacus*を、TSB培地100mlを含むK-1フラスコ中、30℃、200rpmで3日間、完全に増殖するまで培養した。菌体を遠心分離で回収し、オートクレーブした透析膜に充填し、中和ホルムアルデヒド(1%最終濃度)を添加したTSB培地(1L)を用いて3時間処理し、ホルムアルデヒドをTSB培地(1L)で9回透析することにより除去した。固定された細胞の死滅は、TSB寒天プレート上に2ml培養物(>10⁸cfu)由来の固定細胞を接種し、増殖が観察されないことによって確認した。

ホルムアルデヒド固定化MACBにおける走査型電子顕微鏡試料の作製法

SEM分析のための試料調製は、同じ培養バッチからの固定細胞および非固定生細胞を水寒天上にスポットし、さらに2%OsO₄を用いて一晚処理し蒸気固定を行った。固定細胞をPt/Pdイオンスパッタ装置を用いてコーティングし、走査型電子顕微鏡(S-4000, 日立)で観察した。非ホルムアルデヒド処理した細胞を対照として用いて、細胞の形状を比較した。

γ線照射MACB死菌体試料の作製法

T. pulmonis, *R. opacus* および*R. erythropolis*を完全に増殖するまで30℃、200rpmで3日間、100mlのYGGs培地を含むK-1フラスコ中で培養した。遠心分離により800mlの培養液から細胞を回収し、新鮮なYGGs培地で2回洗浄した。回収した菌体を60mlの新鮮なYGGs培地に懸濁し、6つの15mlコニカルチューブに分けた。

日本原子力研究開発機構食品放射線施設（群馬県）において⁶⁰Coを用いた γ 線照射を行った。照射線量は、 γ 線源からの試料の距離を変えることによって調節し、5, 10, 20, 30 または 40kGy の照射を行った。 γ 照射した細胞の死滅は、2ml の培養物 ($>10^8$ cfu) 由来の固定細胞を TSB 寒天プレートに接種し、増殖が観察されないことによって確認した。

γ 線照射 MACB 死菌体試料における走査型電子顕微鏡試料の作製法

γ 線照射によって細胞に損傷がないことを確認するために、同じ培養バッチからの γ 線照射細胞および対照生存細胞を水寒天上にスポットし、さらに2% OsO₄を用いて一晩処理し蒸気固定を行った。固定細胞を Pt/Pd でスパッタコーティングし、走査型電子顕微鏡 (S-4000, 日立) で観察した。非照射細胞を対照として用いて、細胞の形状を比較した。

死菌体試料からミコール酸の抽出と分析方法

T. pulmonis, *R. opacus*, および *R. erythropolis* からの総脂質を、同じ培養由来の生菌体、ホルムアルデヒド固定死菌体および γ 線照射死菌体を加水分解し、エステル化し、抽出した。メタノール中10% KOH 2ml を凍結乾燥細胞に添加し、100℃で2時間加熱した。6N HCl (終濃度0.6N) を加えて酸加水分解を行い、ミコール酸を含む脂質を2ml のヘキサンで2回抽出した。ヘキサン層を乾固し、2ml の BMS 溶液 (ベンゼン:メタノール:硫酸 = 10:20:1) を脂質抽出物に加え、100℃で2時間加熱した。1ml の水を溶液に加え、脂肪酸メチルエステルを2ml のヘキサンで2回抽出した。メチルエステル化脂肪酸を300 μ l の CM (クロロホルム:メタノール = 2:1) に溶解し、2 μ l を TLC にスポットした。HE 溶媒 (ヘキサン:酢酸エチル = 19:1, 2回) により TLC を展開し、CAM (セリウム-アンモニウム-モリブデン酸塩) で処理し、ミコール酸メチルエステルを青色スポットとして呈色させた。

死菌体試料からのミコール酸の質量分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI TOF) マススペクトルを測定した (JMS-S3000, JEOL)。高質量分解能を達成するために349nm の Nd:YLF レーザーの照射によって生成されたイオンは、螺旋軌道 (8 サイクル) の間に20kV で加速された。遅延時間とグリッド電圧の設定は、 m/z 400-1300 の範囲にわたって半値全幅で $\Delta M = 0.02-0.03$ Da を維持するように最適化された。質量分析は、ポリ (メチルメタクリレート), $M_p = 625$ または $M_p = 1310$ を基準として行った

(Polymer Laboratories, UK)。各試料の3つの質量スペクトルを収集し、質量スペクトルデータを Polymerix ソフトウェア (Sierra Analytics, USA) で解析した。

ホルムアルデヒド固定化 MACB を用いた誘導試験 (対峙培養)

S. lividans の孢子 (約 10^8 cfu) を A3M 寒天培地 (約 3×0.3 cm) に塗布した。固定 MACB 死菌体 (10ml の培養液分) を寒天培地にスポットし半乾燥させた。対照として、固定細胞調製のために同じ培養バッチから4℃で保存していた MACB 生菌2 μ l を使用した。寒天プレートを30℃でインキュベートし適時観察を行った。実験を3回繰り返し、10日以上培養し、経時変化を観察した。

γ 線照射 MACB 死菌体を用いた誘導試験 (対峙培養)

S. lividans の孢子 (約 10^8 cfu) を YGGs 寒天上に2 μ l スポットした。MACB の2ml 培養液分の γ 線照射死菌体を寒天培地にスポットし半乾燥させた。対照として、 γ 線照射細胞調製用の同じ培養バッチから4℃で保存していた MACB 生菌2 μ l を使用した。寒天プレートを30℃でインキュベートし適時観察を行った。実験を2回繰り返し、10日以上培養し、経時変化を観察した。

ホルムアルデヒド固定化 MACB を用いた誘導試験 (混合培養)

S. lividans を TSB 培地で3日間培養し、1ml の種培養液を用いて100ml フラスコ中の20ml の A3M 培地に接種した。MACB のホルムアルデヒド固定細胞 (40ml の TSB 培養物由来) を A3M 培地に加えた。対照として、30℃, 180rpm で2日間、試験管中で10ml の TSB で培養した MACB の生菌200 μ l を A3M 培地に同時に添加した。フラスコを30℃, 180rpm で7日間振盪した。

γ 線照射 MACB 死菌体を用いた誘導試験 (混合培養)

S. lividans を TSB 培地で3日間培養し、1ml の種培養液を用いて試験管中の10ml の YGGs 培地に植菌した。MACB の γ 線照射死菌体 (20ml の YGGs 培養物由来) を YGGs 培地に添加した。対照として、30℃, 180rpm で2日間、試験管中で10ml の TSB で培養した MACB の生菌100 μ l を同時に YGGs 培地に添加した。試験管を30℃, 180rpm で7日間振盪した。

色素性二次代謝産物の定量

RED および ACT の定量を行った。アクチノロージン (ACT) を定量するために、0.4ml の2N KOH を0.4ml の培養液に添加した。遠心分離 (3000 \times g, 5分) 後、上清の吸光度 (A640) を分光光度計で測定し、ACT の

モル吸光係数 ($\epsilon_{640}=25320$) を用いて定量した. ウンデシルプロデジオシン (RED) を定量するために, 0.4ml の培養物からの細胞を遠心分離 (10000×g, 5分) によって回収した. 減圧下で細胞を乾燥させた後, 0.4ml の MeOH を添加した. 1時間振盪した後, MeOH 抽出物に 0.4ml の 1N HCl を添加し, 遠心分離した (3000×g, 5分). 上清の吸光度 (A_{530}) を測定し, RED のモル吸光係数 ($\epsilon_{530}=100500$) を用いて定量した.

複合培養菌体の走査型電子顕微鏡試料の作製法

生菌, 固定死菌体, または γ 線照射死菌体を含む培養物を SEM (S-4000, 日立製作所) によって観察した. 100 μ l の培養液を水寒天 (2%) にスポットし, 2% OsO₄ を用いて一晚 (14~16時間) 蒸気固定処理を行った. OsO₄ 固定試料を Pt/Pd イオンスパッタ装置 (E-1030, 日立製作所) を用いてコーティングした. 独立した複数の培養系列を用いて SEM イメージングを実施した

結 果

ホルムアルデヒド固定死菌体は細胞形状とミコール酸組成が維持されていた

細胞形状とミコール酸成分が完全に維持された死菌体を作製するために, 最初にホルムアルデヒド固定を試みた. ホルムアルデヒド固定は, 細胞生物学の研究のための一般的な細胞固定法であり, 官能基を架橋することによってタンパク質/ペプチドを修飾し, 細胞形状を維持させる. そのため, 死滅時に溶菌を起こさずに細胞構造を維持した状態であると考えられる. そこで, *R. erythropolis*, *R. opacus*, および *T. pulmonis* を中和ホルムアルデヒドで処理して細胞を固定することとした. ホルムアルデヒドで処理した細菌は寒天培地上で増殖しないことから殺菌固定化されたことを確認した. ホルムアルデヒド固定細胞と生細胞を SEM で観察し, 細胞形状を比較したところ, ホルムアルデヒド固定細胞の細胞形状は保持されていることが示された (Fig. 1A).

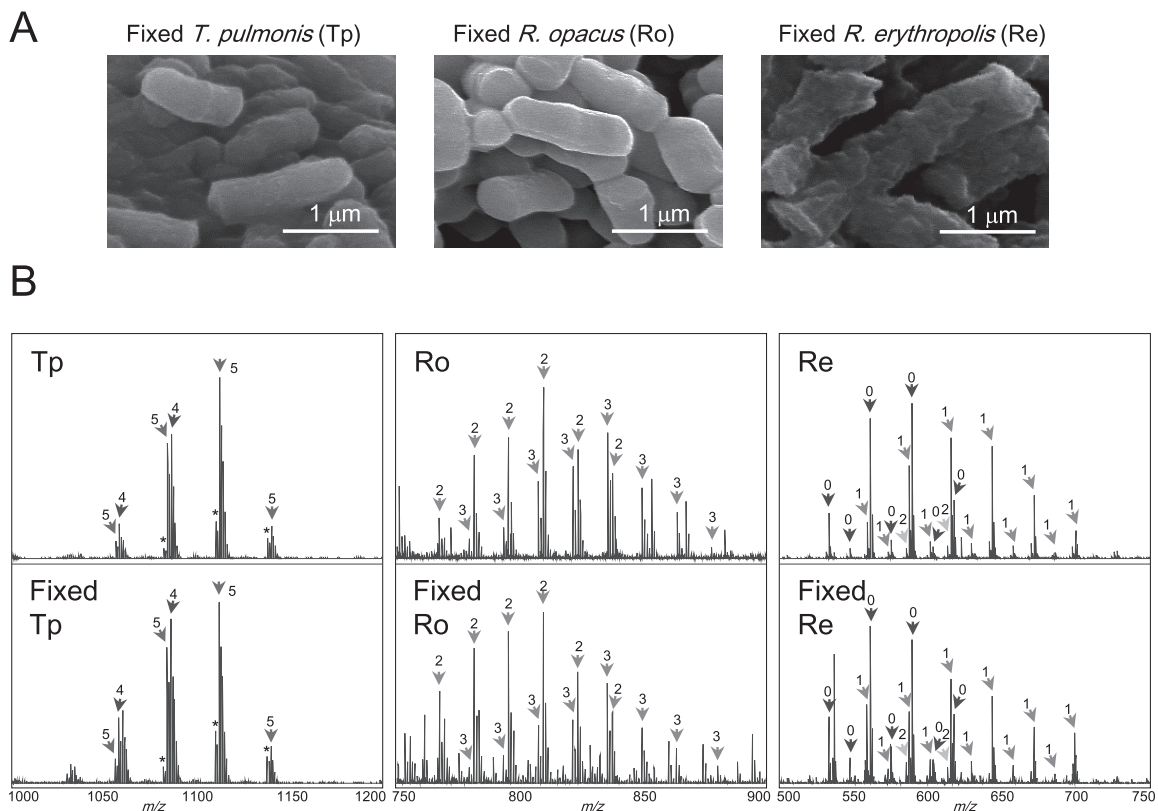


Fig. 1 Conservation of cell shape and mycolic acids by formaldehyde-fixation. (A) SEM images of formaldehyde-fixed MACB. (B) MALDI mass spectra of mycolic acid methylesters from formaldehyde-fixed cells and non-fixed cells. Numbers on arrows represent (0) A-1 MA, (1) A-2 MA, (2) A-3 MA, (3) A-4 MA, (4) A-5 MA, and (5) A-6 MA (MA: mycolic acid). Abbreviations; Tp: *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596, Ro: *Rhodococcus opacus* B4, Re: *Rhodococcus erythropolis* PR4.

R. erythropolis, *R. opacus* および *T. pulmonis* の固定細胞および非固定細胞の総脂質を加水分解, メチルエステル化し抽出した. メチルエステル化全脂質を最初に TLC により分析した. TLC 分析において, ミコール酸を含む脂質画分のスポットは, ほとんど同一のパターンを示したことから, 固定化前後での細胞壁中のミコール酸層が保存されていることが示された. 抽出したミコール酸メチルエステルを, MALDI-TOF-MS により分析した (Teramoto *et al.*, 2015; Teramoto *et al.*, 2013). ミコール酸画分のマススペクトルは, ホルムアルデヒド固定細胞と非固定細胞との間で同一のパターンを示したことから, ホルムアルデヒド固定細胞においてもミコール酸が分解していないことが確認された (Fig. 1B).

実験に用いた MACB のミコール酸組成

MACB は, 多様な炭素鎖長および異なる飽和型のミコール酸を生合成する. 一般的に知られているミコール酸の炭素鎖長は, *Corynebacterium* では C20~C38, *Rhodococcus* では C34~C52, *Tsukamurella* では C64~C78, *Mycobacterium* では C60~C90 である (Butler & Guthertz, 2001). 今回の MALDI-TOF-MS を用いた測定により, *R. erythropolis* PR4 は, C32-C44 の炭素鎖長を有するミコール酸を含有することを確認した. *T. pulmonis* TP-B0596 は, C72-C76 の炭素鎖長を有するミコール酸を含有していた. 興味深いことに *R. opacus* B4 は, C50-C56 の炭素鎖長を有するミコール酸を含んでいた. *R. opacus* のミコール酸は, これまでに報告された *Rhodococcus* 種のものよりも比較的長い鎖長を有していた. 以上の結果から, 異なる炭素鎖及び修飾パターン of ミコール酸を有する固定化 MACB 細胞をミコール酸の効果を試験するために得ることができた.

ホルムアルデヒド固定 MACB 死菌体は放線菌の色素生産を誘導しなかった

まず, 死菌体による誘導効果を寒天培地で試験した. 2ml 培養液分の固定死細胞を A3M 寒天培地にスポットし, *S. lividans* を側方に増殖させた. 対照として, MACB 生菌をスポットした. 生細胞は 2~3 日で広がり, 2 種類の細菌は直接相互作用し始めた. コロニーが互いに接触してから約 1 日後に, *S. lividans* による色素生成が, 相互作用するコロニーの界面で観察された (Fig. 2). しかしながら, 予想外なことに, *S. lividans* は固定死細胞との接触界面で色素を生産しなかった (Fig. 2).

死細胞による誘導効果は液体培地でも試験した. *S. lividans* および 20ml 培養液分の固定死細胞を同じ A3M 培地に接種し培養した. その結果, 固定化された死細胞の添加による培養では RED および ACT の生産活性化は

観察されなかった (Fig. 3A, 3B). 対照として MACB 生細胞を添加した培養では, RED および ACT の産生が向上することは確認されている (Fig. 3A, 3B).

γ 線照射 MACB 死菌体は細胞形状とミコール酸組成が維持されていた

MACB 死菌体では *S. lividans* の色素生産誘導活性が消失することを確認するために, 別の滅菌方法を用いて試験することとした. γ 線照射は細胞中に活性酸素種 (ROS) を生成し, ゲノム DNA や生体分子を破壊する滅菌方法であり, 細胞構造を維持した状態で死菌体を調製することが出来る (Krisiko & Radman, 2010; Min *et al.*, 2003). YGG5 培地を用いて培養した *R. erythropolis*, *R. opacus*, および *T. pulmonis* を用意し, このサンプルに異なる線量率 (1, 2, 4, 6 または 8kGy/時間) になるように ^{60}Co 照射を 5 時間行った. 5kGy 照射を行ったサンプルからは, 生存細胞が観察された. しかし, 10kGy を超える照射を行ったサンプルでは生存細胞が確認できなかった. この結果を踏まえ, 以後の実験には, MACB を完全殺菌するための最小線量である 10kGy 照射サンプルを用いた. γ 線照射 (10kGy) および非照射生細胞を SEM で比較観察したところ, 細胞形状に 10kGy の γ 線照射において明確な損傷は認められず, 細胞は構造を維持した状態で死滅していることが明らかとなった (Fig. 4A).

R. erythropolis, *R. opacus*, および *T. pulmonis* の γ 線照射死細胞および非照射生細胞のメチルエステル化した

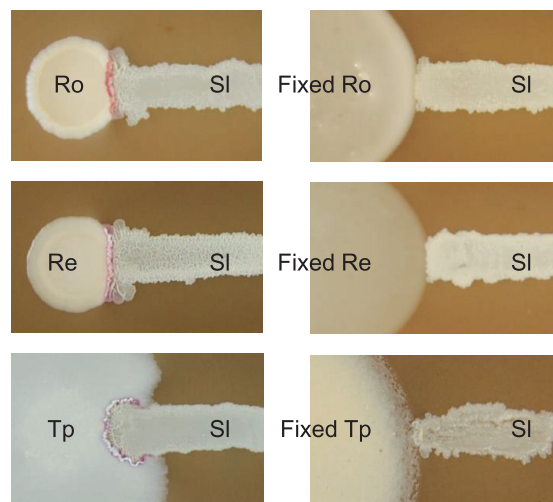


Fig. 2 Pigments inducing effect by formaldehyde-fixed MACB. (A) Induction activity of formaldehydefixed MACB was tested on solid medium. Both bacteria were inoculated on A3M agar and incubated for 5 days at 30 °C.

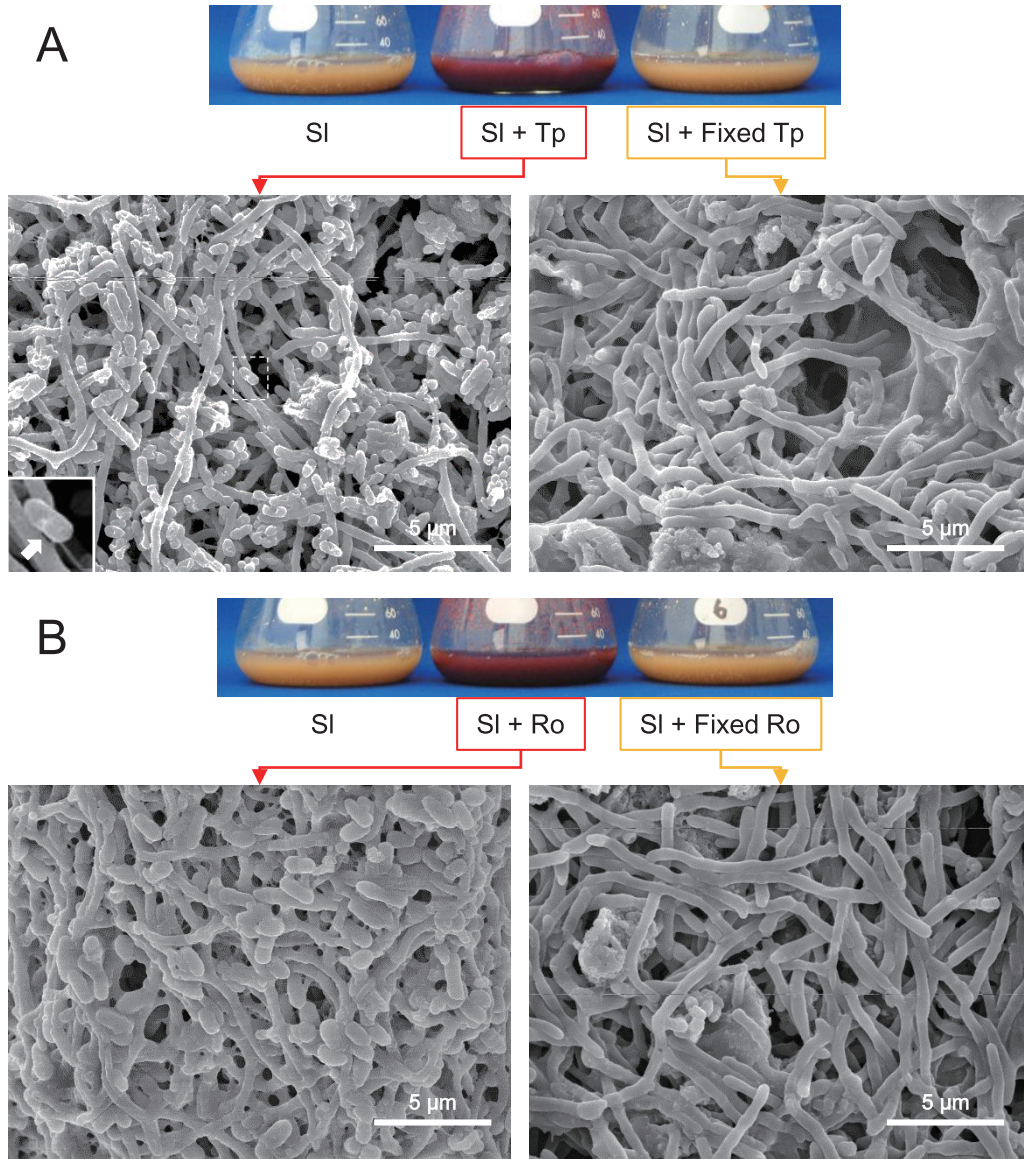


Fig. 3 Induction activity of formaldehyde fixed MACB tested in liquid medium culture. (A) Flask of mixed-culture and SEM images of mixed-culture of *S. lividans* and live *T. pulmonis* (left) or fixed *T. pulmonis* (right). The boxed image (left bottom) indicates the rod-shaped MACB. (B) Flask of mixed-culture and SEM images of mixed-culture of *S. lividans* and live *R. opacus* (left) or fixed *R. opacus* (right). Bacteria were cultured in A3M medium for 5 days at 160rpm, 30 °C.

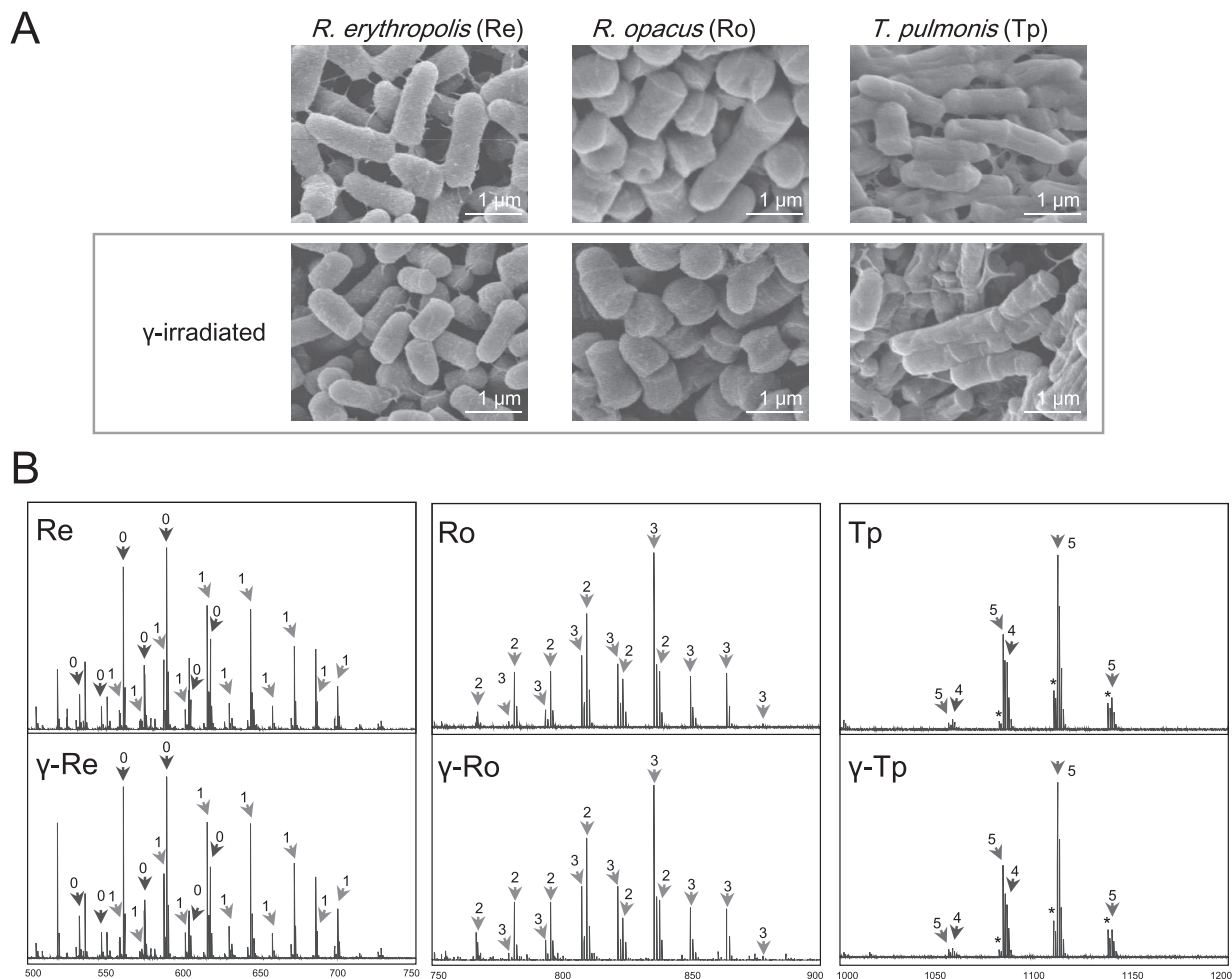


Fig. 4 Conservation of cell shape and mycolic acids by γ -irradiation. (A) SEM images of γ -irradiated MACB. non-irradiated cells of *R. erythropolis*, *R. opacus*, *T. pulmonis* on top (left to right). γ -irradiated (5kGy) cells of *R. erythropolis*, *R. opacus*, *T. pulmonis* on bottom (left to right). (B) MALDI mass spectra of mycolic acid methyl esters from γ -irradiated MACB and live cells. Numbers on arrows represent (0) A-1 MA, (1) A-2 MA, (2) A-3 MA, (3) A-4MA, (4) A-5 MA, and (5) A-6 MA (MA: mycolic acid).

総脂質画分をTLCで分析した。ミコール酸を含む総脂質画分は、TLC分析においてほぼ同一のパターンを示し、細胞壁におけるミコール酸層が両者において保存されていることが確認された。抽出したミコール酸メチルエステルをスパイラル型MALDI-TOF-MSで分析し、 γ 線照射死細胞由来のミコール酸のマススペクトルが非照射生細胞のものと同様のパターンを示すことを確認した (Fig. 4B)。

γ 線照射MACB死菌体は放線菌の色素生産を誘導しなかった

2ml培養液分の γ 線照射死細胞をYGGG寒天培地にスポットし、*S. lividans*と対峙培養した。対照として、

MACB生細胞を用いた培養も行った。MACB生細胞では、2種類の細菌コロニー同士が直接接触した翌日に両コロニーが接触する領域で*S. lividans*による色素生成が観察された (Fig. 5)。一方、対照的に γ 線照射された細胞と*S. lividans*のコロニーが接する領域では、色素生成は全く観察されなかった (Fig. 5)。

液体培養における赤色色素誘導活性を調べるために、*S. lividans*および γ 線照射細胞 (20ml培養液分)をYGGG培地に接種し、液体培養した。赤色色素の増強生産は、MACB生菌を加えた複合培養によって観察された (Fig. 6A-C)。一方、 γ 線照射死細胞の添加では、寒天培地上の結果と同様に赤色色素の生成は全く観察されなかった (Fig. 6A-C)。

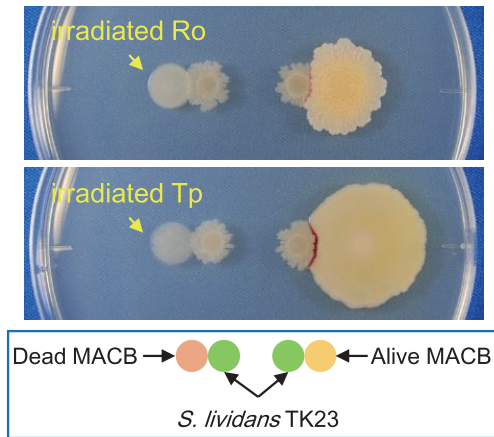


Fig. 5 Pigments inducing effect by γ -irradiated MACB. Induction activity of γ -irradiated MACB was tested on solid medium culture. Both bacteria were inoculated on YGGS agar and incubated for 5 days at 30°C.

MACB 生菌は放線菌菌糸に付着し共凝集した

培養液中でのホルムアルデヒド固定死菌体および生菌との細胞間相互作用を、SEMによって比較した。*S. lividans* と固定 *T. pulmonis* 死菌または固定 *R. opacus* 死菌との混合培養物を SEM で観察した。コントロールとして、*S. lividans* と *T. pulmonis* または *R. opacus* の生菌同士の複合培養液も SEM で観察した。*S. lividans* は菌糸状に、MACB は桿菌として観察された。*S. lividans* と *T. pulmonis* 生菌または *R. opacus* 生菌との複合培養では、MACB は *S. lividans* 菌糸に対して接着する様子が観察された (Fig. 3A, 3B)。対照的に、ホルムアルデヒド固定死菌体の添加培養では、MACB 生菌との複合培養で観察された MACB 生菌の接着は観察されなかった (Fig. 3A, 3B)。続いて、*S. lividans* と γ 線照射死菌体の添加培養液と生菌との複合培養液を YGGS 培地を用いて比較観察した。ホルムアルデヒド固定死菌体を用いた場合の観

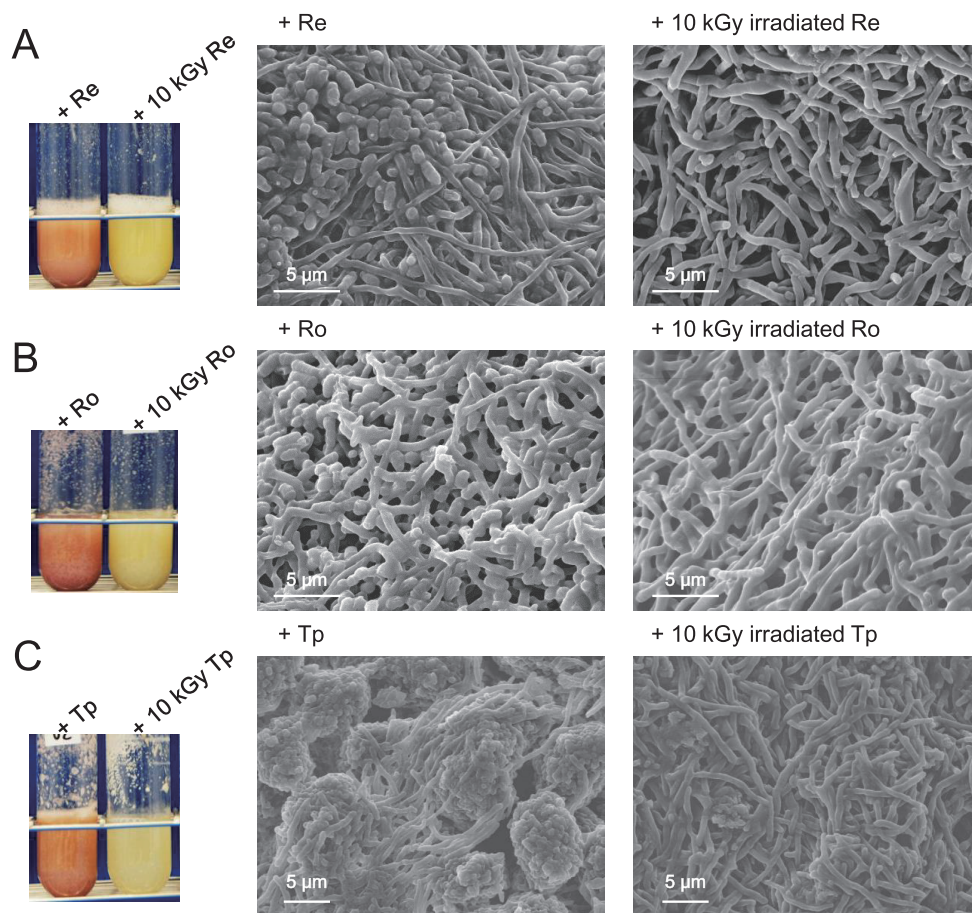


Fig. 6 Induction activity of γ -irradiated MACB tested in liquid medium. (A-C) SEM images were obtained from mixed-cultures in YGGS medium (5 days at 180rpm, 30°C): (A) *S. lividans* with live *R. erythropolis* (left) or γ -irradiated *R. erythropolis* (right). (B) *S. lividans* with live *R. opacus* (left) or γ -irradiated *R. opacus* (right). (C) *S. lividans* with live *T. pulmonis* (left) or γ -irradiated *T. pulmonis* (right).

察と同様に, γ 線照射死菌体と混合した場合, MACB 生菌との複合培養で観察された共凝集は観察されなかった (Fig.6A-C). 対照的に, *S. lividans* と MACB との複合培養において, MACB は, *S. lividans* の菌糸体に対して接着する様子が観察され, 共凝集する様子も観察された

(Fig.6A-C). *S. lividans* によって形成された菌糸ペレットに MACB 生菌が付着する全体の様子を観察するために, 低倍率で SEM 画像を撮影した. その結果, MACB は, *S. lividans* により形成されたペレット全体に付着し, 共凝集形態を形成している様子が観察された (Fig.7A, 7B).

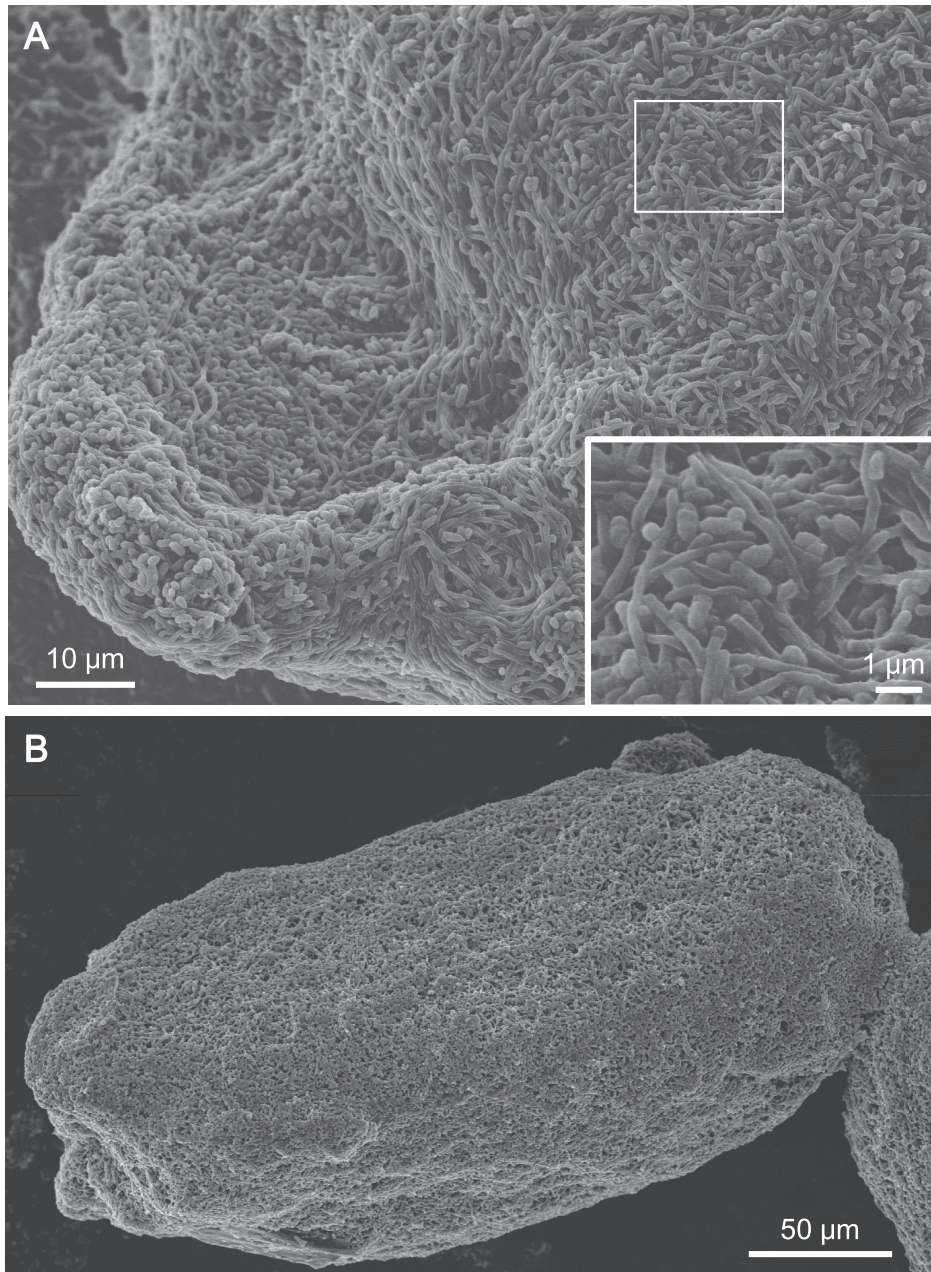


Fig. 7 Co-aggregation of *S. lividans* and MACB observed using SEM. (A) Co-aggregation of *S. lividans* and live *R. erythropolis*. Adhesion of rod-shaped cells of *R. erythropolis* was observed entirely on pellets of *S. lividans* formed in liquid culture. (B) Co-aggregation of *S. lividans* and live *R. opacus*. Adhesion of rod-shaped cells of *R. opacus* were observed entirely on pellets of *S. lividans* formed in liquid culture. Bacteria were cultured in YGGS medium for 5 days at 180 rpm, 30 °C.

考 察

細胞外膜にミコール酸が存在する MACB の細胞構造が、*S. lividans* の潜在的二次代謝産物 (ACT および RED) 生産の誘導をできるかどうかを明らかにするために、細胞構造に損傷のない MACB 死菌をホルムアルデヒド固定および ^{60}Co を用いた γ 線照射によって調製した。MACB 死菌体の細胞形状を SEM を用いて確認したところ、ホルムアルデヒド固定または γ 線照射によって調製された死菌細胞に明確な損傷は見出されなかった。次いで、死菌体中のミコール酸成分を、TLC および MALDI-TOF-MS によって分析した。死菌および生菌細胞から抽出した総脂質を、TLC を用いて比較した分析では、生菌または死菌の両試料中のミコール酸成分に変化がなかった。さらに、ミコール酸の MALDI-TOF-MS を、死菌と生菌との間で比較したところ、死菌体においても生菌と同一のミコール酸成分が観察された。マススペクトル結果と TLC 分析から、定性・定量的にミコール酸は死菌調製の処理前後で分解しておらず、ホルムアルデヒド固定および γ 線照射処理によってミコール酸成分の有意な変化は生じなかったことが明らかになった。

これらの無傷の死滅細胞を使用することにより、*S. lividans* による RED および ACT の誘導能を試験した。その結果、ホルムアルデヒド固定または ^{60}Co - γ 線照射によって生成された死菌体は、両者ともに *S. lividans* による色素生成を誘導しなかった。誘導活性試験の結果は、固体培地および液体培地の両方において、死滅細胞では *S. lividans* の色素生産応答には不十分であることを示し、MACB 生菌のみが有するミコール酸以外の他の何らかの因子が誘導に必要であることを強く示唆した。

MACB 死菌体は色素産生を誘導できなかったことから、*S. lividans* と生菌 MACB との相互作用をさらに調べるために、液体培養中の *S. lividans* と MACB の生菌または死菌との相互作用を SEM を用いて観察した。複合培養における *S. lividans* 菌糸体に対する MACB 生菌の接着する様子を観察した。興味深いことに、2 種類の MACB 細菌 *T. pulmonis* 及び *R. erythropolis* は、*S. lividans* と共凝集を形成していた。*S. lividans* は、通常、液体培養においてベレットを形成し増殖することから、培養中に MACB は *S. lividans* 菌糸体の表面に付着した可能性が高い。*Streptomyces* 種と他の細菌との間のこれらの接着相互作用は、単一種のバイオフィームと比較して、混合バイオフィーム構造を形成する場合に、フィムブリエ構造の広範なネットワークを有することが *Streptomyces griseus* および *Bacillus amyloliquefaciens* において示されている (Winn *et al.*, 2014)。一方、死菌体との混合培養

においては、MACB 死菌体量を増殖定常期と同等以上となるように十分な量を添加したにも関わらず、死菌 MACB の *S. lividans* ベレットへの付着は観察されなかった。これは、MACB の接着特性はミコール酸を有する他に生菌のみが有する特有な性質が関与していることを示唆している。

複数の微生物によって形成される共バイオフィーム構造には、分離状態、層状態、または共存 (ミックス) 状態の 3 つの異なる様式が観察されている (Elias & Banin, 2012)。本研究において、複合培養では 2 つの遺伝的に異なる属の細菌が共凝集体を形成することを示した。このような異属細菌間の共凝集は、口腔内バイオフィームにおいても観察され、複数種が関与するバイオフィーム内では、特異な膜タンパク質が属間共凝集の関係性に影響することが報告されている (Kolenbrander *et al.*, 2010)。*Streptomyces* と MACB の両方が鞭毛をもたない非運動性細菌であるため、物理化学的特性 (Bendinger *et al.*, 1993)、線毛または特異的膜タンパク質 (Antunes *et al.*, 2015) などのいくつかの因子が *S. lividans* と MACB との間の細胞接着を媒介すると予測される。ミコール酸層は疎水性であることから、様々な物質の表面への接着にミコール酸が関与することが推定されている (Zhang *et al.*, 2010)。しかし、脂質に富む外膜が保存された MACB 死菌体は、混合培養において *S. lividans* の菌糸体に付着することが観察されなかったことから、ミコール酸が有する物理化学的な性質だけでは *Streptomyces* 属細菌の細胞表面への接着には不十分であることが明らかになった。生物の有する接着分子としてアドヘシンタンパク質が知られており、これは細菌間接着を促進する最も一般的な細胞成分であると言われている (Kolenbrander *et al.*, 2010)。*Streptomyces* 属放線菌においては接着タンパク質は報告されていないが、今回の結果から未知のアドヘシン様膜タンパク質が、*S. lividans* と MACB の接着に関与している可能性も考えられる。

本研究において、ホルムアルデヒド固定および γ 線照射によって損傷のないミコール酸含有 MACB 死菌体を効率的に調製することに成功した。このようにして調製した MACB 死菌体は *S. lividans* の二次代謝を誘導できないことが明らかになった。この結果は予想外であり、MACB 死菌体が有するミコール酸を含む細胞表面構造だけが *S. lividans* の色素生産応答の直接的な誘導因子ではないことを示している。また、色素生産誘導時の複合培養状態を SEM 観察すると *S. lividans* と MACB 生菌が共凝集していることが観察された。しかしながら、色素産生が誘導されなかった MACB 死菌体では共凝集形成は観察されなかった。MACB が誘導する *S. lividans* による色素産生の活性化には未だ多くの可能性が考えられる

が, *S. lividans* 菌糸体に対する MACB の物理的接触が *S. lividans* の二次代謝生産を変化させる引き金となる可能性が示唆された。

要 約

「複合培養」はミコール酸含有細菌 (MACB) と *Streptomyces* 属放線菌との共培養法であり, *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝を変化させ, 新規天然産物の発見に有用な方法である。これまでに MACB が有する誘導因子を同定するため, 様々な実験を行ったが, *Streptomyces lividans* による色素性二次代謝産物の生産は, ミコール酸やその他の低分子化合物によっては誘導されなかった。MACB を共培養することによって培養条件は動的に変化するが, *S. lividans* による色素生産の活性化は, 両菌のコロニーが直接接触する限られた領域でのみ観察された。このことから, *S. lividans* による色素生産には MACB の直接的な接触が必須であり, MACB 細胞膜上の成分が *S. lividans* による応答において重要な役割を果たすことを示唆した。本研究では *S. lividans* による応答が, 損傷のない MACB 死菌体によって引き起こされるかどうかを調べた。ホルムアルデヒド固定または γ 線照射を用いて, *Tsukamurella pulmonis*, *Rhodococcus erythropolis* および *Rhodococcus opacus* の細胞形状およびミコール酸が保持された死菌体を調製した。固体培養または液体培養への添加実験を行ったが, *S. lividans* はインタクトな MACB 死菌体に対して応答しないことが確認された。走査型電子顕微鏡 (SEM) により複合培養中の両菌の形態観察を行ったところ, MACB 生菌の *S. lividans* 菌糸体への接着が観察され, 両菌による共凝集の形成が観察された。対照的に, MACB 死菌体が *S. lividans* 菌糸体に接着することは観察されなかった。したがって, *S. lividans* の二次代謝を活性化させる要因の一つとして, MACB 生菌の菌糸体への直接的な付着が必須であ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

- 1) 浅水俊平, 尾仲宏康. 2014. 異属細菌による放線菌二次代謝産物の誘導. 日本農芸化学会関東支部例会. 5月24日, 東京.
- 2) 浅水俊平, 尾崎太郎, 尾仲宏康. 2014. 死細胞は放線菌の二次代謝を複合培養において誘導しない. 2014年度日本放線菌学会大会. 6月19-20日, つくば.
- 3) Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Hiroyasu Onaka. 2015. Secondary metabolites induction by mycolic acid-containing bacteria in *Streptomyces*. Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era. Jan 11-14, CA, USA.

- 4) 浅水俊平, 尾崎太郎, 佐藤勝也, 尾仲宏康. 2015. 複合培養における放線菌二次代謝の誘導要因の探索. 2015年度日本農芸化学会大会. 3月26-29日, 岡山.
- 5) 浅水俊平, 尾崎太郎, 寺本華奈江, 佐藤勝也, 尾仲宏康. 2015. 複合培養における放線菌とミコール酸含有菌の生死で異なる相互作用. 第30回日本放線菌学会大会. 9月7-8日, 富山.
- 6) Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Kanae Teramoto, Katsuya Satoh, Hiroyasu Onaka. 2015. Adhesion of alive mycolic acid-containing bacteria is an important factor to induce secondary metabolisms in *Streptomyces*. Pacificchem2015. Dec 15-20, HI, USA.

原著論文

- 1) Asamizu S, Ozaki T, Teramoto K, Satoh K, Onaka H. 2015. Killing of mycolic acid-containing bacteria aborted induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture. PLoS One **10**: e0142372.

謝 辞

γ 線照射による死菌体作製実験は国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所の佐藤勝也博士との共同研究である。ミコール酸成分の質量分析は日本電子株式会社 (当時) の寺本華奈江博士との共同研究である。

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金 (平成24年10月~29年9月) により行われた。また本研究の一部は科研費基盤研究 B (尾仲宏康 25292046), 科研費若手研究 B (浅水俊平 26850044) による研究助成により行われた。

文 献

- Adnani, N., Chevrette, M.G., Adibatla, S.N., Zhang, F., Yu, Q., Braun, D.R., Nelson, J., Simpkins, S.W., McDonald, B.R., Myers, C.L., Piotrowski, J.S., Thompson, C.J., Currie, C.R., Li, L., Rajski, S.R. & Bugni, T.S. 2017. Coculture of marine invertebrate-associated bacteria and interdisciplinary technologies enable biosynthesis and discovery of a new antibiotic, Keyicin. ACS Chem. Biol. **12**: 3093-3102.
- Ahmed, S., Craney, A., Pimentel-Elardo, S.M. & Nodwell, J.R. 2013. A synthetic, species-specific activator of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. Chembiochem **14**: 83-91.
- Andres, N., Wolf, H. & Zahner, H. 1990. Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in inducing cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. Z. Naturforsch. C **45**: 850-855.
- Antunes, C.A., Sanches dos Santos, L., Hacker, E., Kohler, S., Bosl, K., Ott, L., de Luna, M., Hirata, R., Jr., Azevedo, V.A., Mattos-Guaraldi, A.L. & Burkovski, A. 2015. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. Microbiology **161**: 639-647.

- Bansal-Mutalik, R. & Nikaido, H. 2014. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 4958-4963.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H., Altendorf, K. & Zehnder, A.J. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3973-3977.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **58**: 1-26.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K. & Wolfender, J.L. 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol. Adv.* **32**: 1180-1204.
- Butler, W.R. & Guthertz, L.S. 2001. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 704-726.
- Derewacz, D.K., Covington, B.C., McLean, J.A. & Bachmann, B.O. 2015. Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery. *ACS Chem. Biol.* **10**: 1998-2006.
- Elias, S. & Banin, E. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 990-1004.
- Hoeffler, B.C., Gorzelnik, K.V., Yang, J.Y., Hendricks, N., Dorrestein, P.C. & Straight, P.D. 2012. Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 13082-13087.
- Horinouchi, S. & Beppu, T. 2007. Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **83**: 277-295.
- Hoshino, S., Okada, M., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Abe, I. 2017. Mycolic acid containing bacterium stimulates tandem cyclization of polyene macrolactam in a lake sediment derived rare actinomycete. *Org. Lett.* **19**: 4992-4995.
- Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Onaka, H. & Abe, I. 2015a. Niizalactams A-C, multicyclic macrolactams isolated from combined culture of *Streptomyces* with mycolic acid-containing bacterium. *J. Nat. Prod.* **78**: 3011-3017.
- Hoshino, S., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015b. Chojalactones A-C, cytotoxic butanolides isolated from *Streptomyces* sp. cultivated with mycolic acid containing bacterium. *Org. Lett.* **17**: 1501-1504.
- Hoshino, S., Wong, C.P., Ozeki, M., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Abe, I. 2018. Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *J. Antibiot. (Tokyo)* **71**: 653-657.
- Hoshino, S., Zhang, L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015c. Arcyriaflavin E, a new cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated by combined-culture of mycolic acid-containing bacteria and *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823. *J. Antibiot. (Tokyo)* **68**: 342-344.
- Igarashi, Y., Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Kan, Y., Fujita, T., Iwashita, T., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. 2010. Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **12**: 3402-3405.
- Kimura, E. 2003. Metabolic engineering of glutamate production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**: 37-57.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Periasamy, S. & Jakubovics, N.S. 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 471-480.
- Krisko, A. & Radman, M. 2010. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 14373-14377.
- Liu, G., Chater, K.F., Chandra, G., Niu, G. & Tan, H. 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**: 112-143.
- Marmann, A., Aly, A.H., Lin, W., Wang, B. & Proksch, P. 2014. Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar. Drugs* **12**: 1043-1065.
- Marrakchi, H., Laneelle, M.A. & Daffe, M. 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* **21**: 67-85.
- Martin, J.F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* **186**: 5197-5201.
- Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J. & Kren, V. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ. Int.* **35**: 162-177.
- Min, J., Lee, C.W. & Gu, M.B. 2003. Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **42**: 189-192.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 1362-1384.
- Nutzmann, H.W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schumann, J., Hertweck, C., Strauss, J. & Brakhage, A.A. 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 14282-14287.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Recio, E., Colinas, A., Rumero, A., Aparicio, J.F. & Martin, J.F. 2004. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. *J. Biol. Chem.* **279**: 41586-41593.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. & van Wezel, G.P. 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* **9**: 670-675.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nutzmann, H.W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. & Brakhage, A.A. 2009. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidu-*

- lans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**: 14558-14563.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. **16**: 463-496.
- Straight, P.D. & Kolter, R. 2009. Interspecies chemical communication in bacterial development. Annu. Rev. Microbiol. **63**: 99-118.
- Straight, P.D., Willey, J.M. & Kolter, R. 2006. Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of surfactants in raising aerial structures. J. Bacteriol. **188**: 4918-4925.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Kakeya, H. 2015. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. Org. Lett. **17**: 1918-1921.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Kakeya, H. 2016. Discovery and total synthesis of streptoaminals: antimicrobial [5,5]-spirohemiaminals from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **55**: 10278-10282.
- Teramoto, K., Suga, M., Sato, T., Wada, T., Yamamoto, A. & Fujiwara, N. 2015. Characterization of mycolic acids in total fatty acid Methyl ester fractions from *Mycobacterium* species by high resolution MALDI-TOFMS. Mass. Spectrom. (Tokyo) **4**: A0035.
- Teramoto, K., Tamura, T., Hanada, S., Sato, T., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Sato, H. 2013. Simple and rapid characterization of mycolic acids from *Dietzia* strains by using MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power. J. Antibiot. (Tokyo) **66**: 713-717.
- Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C. & Kolter, R. 2013. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. MBio **4**:
- Vargas-Bautista, C., Rahlwes, K. & Straight, P. 2014. Bacterial competition reveals differential regulation of the pks genes by *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **196**: 717-728.
- Willey, J.M., Willems, A., Kodani, S. & Nodwell, J.R. 2006. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. Mol. Microbiol. **59**: 731-742.
- Winn, M., Casey, E., Habimana, O. & Murphy, C.D. 2014. Characteristics of *Streptomyces griseus* biofilms in continuous flow tubular reactors. FEMS Microbiol. Lett. **352**: 157-164.
- Zhang, Z., Pen, Y., Edyvean, R.G., Banwart, S.A., Dalglish, R.M. & Geoghegan, M. 2010. Adhesive and conformational behaviour of mycolic acid monolayers. Biochim. Biophys. Acta. **1798**: 1829-1839.

ミコール酸含有細菌に対する放線菌二次代謝応答機構の網羅的転写解析

浅水 俊平, 尾崎 太郎, 菅井 佳宣, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

RNA sequencing analysis of contact-dependent secondary metabolism responses by *Streptomyces coelicolor*

Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Yoshinori Sugai, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

Streptomyces species respond to mycolic acid-containing bacteria e.g. *Tsukamurella pulmonis* by production of secondary metabolites in a contact-dependent manner. Here we investigated the gene(s) responsible for the activation of secondary metabolism such as red pigmented antibiotic undecylprodigiosin (RED), to explore the molecular basis of the response mechanism of *Streptomyces* species. Using *Streptomyces coelicolor* JCM4020 as a response model actinomycetes, we examined the gene expression variation caused by *T. pulmonis* or *Bacillus subtilis* by employing an RNA-sequencing technique. We found that 20.0 % of all whole genes from *S. coelicolor* showed more than 2-fold expression variation, whether up or down, at a 7.5h time point. A comparison of the number of differentially expressed genes in co-culture with *B. subtilis* indicated that *T. pulmonis* can affect the gene expression of *S. coelicolor* more strongly. At a 2-hour earlier time point, we identified the activation of genes which are under the regulation of PhoP, a response regulator in the PhoR-PhoP two component system. These contained *pstSCAB*, a phosphate transporter, and a *SCO4877* homolog, possibly involved in teichulosonic acid biosynthesis under phosphate starvation conditions. Interestingly, *B. subtilis* did not affect the PHO regulons. The RNA-seq experiments may have revealed how *S. coelicolor* adapted to the environment under combined-culture condition, however, alternative experimental approaches will be necessary to investigate how *S. coelicolor* responds to the contact by *T. pulmonis*.

Key words: *Streptomyces*, mycolic acid-containing bacteria (MACB), transcriptomic analysis, PHO regulon, *Tsukamurella*

緒 言

Streptomyces 属に代表される放線菌は、土壌など様々な環境に生息し、菌糸状に生育するグラム陽性細菌であ

り、医・農薬として使用される重要な生物活性を有する二次代謝産物の生産者として知られている。また最近のゲノム解析から、*Streptomyces* 属放線菌には、一株につき20-40個もの「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが示唆されている (Nett *et al.*, 2009)。この事実は、これまでに実験室環境下で発見されてきた天然物は、実はほんの一部であり、自然界ではこれまでに知られていない多種多数の二次代謝産物が存在し、機能していることを強く示唆している。このような実験室環境下において発現が困難な放線菌二次代謝を活性化することを目的とし、これまでに世界中の多くの研究者が様々な方法を用いて挑戦している。

E-mail: 浅水俊平 (asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

尾崎太郎 (ozaki@sci.hokudai.ac.jp)

菅井佳宣 (yoshinorisugai2158@gmail.com)

尾仲宏康 (aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

共同研究者: 佐々木禎子 (慶応大学理工学部生命情報学科)

吉田昭介 (慶応大学理工学部生命情報学科,

現 京都大学白眉センター)

宮本憲二 (慶応大学理工学部生命情報学科)

モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) による赤色素ウンデシルプロディギオシン (RED) または青色素アクチノロージン (ACT) の生合成遺伝子クラスターの活性化機構に関しては、無機リン酸を制限することにより活性化されることや (Martin, 2004), ペプチドグリカン構成成分である *N*-アセチルグルコサミンを最少培地に添加すると生産が活性化することが知られている (Rigali *et al.*, 2008). その他、放線菌二次代謝のエリシター様低分子化合物として、PI 因子 (Recio *et al.*, 2004), goadsporin (Onaka *et al.*, 2001), hormaomycin (Andres *et al.*, 1990) なども知られている。これらは環境中の栄養素に対する応答機構、自己溶菌や他の細菌の細胞構成成分分解物に対する応答機構、そして細胞外に物質を排出、拡散させてシグナルを伝達させる機構などの存在を示し、物質を介した多様な微生物間の相互作用の仕組みを垣間見せている。

一方で、直接的相互作用が微生物における二次代謝の活性化に関与する例はこれまでにほとんど知られていない。Brakhage らのグループは、*Streptomyces rapamycinicus* が *Aspergillus nidulans* によるポリケチド抗生物質生合成の活性化の間に *A. nidulans* 菌糸に直接付着する SEM 画像を示した (Schroeckh *et al.*, 2009)。この *A. nidulans* ポリケチド抗生物質生合成遺伝子の発現活性化は、ゲノムのヒストン修飾に関わる主要なヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体である Saga/Ada complex を介して起こることが示された (Nutzmann *et al.*, 2011)。この結果は、ケミカルコミュニケーション (Straight & Kolter, 2009) 以外にも、直接的な物理的相互作用が微生物間のコミュニケーション手段として普遍的に存在していることを暗示している。しかしながら、物理的刺激の実体や、どのようなシグナルとして受け取られ、そしてどのような伝達経路を介し最終的に二次代謝の活性化を引き起こすかは未解明である。

尾仲らは放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株とミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株の異属細菌間の相互作用が *S. lividans* による二次代謝産物の生産に強く影響を与えることを見いだした (Onaka *et al.*, 2011)。そして興味深いことに *S. lividans* の色素生産活性化現象は、物質が関与する機構では説明ができず、物理的な刺激を介した相互作用に起因することが示唆されている。物理的な接触を介した微生物間の相互作用としては、これまでに大腸菌の CDI (contact-dependent growth inhibition) 機構、同種粘液細菌間の外膜交換による運動性の補完、グラム陰性細菌に保存される VI 型分泌装置 (T6SS) などが知られている (Stubbenieck & Straight, 2016)。大腸菌の CDI 機構は近縁種のみにも有効なトキシン蛋白質を接触依存的に供与する機構であ

る。また VI 型分泌装置 (T6SS) は、グラム陰性細菌に保存されるトキシン分泌装置であり、異属細菌にトキシン蛋白質を注入し近隣に生育する異属細菌との競合のために用いられることが明らかになっている。放線菌やミコール酸含有細菌に CDI 機構や VI 型分泌装置、または類似する機構が存在することはこれまでに知られていない。

本研究では放線菌 *S. coelicolor* JCM 4020 株を用いて、純粋培養、*T. pulmonis* TP-B0596 株との複合培養、または *B. subtilis* 168 株との共培養の 3 種類の条件における *S. coelicolor* の網羅的遺伝子発現量を RNA シーケンスにより解析し、*S. coelicolor* の転写変動遺伝子の機能から接触応答に関与する分子機構を推定し、特に *T. pulmonis* の接触刺激に対する *S. coelicolor* の特異的な転写応答機構 (接触依存的な応答機構) を明らかにすることを目指した。

実験方法

網羅的転写解析に使用した菌株及び培地

S. coelicolor JCM 4020 株による赤色素 (RED) 生産を放線菌二次代謝活性化の指標として使用した。mycolic acid-containing bacteria (MACB) として *T. pulmonis* TP-B0596 株を放線菌二次代謝産物生産の誘導株として用いた。*B. subtilis* 168 株を *S. coelicolor* JCM 4020 株の共培養に対する転写応答の比較解析のために用いた。YGGs 培地を種培養に用いた。*S. coelicolor*, *T. pulmonis*, *B. subtilis* 生産培養には YGGs 培地を用いた。YGGs 培地は、0.3% 酵母エキス、0.5% グルコース、2% グリセロール、2% デンプンを含み、pH 7.2 に調整した。YGGs 寒天培地は 1.8% 寒天を添加した。

網羅的転写解析のための複合培養

前培養のため 100ml の YGGs 培地が入った K-1 型フラスコに植菌し、*S. coelicolor* を 3 日間、*T. pulmonis* (または *B. subtilis*) を 2 日間、200rpm、30℃ で回転振盪培養を行った。前培養液からの代謝産物の持ち込みを除くために、集菌し、培地による菌体の洗浄を行った。*S. coelicolor* 及び *T. pulmonis* (または *B. subtilis*) を 50ml のコニカルチューブに移し、等量の YGGs 培地を用いて 3 度洗浄した。集菌操作は遠心分離 (2,000g, 10 分, 4℃) により行った。本培養は 100ml 三角フラスコに 12ml の YGGs 培地を入れ、200rpm、30℃ で回転振盪培養を行った。複合培養には湿重量 0.6g の *S. coelicolor* 菌体と湿重量 0.02g の *T. pulmonis* 菌体 (または *B. subtilis* 菌体) を植菌し、純粋培養には湿重量 0.6g の *S. coelicolor* 菌体を植菌した。

トータルRNAの抽出

1.5ml チューブに0.8mlのRNAprotect® Bacteria Reagent (キアゲン) を分注し、そこに0.4mlの培養液を添加し、10秒間ボルテックスで攪拌し、RNAの分解を抑制した。5分間静置し、遠心分離(5,000g, 10分, 4℃)により菌体を回収した。菌体をTE緩衝液に懸濁し、リゾチーム(終濃度20mg/ml)とプロテイナーゼK(終濃度2mg/ml)を加え、10分おきに攪拌しながら30分間室温で静置した。トータルRNAの抽出はRNeasy Mini Kit (キアゲン)を用いた。1%の2-メルカプトエタノールを含むキット添付のRLT溶液(Lysis buffer, 0.7ml)を菌体懸濁液に添加し、0.2ml容積のジルコニアビーズ(直径0.5mm)が入った2mlのOリングチューブに移した。ビーズビーター(3,750rpm, 10秒, 6回)を用いて細胞を破碎し、以後キアゲンの製品プロトコールに従いトータルRNAの精製を行った。2時間後, 4時間後, 7.5時間後にサンプリングを行い、サンプリング後、直ちにトータルRNAを抽出した。トータルRNA濃度をNanoDrop2000により測定し、Agilent Bioanalyzer 2100(RNA 6000 Nanoキット)を用いてトータルRNA精製純度、及び分解度を測定した。各サンプルに対してn=4でトータルRNAを抽出し、最もクオリティーが高かったロットについて、n=2で以後の実験に用いた。

rRNAの除去、cDNA合成

DNase IによりトータルRNAサンプルを処理し、混入したゲノムDNAを分解し、定法に従いトータルRNAを精製した。リボソームRNA(rRNA)は総RNAの約95%を占めるため、次世代シーケンスによって得られるデータの多くを占めてしまうことから、rRNAの除去を行った。トータルRNAサンプル(2µg)からRibo-Zero rRNA removal Kit(イルミナ)により、23S, 16S, 5S rRNAを除去した。Agencourt RNAClean® XP(Beckman Coulter)を用いてrRNAを除去した残りのRNA(mRNA及びtRNA等)を精製した。Agilent Bioanalyzer 2100(RNA 6000 Nanoキット)を用いて精製RNAサンプルを測定し、rRNAが除去されていることを確認した。

cDNA合成と次世代シーケンスライブラリー合成のためにNEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®を用いた。mRNAを約200bp程度にフラグメント化し、NEB社の製品プロトコールに従って、cDNAライブラリーを合成した。Agencourt AMPure XP(Beckman Coulter)を用いてcDNAを精製した。NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina®(Index Primers Set 1 and 2, NEB #E7335, #E7500)をインデックスプライマーとして用いた。Agilent Bioanalyzer 2100(High Sensitivity DNAキット)を用いてcDNAの断片サイズ

および純度を測定した。

PacBioによる*Streptomyces coelicolor* JCM 4020株ゲノム配列の決定

Streptomyces coelicolor JCM 4020株のゲノム配列をPacBio RS II一分子シーケンス(BGI受託シーケンス)を行い、平均20kb断片のシーケンスを取得した(それぞれ約0.3及び0.9Gb)。得られたデータをCanu/Celera Genome Assemblerを用いてアセンブリ解析に供した結果、一本のコンティグを得ることに成功した。得られたゲノムDNA塩基配列をRAST(<http://rast.nmpdr.org/>)を用いて推定遺伝子機能の自動アノテーションを行った。

S. coelicolor JCM 4020株はゲノムサイズ8,620,775bp, GC含量72.2mol%, coding sequence(CDS)数7786個であった。同定された*S. coelicolor* JCM4020株遺伝子配列(及び翻訳産物のアミノ酸配列)は、すでに完全ゲノムが報告されている*Streptomyces coelicolor* A3(2)M145株とほぼ一致していた(ゲノムサイズ8,667,507bp, GC含量72.1mol%, coding sequence(CDS)数7877個)。そこで本論文では、便宜的に*S. coelicolor* A3(2)M145株に用いられている遺伝子番号(SCOナンバー)を遺伝子名として表記した。

MiSeqによるRNAシーケンスとシーケンスリード解析

構築したcDNAライブラリーをMiSeq(イルミナ)を用いてシーケンスを行った。MiSeq Reagent Kit v3(ペアエンド, 75×2サイクル)を用いた。得られたFASTQデータをCLCゲノミクスワークベンチ(キアゲン)を用いて、ショートリードのテンプレートゲノム配列へのマッピングを行い、それぞれの遺伝子転写量をRPKM値(正規化されたリード数)への変換により算出した。RPKM値を基にサンプル間の遺伝子発現量の差をEDGE法により算出した。有意な発現量の差としてp値が0.01以下に設定し、p値が0.01以下の遺伝子のfold change値(発現比)の値を基に、以後の転写変動解析を行った。

結果及び考察

複合培養における転写変動遺伝子数の経時的変化

転写量が増加した遺伝子の数を抽出した(閾値: $p < 0.01$, 複合培養時のRPKM値 > 20 , 複合培養時のリード数 > 5)。その結果、*T. pulmonis*との複合培養において2倍以上に転写活性化された(EDGEテストを基にした発現比が2倍)遺伝子の数は、2時間で148個、4時間で432個、8時間で719個に及んだ(Fig. 1A)。次に転写量が減少した遺伝子の数を抽出した(閾値: $p < 0.01$,

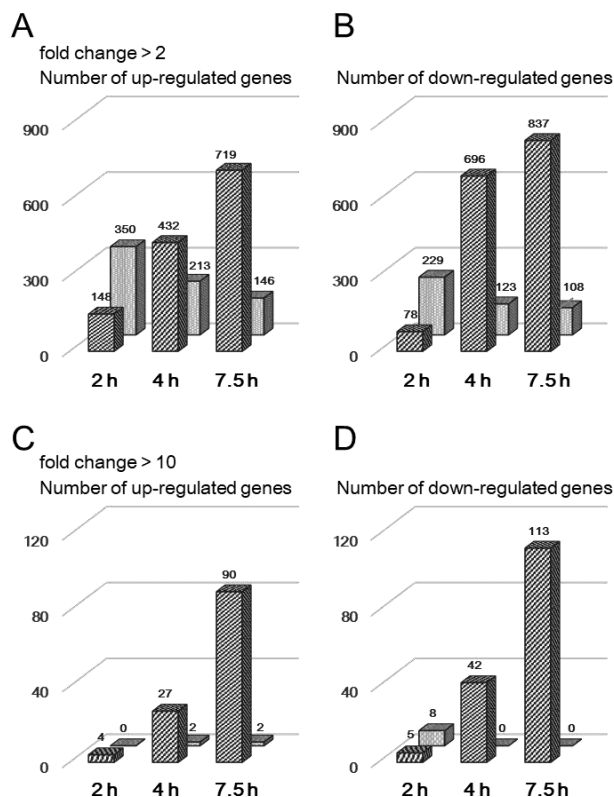


Fig. 1 Number of variation genes in combined-culture with *T. pulmonis*. (A) Number of genes up-regulated (fold change >2) in combined-culture with *T. pulmonis* (in the front row) and *B. subtilis* (in the back row). (B) Number of genes down-regulated (fold change >2) in combined-culture with *T. pulmonis* and *B. subtilis*. (C) Number of genes up-regulated (fold change >10) in combined-culture with *T. pulmonis* and *B. subtilis*. (D) Number of genes down-regulated (fold change >10) in combined-culture with *T. pulmonis* and *B. subtilis*.

純粋培養時の RPKM 値 >20, 純粋培養時のリード数 >5). その結果, 半分以下に転写抑制された遺伝子 (EGDE テストを基にした発現比が 1/2 倍) の数は, 2 時間で 78 個, 4 時間で 696 個, 8 時間で 837 個に及んだ (Fig. 1B). *T. pulmonis* との複合培養において活性化・抑制される遺伝子の数は, 共に経時的に増加する傾向が観察された. *S. coelicolor* JCM 4020 の全推定遺伝子の数は 7,786 個であることから, 7.5 時間の時点で 9.2% の遺伝子発現が活性化され, 10.8% の遺伝子発現が抑制されたことになる. つまり, 驚くべきことに本実験において全遺伝子の 20% におよぶ発現が *T. pulmonis* との複合培養によって有意に影響を受けたことが示された. この結果は一方で, *T. pulmonis* との接触依存的な *S. coelicolor*

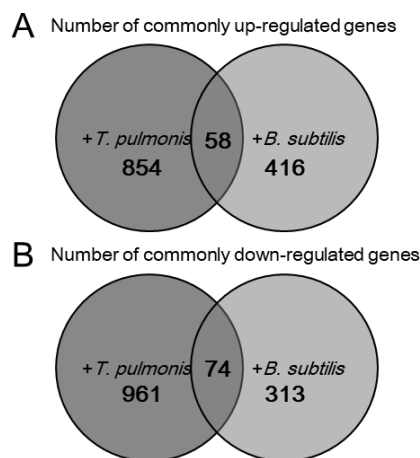


Fig. 2 Venn diagram for number of commonly variation genes. (A) Venn diagram for number of genes commonly up-regulated (fold change >2) in combined-culture with *T. pulmonis* (as indicated in the circle) and *B. subtilis* (as also indicated in the circle). (B) Venn diagram for number of genes commonly down-regulated (fold change <1/2) in combined-culture with *T. pulmonis* and *B. subtilis*.

による応答機構に関与する特異的因子を見出すことを極めて困難にした.

枯草菌共培養との比較解析

一方 *B. subtilis* との共培養では, 2 倍以上転写活性化された遺伝子の数 (閾値: $p < 0.01$, 複合培養時の RPKM 値 >20, 複合培養時のリード数 >5) は, 2 時間で 350 個, 4 時間で 213 個, 8 時間で 146 個であった (Fig. 1A). また 1/2 以下の転写抑制された遺伝子の数 (閾値: $p < 0.01$, 純粋培養時の RPKM 値 >20, 純粋培養時のリード数 >5) は, 2 時間で 229 個, 4 時間で 123 個, 8 時間で 108 個であった (Fig. 1B). 意外なことに, *B. subtilis* との共培養では, *T. pulmonis* との複合培養と異なり, 活性化・抑制される遺伝子の数は, 初期に変動遺伝子がやや多くなるが, 経時的に共に減少する傾向が観察された.

T. pulmonis または *B. subtilis* との共培養によっていずれかの時点で, 少なくとも一度 2 倍以上発現が活性化している遺伝子 (*T. pulmonis* では 912 個, *B. subtilis* では 474 個) について, 共通して発現が活性化された遺伝子を抽出すると, その数は 58 個 (6.4%) しか存在しなかった (Fig. 2A). また同様に, *T. pulmonis* または *B. subtilis* との共培養によっていずれかの時点で, 少なくとも一度 1/2 以下に発現が抑制されている遺伝子 (*T. pulmonis* では 1035 個, *B. subtilis* では 387 個) について, 共通して発現が抑制されている遺伝子を抽出すると, その数は

74個 (7.1%) のみであった (Fig.2B). これらの結果から, *S. coelicolor* JCM 4020 株は *T. pulmonis* TP-B0596 株に対して, *B. subtilis* 168 株とは全く異なる応答, 適応機構を発現することが強く示唆された.

遺伝子発現比が5倍を超える遺伝子の数

特に強く影響を受けた遺伝子の数に注目すると, *T. pulmonis* との複合培養において10倍以上転写活性化された遺伝子の数は2時間で4個, 4時間で27個, 7.5時間で90個見いだされた (Fig.1C). また1/10以下の転写抑制された遺伝子の数は, 2時間で5個, 4時間で42個, 7.5時間で113個見いだされた (Fig.1D). 一方 *B. subtilis* との共培養では10倍以上転写活性化された遺伝子の数は2時間で0個, 4時間で2個, 7.5時間で2個であった (Fig.1C). また1/10以下の転写抑制された遺伝子の数は, 2時間で8個, 4時間で0個, 7.5時間で0個であった (Fig.1D). 以上の結果は, *S. coelicolor* は, *B. subtilis* よりも *T. pulmonis* に対して, より強く転写レベルでの応答機構が発現することを示している.

転写活性化された変動遺伝子の機能的内訳

培養開始後, 二時間の時点で転写が活性化されていた遺伝子について以下に記載する. 変動値 (fold change) の信頼性をできるだけ担保するために, 閾値を $p < 0.01$, 複合培養時の RPKM 値 > 20 , 複合培養時のリード数 > 20 という設定で解析を行った. 環境応答に関わる ECF シグマ因子や, 蛋白質のリン酸化を介した制御に関わる二成分制御系下流に存在するレギュロンなどの転写応答は2時間以内に十分起こると考えられることから, 共培養後, 2時間の時点で大きく転写変動する遺伝子に注目した. 転写量が2倍以上に増加した遺伝子は合計122個存在し, その内訳は, 翻訳因子 (5個), 推定転写制御因子 (5個), 酵素 (37個, 内 EC ナンバーが付与された蛋白質32個), トランスポーター (23個, 内 TC ナンバーが付与された蛋白質9個), 推定膜蛋白質 (14個), 機能未知推定蛋白質 (32個), その他 (6個) であった (Fig.3A). 意外なことに, 抽出された遺伝子の中に予想された ECF シグマ因子などはなく, また転写制御に関わると推定される蛋白質 (5個) も予想外に少なかった. 一方で, トランスポーターなどの取り込み・排出系の遺伝子や, 酵素遺伝子の発現の転写が活性化したことが観察された.

転写抑制された変動遺伝子の機能的内訳

培養開始後二時間の時点で転写が抑制されていた遺伝子について選抜した. これも変動値 (fold change) の信頼性をできるだけ担保するために, 閾値を $p < 0.01$,

純粋培養時の RPKM 値 > 20 , 純粋培養時のリード数 > 20 という設定で行った. 転写量が1/2以下に減少した遺伝子は合計70個存在し, その内訳は, 推定転写制御因子 (9個), 酵素 (27個, 内 EC ナンバーが付与された蛋白質17個), トランスポーター (9個), 推定膜蛋白質 (5個), 機能未知推定蛋白質 (15個), その他 (5個) であった (Fig.3B). 活性化された遺伝子の数と比較し, 転写制御に関わると推定される蛋白質 (9個, 12.9%) の割合がやや多く, トランスポーターなどの取り込み・排出系の遺伝子や, 酵素遺伝子の発現の転写の抑制も目立った.

大幅に転写活性化された変動遺伝子の推定機能

前述の枯草菌との共培養では, 転写量の変動が10倍以上に増加, または1/10以下に減少する遺伝子が極めて少なかったため, *T. pulmonis* との複合培養によって特に大きく変動した遺伝子に注目した. 2時間の時点で, 転写量が5倍以上に増加した遺伝子は6個存在した (Table 1). その内4個は *pstS* (SCO4142, 7.7倍) 及びオペロンを構成する *pstCBA* (SCO4141-4139, 5.3~5.7倍) であった (Table 1). PstABCS は, 環境中からの無機リン酸の取り込みに関わる ABC トランスポーターを構成する因子であると言われている (Martin *et al.*, 2017). *pstSCBA* 遺伝子は二成分制御系 (Two component system, TCS) である PhoR-PhoP の応答制御因子 PhoP のリン酸化により転写活性化される PHO レギュロンの下流に存在する遺伝子オペロンであることがわかってい

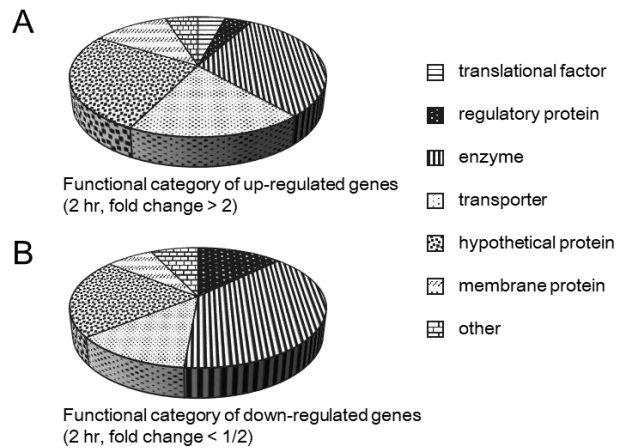


Fig. 3 Pie chart of functional category for up- or down-regulated genes.

(A) Pie chart of functional category for up-regulated genes (fold change > 2) in combined-culture with *T. pulmonis* at 2hr. (B) Pie chart of functional category for down-regulated genes (fold change $< 1/2$) in combined-culture with *T. pulmonis* at 2hr.

Table 1 List of up- or down-regulated gens in the combined-culture with *T. pulmonis*.
The column SCO homolog indicate homologous gene for *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain M145 and the identities.

gene ID	SCO homolog	identity (%)	putative function	fold change	p-value	RPKM (mono-culture)	RPKM (combined-culture)
JCM 4020_3576	SCO4142	370/370 (100%)	PstS	7.7	2.17E-11	37.3	253.4
JCM 4020_2863	SCO4877	441/444 (99%)	hypothetical protein	6.3	6.08E-05	4.1	23.3
JCM 4020_0296	SCO7536	733/739 (99%)	RND superfamily exporter (YdfJ)	6.3	1.59E-26	19.4	109.9
JCM 4020_3577	SCO4141	334/336 (99%)	PstC	5.7	1.20E-07	11.6	58.5
JCM 4020_3578	SCO4140	353/354 (99%)	PstA	5.6	2.07E-06	9.1	45.5
JCM 4020_3579	SCO4139	258/258 (100%)	PstB	5.3	1.06E-07	15.1	70.8
JCM 4020_3696	SCO4032	166/166 (100%)	Transcriptional regulator (MarR family)	-23.9	1.18E-37	90.8	3.3
JCM 4020_2260	SCO5484	55/55 (100%)	Hypothetical protein	-19.6	5.79E-18	53.6	2.3
JCM 4020_1756	SCO5957	532/533 (99%)	Major facilitator superfamily	-10.7	7.22E-80	229.2	19.1
JCM 4020_3697	SCO4031	834/835 (99%)	Major facilitator superfamily / Carboxy peptidase regulatory-like	-10.1	9.51E-23	98.1	8.6
JCM 4020_5345	SCO2310	584/585 (99%)	Major facilitator superfamily / Carboxy peptidase regulatory-like	-10.1	8.70E-59	161.8	14.3
JCM 4020_2259	SCO5485	97/97 (100%)	Hypothetical protein	-7.2	5.15E-21	103.9	12.9
JCM 4020_3698	SCO4030	271/273 (99%)	Carboxy peptidase regulatory-like / YceI	-6.7	2.07E-11	37.5	4.9
JCM 4020_6895	SCO0923	649/649 (100%)	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (SdhA)	-5.3	9.44E-65	235.0	39.9

る (Martin *et al.*, 2017). PhoRP系はリン酸飢餓に応答し、無機リン酸の細胞内での利用や取り込みなどに関与する因子を制御することがこれまでに言われてきている (Martin *et al.*, 2017). しかしながら、*B. subtilis* との共培養では PhoRP 制御下にある遺伝子の有意な活性化は確認できず、*T. pulmonis* との複合培養により *S. coelicolor* のリン酸飢餓応答制御系の攪乱が起こる原因は不明であることから、今後の更なる解析が必要である。一方、本実験では 2 時間の時点で TCS (PhoRP) 制御下の有意な遺伝子発現が十分に確認できたことから、転写制御応答の下流における発現変動が既に観察できていることが確認できた。

それ以外に機能未知蛋白質 (SCO4877, 6.3 倍) の転写活性化も観察され (Table 1), これは機能未知糖転移酵素 (SCO4878) とオペロンを組む蛋白質であった。推定機能ドメインとして LIC13510 family 中の surface carbohydrate biosynthesis protein が検出され、細胞膜中の糖鎖生合成に関与することが示唆された。逆向きにオペロンを形成する SCO4879-4881 はタイクロン酸生合成に関与することが示されている (Ostash *et al.*, 2014)。これらの遺伝子も PHO レギュロンであることが示されている (Martin *et al.*, 2017)。リン酸飢餓では一般的に細胞膜中の糖鎖を構成するリン酸を多く含むタイコ酸から、タイクロン酸に変換されることが知られているが、応答機構との関連は不明である。

また他に、機能未知トランスポーター蛋白質 (SCO7536, 6.3 倍) の転写活性化も観察された (Table 1)。機能ドメインとして RND superfamily に分類される排出系トランスポーターが推定されたが、これらの遺伝子産物に機能についてこれまでに実験的に調べられた例はなく、これも活性化された原因は不明である。

特に大きく転写抑制された変動遺伝子の推定機能

転写量が 1/5 以下に減少した遺伝子は 8 個存在した (Table 1)。その内 3 個は MarR タイプの転写制御因子 (SCO4032, 1/23.9 倍) とオペロンを構成する MSF タイプのトランスポーター (SCO4031, 1/10.1 倍)、機能未知蛋白質 (SCO4030, 1/6.7 倍) であった (Table 1)。これらの遺伝子産物に機能についてこれまでに調べられた例はなく、発現抑制を受けた原因は不明である。興味深いことに、その他に MSF タイプトランスポーター二種類 (SCO5957, 1/10.7 倍、及び SCO2310, 1/10.1 倍) の転写が抑制されていた (Table 1)。MSF (メジャーファミリー) トランスポーターは、一般的にプロトン勾配を駆動力として物質の運搬を担う輸送体である (Quistgaard *et al.*, 2016)。しかしながら、転写が抑制された MSF タイプトランスポーターの特異的機能は明らかになっておらず、現時点ではどのような物質の排出または輸送機構に影響を及ぼすかなど多くは不明である。その他に、全くの機能未知蛋白質 (SCO5484, 1/19.6 倍、及び SCO5485, 1/7.2 倍) や、一次代謝酵素コハク酸デヒドロゲナーゼ (SCO0923, 1/5.3 倍) などが転写抑制されていた (Table 1)。

結果のまとめと今後の展望

RNA-seq を利用した複合培養時の *S. coelicolor* の網羅的転写解析から、2 時間の時点で一次代謝酵素遺伝子を含めて、大きく活性化、または抑制の制御を受けていることが示された。この事実から 2 時間の時点で既に *T. pulmonis* による未知シグナルに対する応答反応を適合反応に変換し始めており、その結果を観察していることが考えられた。一方で、このことから、*T. pulmonis* に対

する応答機構では、シグナルはより速やかな反応を介して伝達されることも示唆された。例えば二成分制御系は蛋白質のリン酸化を介し、速やかに制御下の遺伝子（レギュロン）の遺伝子発現に正または負の影響をもたらすと考えられる。事実、PhoR-PhoPのレギュロンである *pst* 遺伝子オペロンの活性化が2時間ですでに観察された。一方で、この事実から、RNA-seqを利用した複合培養時の網羅的転写解析から *S. coelicolor* による適合反応機構を経時的に解析することは可能であるが、未知シグナルに対する応答反応機構を解析することは困難であることが強く示唆された。そこで後述する順（古典）遺伝学的手法を用いた解析と組み合わせることで、放線菌の応答反応機構に関わる制御系の解明を目指すこととした。

要 約

本研究では特に *S. coelicolor* の転写変動遺伝子の機能から応答に関与する分子機構（シグナルカスケード）を推定し、*T. pulmonis* に対する特異的な転写応答機構（接触依存的な応答機構）を明らかにすることを目指した。*Streptomyces coelicolor* JCM 4020 を応答モデル放線菌として用い、RNA-seq 解析により、*T. pulmonis* または *Bacillus subtilis* によって引き起こされる遺伝子発現変動を調べた。*S. coelicolor* 全遺伝子の20%が、7.5時間の時点で上方または下方にかかわらず、2倍以上の発現変動を示したことを見出した。枯草菌 *B. subtilis* との共培養における変動遺伝子の数を比較すると、*T. pulmonis* が *B. subtilis* よりも *S. coelicolor* の遺伝子発現にさらに強く影響を与えることが示された。2時間前の時点で、PhoR-PhoP 二成分制御系のレスポンスレギュレーターである PhoP の制御下にある遺伝子の活性化を見出した。これらは、リン酸飢餓条件下でリン酸トランスポーターを構成する *pstSCAB* や、恐らくタイクロン酸生合成に関与する SCO4877 を含んでいた。興味深いことに、枯草菌は PHO レギュロンに影響を与えなかった。RNA-seq 実験は、*S. coelicolor* が複合培養条件下での環境に適合する様子を明らかにした。しかしながら、*S. coelicolor* が *T. pulmonis* の接触に対してどのように応答するかを調べるためには別の実験的アプローチの必要性が明らかになった。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 佐々木槇子, 浅水俊平, 尾崎太郎, 宮本憲二, 尾仲宏康. 2016. RNA-seq によるミコール酸含有細菌に対する *Streptomyces coelicolor* A3(2) の応答解析. 2016 年度日本農芸化学会大会. 3月27-30日, 札幌.

- 2) 浅水俊平, 佐々木槇子, 尾崎太郎, 菅井佳宜, 宮本憲二, 尾仲宏康. 2016. 複合培養における *Streptomyces coelicolor* A3(2) の経時的トランスクリプトーム解析. 第31回日本放線菌学会大会. 9月8-9日, 東京.
- 3) 浅水俊平, 菅井佳宜, 尾仲宏康. 2017. ミコール酸含有細菌に対する放線菌の網羅的転写応答解析. 2017年度日本農芸化学会大会. 3月17-20日, 京都.
- 4) S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka. 2017. Transcriptomic responses of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in combined-culture environment with *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. May 23-27, Jeju, Korea.

原著論文

Asamizu S, Sasaki M, Ozaki T, Sugai Y, Miyamoto K, Onaka H. (Manuscript in preparation)

謝 辞

RNA シーケンス解析は慶応大学理工学部生命情報学科宮本憲二教授, 吉田昭介博士(現京都大学白眉センター特定准教授), 佐々木槇子氏(2013.4~2016.3 修士学生)との共同研究により行った。MiSeq を用いた次世代シーケンスや、CLC ゲノミクスワークベンチを用いた転写変動解析では、東京大学大学院農学生命科学科の大西康夫教授, 手塚武揚助教に多大なご指導をいただいた。この場をお借りし深く感謝いたします。

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金(平成24年10月~29年9月)により行われた。また本研究の一部は科研費基盤研究B(尾仲宏康25292046), 科研費若手研究B(浅水俊平26850044, 16K18673)による研究助成により行われた。

文 献

- Andres, N., Wolf, H. & Zahner, H. 1990. Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in inducing cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. *Z. Naturforsch. C* **45**: 850-855.
- Martin, J.F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* **186**: 5197-5201.
- Martin, J.F., Rodriguez-Garcia, A. & Liras, P. 2017. The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism, respiration, cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **70**: 534-541.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 1362-1384.
- Nutzmann, H.W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh,

- V., Horn, F., Gacek, A., Schumann, J., Hertweck, C., Strauss, J. & Brakhage, A.A. 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 14282-14287.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Ostash, B., Shashkov, A., Streshinskaya, G., Tul'skaya, E., Baryshnikova, L., Dmitrenok, A., Dacyuk, Y. & Fedorenko, V. 2014. Identification of *Streptomyces coelicolor* M145 genomic region involved in biosynthesis of teichulosonic acid-cell wall glycopolymer. *Folia Microbiol. (Praha)* **59**: 355-360.
- Quistgaard, E.M., Low, C., Guettou, F. & Nordlund, P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **17**: 123-132.
- Recio, E., Colinas, A., Rumbero, A., Aparicio, J.F. & Martin, J.F. 2004. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinic acid production in *Streptomyces natalensis*. *J. Biol. Chem.* **279**: 41586-41593.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A.W., Hopwood, D.A. & van Wezel, G.P. 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* **9**: 670-675.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nutzmann, H.W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuermann, J., Martin, K., Hertweck, C. & Brakhage, A.A. 2009. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 14558-14563.
- Straight, P.D. & Kolter, R. 2009. Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 99-118.
- Stubbendieck, R.M. & Straight, P.D. 2016. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* **198**: 2145-2155.

重イオンビーム変異導入法による *Tsukamurella pulmonis* への 赤色色素非生産応答性 *Streptomyces coelicolor* 突然変異株の解析

浅水 俊平, 菅井 佳宣, 尾崎 太郎, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Analysis of response deficient mutants of *Streptomyces coelicolor* generated by heavy ion beam induced mutagenesis to contact-dependent stimuli by *Tsukamurella pulmonis*

Shumpei Asamizu, Yoshinori Sugai, Taro Ozaki, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

Streptomyces species respond to MACB, for example *Tsukamurella pulmonis*, by production of secondary metabolism in a contact-dependent manner. Here we investigated the gene(s) responsible for the activation of secondary metabolism induced by *T. pulmonis*, to explore the molecular basis of the response mechanism of *Streptomyces* species. Using *Streptomyces coelicolor* JCM4020 as a model strain, we first employed heavy ion beam-induced mutagenesis to generate spore mutant library of *S. coelicolor*. Then we screened the RED production-deficient mutants of *S. coelicolor* by mixing them with *T. pulmonis* on agar plates using red/white phenotype of the colonies as indication. Through this process, we obtained 118 mutants from around 152,000 tested spores. We further tested the phenotype of the 118 mutants by growth on minimum medium and formation of aerial mycelia, and finally obtained 59 mutants which were deficient in RED production but were not deficient in growth and development. Until now, we have re-sequenced the genome of 16 mutants and identified 51 mutation points. We confirmed some of the mutated genes by gene complementation and found that glutamate synthase (*gltB*) and elongation factor G (*fusA*) were responsible for the RED deficient phenotypes in respective mutants. We are now investigating the involvement of the other 10 hypothetical proteins which may be responsible for the phenotype of 3 mutants found in this study. Also, further re-sequencing of the genome for the 35 remaining mutants will lead to the identification of the additional mutation points responsible for the response of *Streptomyces* species.

Key words: *Streptomyces*, mycolic acid-containing bacteria, heavy ion beam, mutagenesis

緒 言

Streptomyces 属に代表される放線菌は、土壌など様々

な環境に生息し、菌糸状に生育するグラム陽性細菌であり、医・農薬として使用される重要な生物活性を有する二次代謝産物の生産者として知られている。最近のゲノム解析から、*Streptomyces* 属放線菌には、一株につき20-40個もの「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが示唆され (Nett *et al.*, 2009)、休眠遺伝子の革新的な覚醒方法が求められている。放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株とミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株の異属細菌間の相互作用により *S. lividans* に眠る二次代謝産物の生産を強く活性化することを見いだしていた (Onaka *et al.*, 2011).

E-mail: 浅水俊平 (asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

菅井佳宣 (yoshinorisugai2158@gmail.com)

尾崎太郎 (ozaki@sci.hokudai.ac.jp)

尾仲宏康 (aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

共同研究者：佐藤勝也 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所)。

大野 豊 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所)

そして興味深いことに *S. lividans* の二次代謝生産活性化現象は、物質が関与する機構では説明ができず、物理的な刺激を介した相互作用に起因することが示唆されている。

本研究では、放線菌がミコール酸含有細菌の物理的な相互作用に対して、どのようにシグナルを受け取り、そしてどのような伝達経路を介し、最終的に二次代謝産物生合成の活性化を引き起こすかを明らかにするために、古典遺伝学的手法、つまり放線菌突然変異株ライブラリーから二次代謝非応答性変異株をスクリーニングし、その変異遺伝子をゲノムリシーケンスにより同定することを目指した。重イオンビームを用いた変異導入は、植物や微生物などの育種分野において利用される変異導入法である (Hu *et al.*, 2017)。導入される変異に関して、*Arabidopsis thaliana* (アブラナ科植物) などにおいてはゲノムレベルでの解析が行われ、DNA 領域の大規模な欠損などを引き起こすことなどが示されている (Hirano *et al.*, 2015)。しかしながら、例えば炭素イオン ($^{12}\text{C}^{5+}$) をイオン源とし、細菌に対して照射した場合、ゲノムレベルでどのような変異が導入されるかについて知見はまだない (Hu *et al.*, 2017)。重イオンの照射では、DNA 二本鎖切断が起こり、その修復過程で変異が誘発される。近年、放線菌においても DNA 二本鎖切断の際に、Ku 蛋白質 (*Streptomyces coelicolor* A3(2) 株では SCO5309) を介した DNA 末端同士を連結させる非相対末端結合 (NHEJ) 機構が存在することが示唆されているが (Hoff *et al.*, 2018)、放線菌変異株の効果的な取得法として重イオンビーム照射が有効であるかはわかっていない。本研究では、放線菌 *S. coelicolor* JCM 4020 株を対象に突然変異を誘発するために、重イオンビームを変異源として用いた突然変異株ライブラリーを作製し、ミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* TP-B0596 株への赤色色素生産による応答性が欠損した変異株を選抜し、次世代シーケンスにより変異遺伝子を同定したので以下に述べる。

実験方法

重イオンビーム照射放線菌胞子の調製と照射試料の回収

S. coelicolor JCM 4020 をスクリーニング対象放線菌株として使用した。−80℃ 保存したグリセロールストックから胞子数が約 1×10^8 となるように 1.5ml チューブに移し、20% グリセロールが入った 0.5×PBS 溶液を 900 μl 加えた。遠心分離 (3,000rpm, 3min, 4℃) 後、胞子ペレットに 0.1×PBS を 1ml 加え、懸濁した後、500 μl をシャーレ上の mixed cellulose ester メンブレン (0.2 μm) に吸着させ、風乾した。シャーレをカプトン膜で覆い、パラフィルムで密封した。国立研究開発法人

量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所にあるイオン照射研究施設 (TIARA) の AVF サイクロトロンイオン加速器を用いて、 $^{12}\text{C}^{5+}$ をイオン核として重イオンビームを照射した (エネルギー: 220MeV, LET: 121.5keV/ μm , フルエンス: 1.25×10^8 ion/cm²/sec, 線量率: 24.4Gy/sec)。

本研究に使用したサンプルは二度に分けて調製した。一度目の重イオンビームの照射は 2016 年 7 月 8 日に行い、*S. coelicolor* に対し線量: 100Gy, 500Gy, 1,000Gy の 3 照射条件をそれぞれ n=3 で行った。二度目は 2016 年 10 月 12 日に行い、線量: 10Gy, 50Gy, 100Gy, 200Gy の 4 照射条件をそれぞれ n=3 で行った。

重イオンビーム照射した胞子サンプルの回収は以下のように行った。20% グリセロール 500 μl をメンブレン上に滴下し、ピペットでメンブレン表面をこするようにして胞子を懸濁させ、胞子懸濁液を 1.5ml のマイクロチューブに移した。同じ操作を 4 回繰り返し、遠心分離 (3,000rpm, 5min, 4℃) により上清を除去し、1ml の胞子懸濁液とし、クライオチューブに移し、−80℃ で保存した。

生存率と気中菌糸形成率

重イオンビームを照射した各放線菌の変異株ライブラリーを適宜希釈して 100 μl ずつ TSB 寒天培地上に移し、コンラージ棒を用いて塗布した。30℃ で 3 日間培養し、生じたコロニーをカウントし、重イオンビーム照射後回収した胞子液 100 μl あたりの生存胞子数を算出した。同様の操作を行った重イオンビーム非照射 (0Gy) 株を基準として、生存率をコロニーフォーミングユニット (CFU) として算出した。

重イオンビームを照射した *S. coelicolor* 胞子サンプルを胞子数約 100 個 /100 μl となるように希釈し、きなこ寒天培地上に 100 μl 移し、コンラージ棒を用いて塗布した。30℃ で約 7 日間培養することでコロニーの形成と気中菌糸の形成を確認し、全コロニー数と気中菌糸を形成しているコロニー数をそれぞれカウントし、気中菌糸形成率を算出した。

非応答性変異株の一次スクリーニング

一次スクリーニングでは 2 種類の方法で行った。一つ目の方法では、A3M-P 寒天培地上に *T. pulmonis* グリセロールストックを滅菌水で希釈し、100 μl を滴下し、同じプレートに重イオンビーム照射をした *S. coelicolor* 胞子ストックを胞子数が約 100 個となるよう塗布した。30℃ で 4~7 日間培養し、ローン状に生育した *T. pulmonis* の中で赤色色素生産が確認できない *S. coelicolor* コロニーを釣菌した。釣菌した *S. coelicolor* 菌体は *T. pulmonis* と

混ざっていることから、混合菌体を mixed cellulose ester メンブレン (0.45 μ m) を用いて放線菌を分離した。30 $^{\circ}$ C で3~7日間培養した後にメンブレンを除去し、更に2~7日間30 $^{\circ}$ C で培養を継続した。メンブレンを通過し、形成した *S. coelicolor* コロニーを、新しい A3M-P 培地に植え継ぎ、30 $^{\circ}$ C で3~5日間培養した後、培地に20%グリセロールを1.5ml 加えて白金耳で菌体をかき取り、クライオチューブに移して-80 $^{\circ}$ C で保存した。

二つ目の方法では、重イオンビーム照射をした *S. coelicolor* 孢子ストックを孢子数が約60個となるように A3M-P 培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C で3日培養した。また別の A3M-P 培地に *T. pulmonis* グリセロールストックを100 μ l 塗布し、培養した。綿ピロード布を被せた円筒を *T. pulmonis* がローン状に生育したプレートに押しつけた後、*S. coelicolor* のコロニーが形成しているプレートにスタンプ植菌した。30 $^{\circ}$ C で3~5日間培養した後、ローン状に生育した *T. pulmonis* の中で赤色色素生産が確認できない *S. coelicolor* コロニーを釣菌した。その後は上記と同様に、変異株をメンブレンにより分離し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

A3M-P 寒天培地での対峙培養による非応答性再試験、最少寒天培地での生育能、気中菌糸形成能、及び浸透圧ショックによる RED 生産性確認

A3M-P 培地を用いた対峙培養により、一次スクリーニングにより得られた変異株形質の確認を行った。プレート培地中央に *T. pulmonis* グリセロールストック 2 μ l を点植菌し、約1cm 離れた点とその上下に1cm 離れた点に変異株ストック 2 μ l を点植菌した。親株の形質をポジティブコントロールとして用い、30 $^{\circ}$ C で培養を継続し、菌体間接触による変異株の RED 生産性の有無を確認した。非応答性再試験において RED の生産が確認されなかった変異株を最少培地に植菌し、最少培地における生育能を確認した。変異株グリセロールストック 2 μ l を最少培地に点植菌し、30 $^{\circ}$ C で培養した。最少培地での生育が確認できた変異株について、Bennett's maltose 培地及びきなき寒天培地を用いて気中菌糸形成能を確認した。変異株グリセロールストックを寒天培地上に点植菌し、30 $^{\circ}$ C で培養した。コロニーの色が白くなる形質を基準として、気中菌糸形成能を確認した。気中菌糸の形成が確認できた変異株について、Bennett's maltose に1% NaCl を加えた寒天培地に変異株グリセロールストックを点植菌し、30 $^{\circ}$ C で培養した。親株の形質 (RED 生産によりコロニーが赤くなる) を基準として、高浸透圧下における変異株の RED 生産能を確認した。

PacBio による *Streptomyces coelicolor* JCM 4020 株ゲノム配列の決定

S. coelicolor JCM 4020 株のゲノム配列を PacBio RS II 一分子シーケンス (BGI 受託シーケンス) を行い、平均20kb 断片の PacBio シーケンスを取得した (それぞれ約0.3 及び0.9Gb)。得られたデータを Canu/Celera Genome Assembler を用いてアセンブリ解析に供した結果、一本のコンティグを得ることに成功した。得られたゲノム DNA 塩基配列を RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) を用いて推定遺伝子機能の自動アノテーションを行った。

S. coelicolor JCM 4020 株はゲノムサイズ 8,620,775 bp, GC 含量 72.2mol%, coding sequence (CDS) 数 7,786 個であった。同定された *S. coelicolor* JCM 4020 株遺伝子配列 (及び翻訳産物のアミノ酸配列) は、すでに完全ゲノムが報告されている *S. coelicolor* A3(2)M145 株とほぼ一致していた (ゲノムサイズ 8,667,507 bp, GC 含量 72.1mol%, coding sequence (CDS) 数 7,877 個)。そこで本論文では、便宜的に *S. coelicolor* A3(2)M145 株に用いられている遺伝子番号 (SCO ナンバー) を遺伝子名として表記した。

次世代シーケンスサンプルの調製

ゲノム DNA の調製は定法に従い行った。NEBNext[®] dsDNA Fragmentase[®] を用いて精製したゲノム DNA を約300bp 程度に断片化した。Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて DNA 断片を精製し、High Sensitivity DNA キットを用いた Agilent Bioanalyzer 2100 にて断片化した DNA サイズが適当であるかを確認した。適切に断片化した DNA について、NEBNext[®] Ultra[™] II DNA Library Prep Kit for Illumina[®] を用いて DNA ライブラリーを作製した。NEBNext[®] Multiplex Oligos for Illumina[®] (Index Primers Set 1 and 2, NEB #E7335, #E7500) をインデックスプライマーとして用いた。最後にライブラリーの純度を High Sensitivity DNA キットを用いて Agilent Bioanalyzer 2100 にて確認した。

MiSeq による DNA シーケンスとシーケンスリード解析

構築した DNA ライブラリーを MiSeq (イルミナ) を用いてシーケンスを行った。MiSeq Reagent Kit v3 (ペアエンド, 75 \times 2 サイクル) を用いた。得られた FASTQ データについて、CLC ゲノミクスワークベンチ解析ソフト (キアゲン) を用いて、リードのマッピング、多型 (SNP と InDel) の検出、変異遺伝子の抽出を行った。

結果及び考察

重イオンビーム照射による放線菌胞子の照射量依存的な生存率と気中菌糸形成率

変異株スクリーニング用の重イオンビーム照射サンプルは二回に分けて調製した。

一回目は *S. coelicolor* JCM 4020 に対して $^{12}\text{C}^{5+}$ イオンを 100 Gy, 500 Gy, 1,000 Gy の線量で照射した。その照射サンプルでの生存率は非照射サンプルを 100% として, 100 Gy: $68.8 \pm 25.1\%$, 500 Gy: $7.4 \pm 0.68\%$, 1,000 Gy: $0.52 \pm 0.10\%$ であった。また気中菌糸形成率は, 0 Gy: $99.9 \pm 0.065\%$, 100 Gy: $93.6 \pm 1.2\%$, 500 Gy: $63.3 \pm 4.0\%$, 1,000 Gy: $40.4 \pm 16.2\%$ であった。

二回目は 10 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy の線量で照射した。その照射サンプルでの生存率は, 10 Gy: $55.0 \pm 3.5\%$, 50 Gy: $36.1 \pm 8.6\%$, 100 Gy: $36 \pm 5.5\%$, 200 Gy: $13.0 \pm 4.1\%$ であった。また気中菌糸形成率は, 0 Gy: $99.9 \pm 0.065\%$, 10 Gy: $99.3 \pm 0.35\%$, 50 Gy: $99.3 \pm 0.43\%$, 100 Gy では $98.4 \pm 1.1\%$, 200 Gy では $90.6 \pm 2.3\%$ であった。照射量に依存した生存率及び気中菌糸形成能の低下が確認できた。照射時期によって照射率に対して生存率にばらつきが生じた原因は, 加速された重イオンビームは透過性が低いため一端生体分子に衝突するとそこで止まることから, 胞子が重なった内側の試料には効果的に照射できなかったことが原因であると考えられた。

非応答性変異株のスクリーニング

一回目と二回目の照射実験において照射線量 100 Gy 及び 200 Gy の重イオンビーム照射した胞子ライブラリーを用いて以後の実験を行った。約 15,200 個の胞子から, 118 株 (0.078%) の非応答性変異株を取得した (Fig. 1)。変異株取得率の低さ (0.078%) の要因としては, 一般的に UV 変異などで用いる生存率 (1–0.1%) と比較し, 生存率が 13–69% 程度のサンプルを用いたことが原因であると考えられる。ゲノムに誘発された突然変異の数が多数に及んだ場合, 原因となる変異点を同定することが困難になるため, 変異点の数を極力少なくするために高い生存率のサンプルを用いた。いずれにせよ, 得られた 118 株のうち最少培地における生育能や, 気中菌糸形成能が維持されている非応答性変異株が 59 株存在した (Fig. 1)。最少培地において生育できない変異株は主要な一次代謝系が欠損していることが考えられた。増殖能の低下に起因する二次代謝応答性の低下を原因とした変異を排除するために, 最少培地で生育できなかった変異株は除くこととした。また放線菌の形態分化 (気中菌糸形成) に関与する遺伝子はよく研究されて

いるが (McCormick & Flardh, 2012), この場合も生育に影響する因子を原因とした二次代謝応答性の低下を排除するため, 気中菌糸形成能を失った変異株は除くこととした。また 59 変異株の内, 5 株において高浸透圧下における RED 生産が野生株同様に観察された (Fig. 1)。この 5 株については RED 生合成遺伝子に変異があることで生産応答性が欠損していないことが確認された。

重イオンビームにより導入された多型の数と種類

これまでに 59 変異株の中から 16 変異株について染色体 DNA を調製し, 次世代シーケンサ (MiSeq) によりシーケンスリードを取得した。得られた変異株のゲノム DNA 配列と親株ゲノム DNA 配列とを比較解析し, 16 変異株から 58 カ所の多型を同定した (Table 1)。このうち 6 変異株 (202001, 202004, 202007, 205011, 208014, 209008) では, ゲノム領域上の位置 4,038,304 に C の A への置換, 4,066,523 に G の挿入が見いだされた (Table 1)。また 2 変異株 (209010, 203013) では, ゲノム領域上の位置 4,067,411 に C の挿入が見いだされた (Table 1)。このことからこの 14 カ所変異は重イオンビームによって導入されたものではなく, 胞子ストック調製中に生じた自然変異に由来することが考えられた。そのことから 44 カ所が重イオンビームによって導入された多型であることが示唆された。100 Gy の照射では 1 変異株当たり平均 2.0 個 (7 変異株から 14 カ所), 200 Gy の照射では, 1 変異株当たり平均 3.3 個 (9 変異株から 30 カ所) の多型

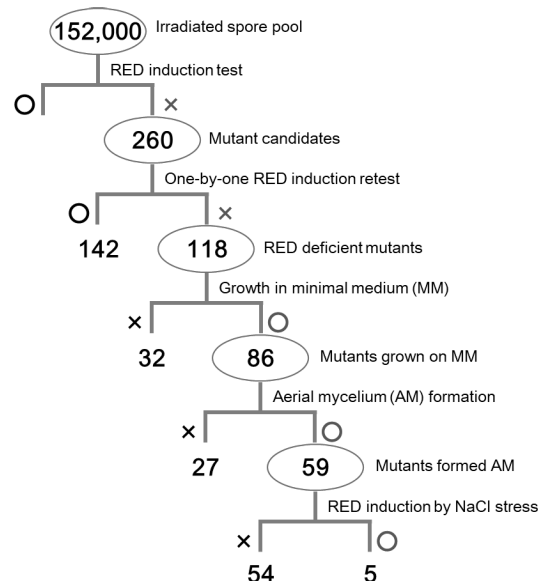


Fig. 1 Screening process to obtain RED deficient mutants.

Table 1 List of RED deficient mutants and their mutation points.

Mutant ID	Genomic region	Nucleotide mutation	Position of nucleotide mutation	Position of amino acid mutation	Category of mutation	Putative function of deduced protein	SCO homolog
10 80 13	3,774,195	A>G	667T>C	Ser223Pro	M	integrase	SCO4340
	6,324,910	delC	597delC	Pro200>FS	F	glutamate synthase large subunit (GltB)	SCO2026
	8,042,593	C>A	974G>T	Gly325Val	M	hypothetical protein	SCO0562
20 30 10	2,354,304	G>T	930C>A		S	riboflavin kinase / FMN adenylyltransferase	SCO5711
	3,461,531	delG	147delC	Thr50>FS	F	elongation factor G (FasA)	SCO4661
10 70 04	3,423,828	delTCG	486_488delCGA	del_Asp162	D	50S ribosomal protein L4 (Rpl4)	SCO4703
20 90 20	3,065,637	insAGCTT	insAGCTT		S	UTR	
	3,245,873	delC	1038delC	Arg347>FS	F	hypothetical protein	SCO4877
	3,524,381	G>T	195G>T		S	hypothetical protein	SCO4587
20 40 03	261,185	G>A	843C>T		S	oxidoreductase	SCO7572
	1,696,094	delGCG	379_381delCGC	del_Arg127	D	hypothetical protein	SCO6192
	5,772,988	C>A	555G>T	Gln185His	M	chitinase precursor	SCO2503
	5,803,027	G>T	G>T		S	UTR	
	6,391,162	G>A	783C>T		S	hydrolase	SCO1968
	8,325,548	A>G	1303T>C	Phe435Leu	M	membrane protein (putative)	SCO0308
	8,357,988	delCG	91_92delCG	Arg31>FS	F	hypothetical protein	SCO0281
	782,169	C>A	C>A		S	UTR	
20 40 30	2,687,177	G>C	19G>C	Glu7Gln	M	large Ala/Glu-rich protein	SCO5397
	3,050,385	C>T	2324G>A	Trp775*	N	bifunctional protein	SCO5064
	3,939,522	C>G	160G>C	Ala54Pro	M	hypothetical protein	SCO4177
	6,744,389	insCC	103_104insCC	Tyr36>FS	F	hypothetical protein	SCO1647
	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
20 20 01*	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,500,315	G>A	1054G>A	Glu352Lys	M	methylmalonic acid semialdehyde	SCO2726
	5,904,524	A>G	104T>C	Phe35Ser	M	MarR family transcriptional regulator	SCO2398
20 20 04*	3,483,143	G>T	G>T		S	UTR	
	3,904,019	C>A	352G>T	Glu118*	N	GntR family transcriptional regulator	SCO4215
	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
20 20 07*	2,618,154	A>G	22T>C	Ser8Pro	M	two-component system response regulator	SCO5455
	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,587,768	C>G	C>G		S	UTR	
	6,839,437	G>A	G>A		S	UTR	
7,027,972	CC>TT	1344_1345CC>TT	Leu449Phe	M	acetoacetate-CoA ligase	SCO1393	
20 50 11*	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,185,691	C>T	795C>T		S	preprotein translocase subunit SecA	SCO3005
	6,137,617	C>T	712G>A	Ala238Thr	M	lipoyl synthase	SCO2194
20 80 14*	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,649,646	G>A	G>A		S	UTR	
5,922,596	A>G	A>G		S	UTR		
20 90 08*	3,859,782	G>A	1209C>T		S	hydrolytic protein	SCO4257
	4,038,304	C>A ^(a)	C>A		S	UTR	
	4,066,523	insG ^(b)	1316_1317insG	Val440>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,827,860	C>T	C>T		S	UTR	
6,132,904	delG	93delG	Val32>	F	integrase (putative)	SCO3997	
20 30 13**	398,794	delG	81delG	Glu27>FS	F	cytochrome P450 (fragment)	SCO7444
	880,875	C>T	411G>A		S	ABC transporter ATP-binding protein	SCO7008
	4,067,411	insC ^(c)	428_429insC	Ala144>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	5,386,763	C>T	427C>T	Leu142Phe	M	hypothetical protein	SCO2827
	8,027,722	insCC	1747_1748insCC	Arg584>FS	F	dihydroxyacetone kinase	SCO0580
20 90 10**	4,067,411	insC ^(c)	428_429insC	Ala144>FS	F	membrane protein (SarA)	SCO4069
	4,746,280	C>A	C>A		S	UTR	
10 60 03	2,136,519	insGAT	876_877insATC	292_Pro293ins	I	RedP	SCO5888
20 10 01	2,119,930	G>C	2639C>G	Pro880Arg	M	RedH	SCO5896
	4,557,788	insGG	130_131insGG	Leu44>FS	F	hypothetical protein	SCO3619

(* and **) indicate the respective mutants that contain mutation in *sarA* gene. (a), (b), and (c) indicate the identical mutation points found in the respective mutants. Abbreviations used in this table: ins: insertion, del: deletion, FS: frameshift, M: missense mutation, F: frameshift mutation, N: nonsense mutation, S: silent mutation, D: deletion mutation, I: insertion mutation. The column SCO gene homolog indicate homologous gene for *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain M145.

が存在し、照射量に依存し多型の数が増加する傾向が確認された。多型の種類は、塩基置換が最も多く30カ所、挿入変異が6カ所、欠損変異は8カ所であった (Table 1)。予想に反して、誘発された変異の種類は、塩基置換が多数を占めた (68.2%)。放線菌における NHEJ の効率が低いために、主に起こるとされる2本鎖切断を受けたゲノム DNA 鎖がうまく修復されず、致死となってしまった可能性も考えられた (Su *et al.*, 2016)。一方物理的な DNA 鎖の切断による変異導入であることから、予想通り、変異カ所の分布はゲノム全体に及び、特異なホットスポットを生じていないことが明らかになった (Table 1)。一般的に用いられる変異導入法、例えば汎用される物理的な UV 照射ではシトシン塩基のデアミノ化により誘発される複製エラーを引き起こし、または化学的なニトロソグアニジン (NTG) などではグアニンのメチル化により誘発される複製エラーを引き起こし、主に GC が AT に置換される変異を誘発するため、塩基配列に依存する傾向などがある (Lucchesi *et al.*, 1986; Miller, 1985)。またトランスポゾン変異導入法では、トランスポゾンの挿入頻度や挿入箇所の偏りなどの問題点がある (Xu *et al.*, 2017)。放線菌胞子に対する重イオンビーム照射による多型は、多様かつ広くゲノム中に存在したことから、従来の方法と比較し、重イオンビーム照射による変異導入法は極めて有効であることを示した (Fig. 2)。

変異遺伝子の同定

同定された多型をもとに蛋白質をコードすると推定される配列 (CDS) に起こる変異点を同定した。16 変異株の *sarA* 変異を除くと CDS にはイオンビームにより導入された 44 カ所の変異点 (内サイレント変異が 17 カ所) が存在した。ミスセンス変異 (13 カ所)、ナンセンス変異 (2 カ所)、フレームシフト変異 (9 カ所)、アミノ酸挿入変異 (1 カ所)、アミノ酸欠損変異 (2 カ所) などが存在した (Table 1)。上述の *sarA* 遺伝子ホモログの 8 カ所は一塩基挿入によるフレームシフト変異であった (Table 1)。 *S. coelicolor* A3(2) において *sarA* 遺伝子 (SCO4069, 膜蛋白質とアノテーションされる機能未知蛋白質) を欠損させると、純粋培養において RED 及び ACT の生産が起こらなくなることがすでに報告されている (Ou *et al.*, 2008)。このことから、16 株中 8 株は

sarA 遺伝子の不活化によって、 *T. pulmonis* への二次代謝応答機能が欠損したことが示唆された。しかし、SarA 蛋白質が RED 及び ACT 生産に対してどのような機能を果たしているかは全く解析されていない。そもそも *sarA* 遺伝子の欠損によって RED 及び ACT の生産が消失することから、本遺伝子がミコール酸含有細菌に対する応答機構に関与する因子であるかは不明であるが、*sarA* 遺伝子の欠損によって *T. pulmonis* による生産誘導に対しても RED 生産応答ができなくなることから、接触応答機構は SarA が介在する制御系と綿密に関連することが示唆された。

残りの 27 カ所の内、RED 生合成遺伝子群に属する *red* 遺伝子 (*redH* と *redP*) (Williamson *et al.*, 2006) に変異点が存在する変異株が 2 株 (106003, 201001) 存在し、生合成酵素の欠損による RED 生産欠損株であることが明らかになった (Table 1)。 *sarA* 遺伝子及び *red* 遺伝子に変異のない変異株は 6 株になり、その中の 14 個の変異遺伝子がミコール酸含有細菌に対する放線菌二次代謝応答に関与する可能性が考えられた。

遺伝子相補による形質の回復

変異点解析を行った 16 変異株の内、3 株は良好に気中菌糸を形成し (Fig. 3A, middle)、Bennet's maltose に 1% NaCl を添加した培地において親株同様に RED を生産した (Fig. 3A, bottom)。変異株 108013 はグルタミン酸合成酵素 (GltB, SCO2026 ホモログ)、変異株 203010 はリボソーム伸長因子 G (EF-G) (FasA, SCO4661 ホモログ)、変異株 107004 はリボソーム蛋白質 (Rpl4, SCO4703 ホモログ) などに変異点が存在した。これらのうち、変異株 108013 と、変異株 203010 について遺伝子相補実験を行った。変異株 108013 では、*gltB* 遺伝子の 597 番目の C が欠損し、GltB 酵素のフレームシフト変異を誘発していた (Table 1)。グルタミン酸合成酵素遺伝子 (*gltB*) の周辺領域を含めてクローニングしたプラスミド (pTYM19-*gltB*) を作製し、変異株 108013 ゲノムに導入、*gltB* 遺伝子の相補実験を行った。得られた *gltB* 相補株 (108013_pTYM19-*gltB*) は、ベクターのみのコントロール株 (108013_pTYM19) と比較し、 *T. pulmonis* に対する RED 生産応答機構が回復していることが確認された (Fig. 3B, bottom)。変異株 203010 では、

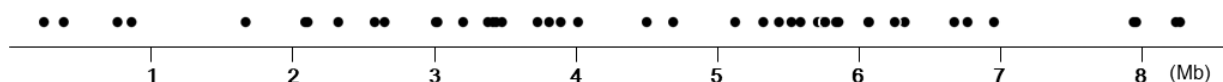


Fig. 2 Distribution of mutation points in the genome induced by heavy ion beam mutagenesis in *Streptomyces coelicolor* JCM 4020. Black circle indicate the nucleotide mutation points.

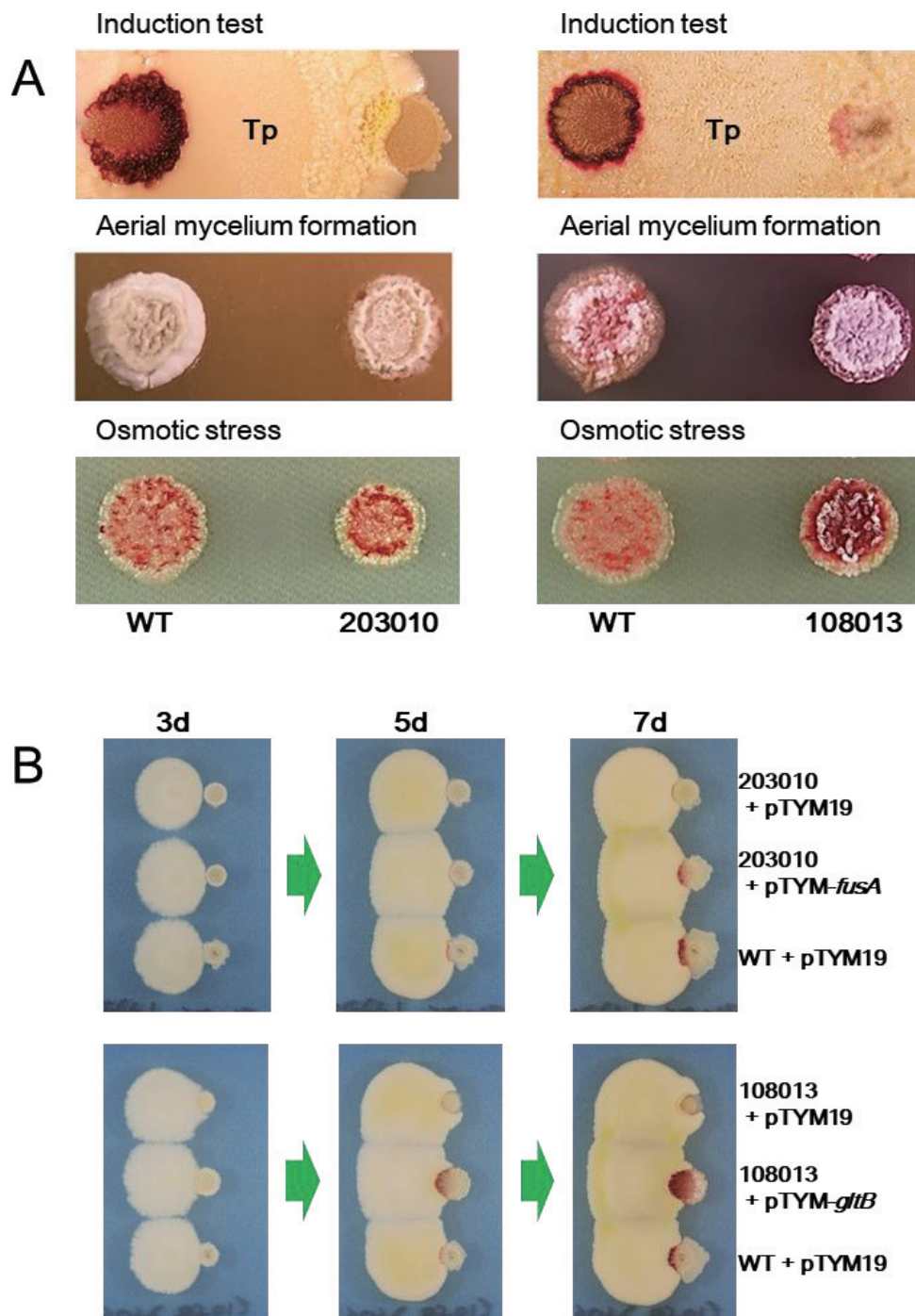


Fig. 3 Phenotypes of the RED deficient mutants; 203010 and 108013.

(A) Phenotype of two mutants 203010 and 108013 obtained from the screening. Both mutants showed RED production deficient phenotype against *T. pulmonis* interaction (upper image). They showed aerial mycelium formation (middle image) and produced RED under osmotic stress (bottom image). (B) Gene complementation experiment of the mutants 203010 and 108013. The wild-type phenotype, production of RED, was restored by *fusA* or *gltB* genes in the respective mutants.

fasA 遺伝子の 147 番目の C が欠損し, *fasA* 蛋白質のフレームシフト変異を誘発していた (Table 1). リボソーム伸長因子 G 遺伝子 (*fasA*) の周辺領域を含めてクローニングしたプラスミド (pTYM19-*fasA*) を作製し, 変異株 203010 ゲノムに導入, *fasA* 遺伝子の相補実験を行った. 得られた *fasA* 相補株 (203010_pTYM19-*fasA*) は, ベクターのみのコントロール株 (203010_pTYM19) と比較し, *T. pulmonis* に対する RED 生産応答機構が回復していることが確認された (Fig. 3B, upper).

GltB は広く生物種に保存されるグルタミン酸合成酵素であり, グルタミンと 2-オキシグルタル酸からグルタミン二分子を合成する. グルタミンはプロリンやセリンの前駆体となり, RED 生合成における直接的な前駆体基質となる. このことから変異株 108013 の形質は, RED 生合成による基質供給が滞ったために, 生産できなくなり生じたと考えられた. また EF-G は広く生物種に保存されるリボソーム翻訳における重要な伸長因子である. *S. coelicolor* はオルソログである *fasB* 遺伝子を有することから, その機能補完により, 生存が可能であったことが考えられた. また変異株 203010 の形質は, 本来の EF-G の欠損により細胞内の翻訳過程が滞ったために, RED 生産応答に至らない形質を生じたと考えられた. 以上の変異株 108013 や変異株 203010 に見い出された遺伝学的形質は, *T. pulmonis* に対する応答制御因子が関与する機構が欠損することにより生じた形質ではなく, 翻訳機能や基質供給の低下によって現れた非特異的な形質であることが考えられた.

網羅的転写解析において活性化された遺伝子と共通した変異遺伝子, SCO4877

変異株 209020 において, 機能未知蛋白質 (SCO4877) をコードする遺伝子の 1038 番目の C が欠損し, SCO4877 蛋白質のフレームシフト変異を誘発していた (Table 1). この遺伝子は RNA-seq 解析により, *T. pulmonis* との複合培養によって 2 時間で 6.3 倍, 4 時間で 7.9 倍, 7.5 時間で 166.4 倍の転写活性化が観察された. これは機能未知糖転移酵素 (SCO4878) とオペロンを組む蛋白質であった. 推定機能ドメインとして LIC13510 family 中の surface carbohydrate biosynthesis protein が検出され, 細胞膜中の糖鎖生合成に関与することが示唆された. 逆向きにオペロンを形成する SCO4879-4881 はタイクロン酸生合成に関与することが示されている (Ostash *et al.*, 2014). これらの遺伝子も PHO レギュロンであることが示されている (Martin *et al.*, 2017). 複合培養により活性化された遺伝子の欠損により *S. coelicolor* の二次代謝応答がなくなったことから, *S. coelicolor* による RED 生産につながる応答機構または適合機構に対して何らかの関

連性のある蛋白質であることが示唆された. 今後の遺伝子機能の詳細な解析により, 二次代謝生産がなくなった原因を明らかにしていきたい.

二次代謝応答機構に関与し得るその他の機能未知蛋白質

得られた 16 株変異株のうち, RED 生合成遺伝子に変異が存在した 2 株, *sarA* 遺伝子に変異が存在した 8 株, 上述した *gltB* 変異株, *fasA* 変異株, *sco4877* 変異株を除くと, 残りは 3 株であった. 変異株 107004 にはリボソーム 50S を構成する *rpl4* 遺伝子の変異が存在したことから, *fasA* 同様に細胞内の翻訳過程が滞ったために, RED 生産応答に至らない形質を生じたと考えられた. また変異株 204003 には 4 つの変異蛋白質が存在した (Table 1). SCO6192 は Winged helix DNA-binding domain を有する蛋白質であり, DNA 結合ドメインを有することから転写制御などに関与する可能性がある. SCO0281 と SCO0308 は既知ドメインとの相同性がない機能未知蛋白質であった. SCO2503 は Glycosyl hydrolase family 18 のキチナーゼドメインを有する蛋白質であり, おそらく無関係な変異であると考えられた.

また変異株 204030 にも 4 つの変異蛋白質が存在した (Table 1). SCO1647 は proteasome accessory factor PafA2 ドメインを有し, 蛋白質の分解に関与すると考えられた. SCO4177 は既知ドメインとの相同性がない機能未知蛋白質であった. SCO5064 は SNF2 family DNA or RNA helicase ドメインを有するヘリカーゼ様の蛋白質であった. SCO5397 は N terminus of SMC (structural maintenance of chromosomes) superfamily proteins ドメインを有し, DNA 複製などに関与する蛋白質であることが考えられた.

まとめ及び今後の展望

本研究は, 放線菌胞子に対して重イオン ($^{12}\text{C}^{5+}$) を変異原として使用し, その影響をゲノムレベルで解析した初めての例であった. 本研究において明らかにした重イオンにより導入された多型は, 多様でゲノム全体に分布していた. このことから, 今後の重イオンを変異源とした細菌の順遺伝学的研究, または放線菌育種において, 非常に有効であることが考えられた. また二次代謝非応答性変異株を取得するために今回構築したスクリーニング法では, 確かに非応答性の多様な変異株を複数取得することに成功した. しかしながら, 本スクリーニングにおいて得られた変異株中に同定された変異遺伝子には, 予想したシグナル伝達に関与するようなレギュレーター系の蛋白質が見いだされなかったため, 現在のところ, 目的とした応答機構に関わる制御因子の同定には至って

ない。そこで引き続き得られている変異株の遺伝的形質を詳細に解析する。またスクリーニングの過程において気中菌糸を形成しない変異株を除いてしまったが、放線菌の形態分化と二次代謝の制御系は深くクロスリンクしていることが知られており、今後は気中菌糸形成能を欠損した変異株についても解析を広げる必要があると考えられた。また、変異株 209020 に存在した SCO4877 は、網羅的転写解析において活性化されたことから、接触応答機構に深い関連性が示唆された。本遺伝子の今後の詳細な解析により、異属細菌間相互作用に起因する新しい二次代謝生産制御機構の発見につながる可能性がある。

本研究は、これまでに全くわかっていない接触に依存した異属細菌間相互作用における遺伝子を解明できることが期待でき、これは新しい微生物の関わり合いの仕組みの解明につながる。また、異属細菌間相互作用に起因した放線菌二次代謝産物生産の活性化機構の解明により、放線菌に広く存在する休眠二次代謝の新たな活性化法に関する分子基盤を確立することを目指したい。

要 約

本研究では *Streptomyces* 属細菌の *T. pulmonis* に対する接触に依存した応答機構の分子基盤を明らかにするために、*T. pulmonis* の接触により誘導される二次代謝の活性化に関与する遺伝子を調査した。*S. coelicolor* JCM 4020 をモデル株として使用し、重イオンビーム突然変異誘発法を用いて *S. coelicolor* の孢子変異体ライブラリーを作製した。次に、寒天培地上で *T. pulmonis* と *S. coelicolor* を混合培養し、*S. coelicolor* コロニーの赤/白表現型を指標としてウンデシルプロディジオシン (RED) 生産欠損突然変異体をスクリーニングした。このスクリーニングにより、試験した約 152,000 個の孢子から 118 株の突然変異体を得た。118 個の突然変異体の表現型について、最少培地上での増殖能、および気菌糸形成能を試験し、その結果 RED 生産能が失われているが、生育や形態分化能が維持されている 59 株の突然変異体を得た。現在まで、16 株の突然変異体のゲノムをリシーケンスし、58 個の変異点を同定した。遺伝子相補実験によって変異遺伝子の一部を確認し、グルタミン酸合成酵素 (*gltB*) または、翻訳伸長因子 G (*fusA*) が RED 生産の欠損表現型の原因であることを見出した。今後、16 株のリシーケンスから見出された 3 株の突然変異体の表現型に関与し得る他の 9 個の機能未知蛋白質の関与を調べ、また、残りの 35 株の突然変異体についてのゲノムリシーケンスを行い、*Streptomyces* 種放線菌によるミコール酸含有細菌への接触依存的な応答の原因となる変異点の同定を行いたい。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 柳澤昌臣, 浅水俊平, 菅井佳宣, 佐藤勝也, 尾仲宏康. 2016. 重イオンビーム遺伝子変異導入法を用いた複合培養による放線菌の二次代謝活性化に関与する遺伝子の探索. 第31回日本放線菌学会大会. 9月8-9日, 東京. (ポスター賞)
- 2) 柳澤昌臣, 浅水俊平, 菅井佳宣, 佐藤勝也, 尾仲宏康. 2017. 複合培養における放線菌の二次代謝活性化に関与する遺伝子のイオンビームを用いた順遺伝学的解析. 2017年度日本農芸化学会大会. 3月17-20日, 京都.
- 3) 柳澤昌臣, 浅水俊平, 佐藤勝也, 大野豊, 尾仲宏康. 2017. 重イオンビーム照射変異株を用いた異属細菌刺激による放線菌二次代謝活性化機構の解析. QST高崎サイエンスフェスタ2017. 12月12-13日, 高崎.
- 4) 浅水俊平, 尾仲宏康. 2018. 異属細菌間の相互作用がもたらす放線菌特殊代謝. 2018年度日本農芸化学会大会. 3月15-18日, 名古屋.

原著論文

- 1) Asamizu S, Yanagisawa M, Satoh K, Sugai Y, Ohno Y, Onaka H (Manuscript in preparation)

その他

- 1) M. Yanagisawa, S. Asamizu, Y. Sugai, K. Satoh, Y. Ohno, H. Onaka. 2018. Screening of mutants generated by heavy ion beam for identification of genes involved in bacterial interaction. QST Takasaki Annual Report 2016, 97.

謝 辞

本研究において主要な実験(非応答性放線菌変異株スクリーニング及び多型・変異点解析)は東京大学大学院農学生命科学科の柳澤昌臣氏(2016年4月~2018年3月まで修士学生)により行われた。重イオンビーム照射実験は国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門 高崎量子応用研究所の佐藤勝也博士, 同 大野豊博士との共同研究により行った。MiSeqを用いた次世代シーケンスや, CLCゲノミクスワークベンチを用いた多型解析では, 東京大学大学院農学生命科学科の大西康夫教授, 手塚武揚助教に多大なご指導をいただいた。この場をお借りし深く感謝いたします。

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金(平成24年10月~29年9月)により行われた。また本研究の一部は科研費基盤研究B(尾仲宏康25292046), 科研費若手研究B(浅水俊平26850044, 16K18673)による研究助成により行われた。

文 献

- Hirano, T., Kazama, Y., Ishii, K., Ohbu, S., Shirakawa, Y. & Abe, T. 2015. Comprehensive identification of mutations induced by heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **82**: 93-104.
- Hoff, G., Bertrand, C., Piotrowski, E., Thibessard, A. & Leblond, P. 2018. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. *Sci. Rep.* **8**:
- Hu, W., Li, W. & Chen, J. 2017. Recent advances of microbial breeding via heavy-ion mutagenesis at IMP. *Lett. Appl. Microbiol.* **65**: 274-280.
- Lucchesi, P., Carraway, M. & Marinus, M.G. 1986. Analysis of forward mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the bacteriophage P22 *mnt* repressor gene. *J. Bacteriol.* **166**: 34-37.
- Martin, J.F., Rodriguez-Garcia, A. & Liras, P. 2017. The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism, respiration, cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **70**: 534-541.
- McCormick, J.R. & Flardh, K. 2012. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 206-231.
- Miller, J.H. 1985. Mutagenic specificity of ultraviolet light. *J. Mol. Biol.* **182**: 45-65.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 1362-1384.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Ostash, B., Shashkov, A., Streshinskaya, G., Tul'skaya, E., Baryshnikova, L., Dmitrenok, A., Dacyuk, Y. & Fedorenko, V. 2014. Identification of *Streptomyces coelicolor* M145 genomic region involved in biosynthesis of teichulosonic acid-cell wall glycopolymer. *Folia Microbiol. (Praha)* **59**: 355-360.
- Ou, X., Zhang, B., Zhang, L., Dong, K., Liu, C., Zhao, G. & Ding, X. 2008. SarA influences the sporulation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **40**: 877-882.
- Su, T., Liu, F., Gu, P., Jin, H., Chang, Y., Wang, Q., Liang, Q. & Qi, Q. 2016. A CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end-joining strategy for one-step engineering of bacterial genome. *Sci. Rep.* **6**: 37895.
- Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J. & Salmond, G.P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 887-899.
- Xu, Z., Wang, Y., Chater, K.F., Ou, H.Y., Xu, H.H., Deng, Z. & Tao, M. 2017. Large-scale transposition mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* identifies hundreds of genes influencing antibiotic biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e02889.

複合培養を用いた新規アルカロイドの同定と生合成に関する研究

尾崎 太郎¹⁾, 浅水 俊平, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Studies on the biosynthesis of novel alkaloids derived from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* HEK616 and *Tsukamurella pulmonis*

Taro Ozaki¹⁾, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

Co-culture of *Streptomyces* and mycolic acid-containing bacteria (MACB), which we termed combined-culture, dramatically changes the metabolic profile of *Streptomyces* and provides a promising strategy for the discovery of novel natural products that are not produced in conventional culture conditions. In this study, we applied the combined-culture method to screen antifungal natural products that specifically interact with the cell membrane of fission yeast. As a result, a series of novel metabolites with 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ) skeletons were identified. In the same culture broth, streptoaminals, which possess unique [5,5]-spirohemiaminal skeletons, were also discovered. Although the cyclization mode and oxidation state of 5aTHQs and streptoaminals were different, both compounds share the same carbon skeleton, implying the biosynthetic relationship of these metabolites. To obtain insights into the biosynthesis of 5aTHQs and streptoaminals, draft genome sequencing of the HEK616 strain was performed and a candidate gene cluster, comprising a unique type II PKS system, was readily identified. The function of this gene cluster was confirmed by heterologous expression and subsequent gene deletion analysis.

Key words: Combined-culture, tetrahydroquinolines, spiro-hemiaminals, type II PKS

緒 言

ミコール酸を細胞表層に有する細菌 (Mycolic acid-containing bacteria, MACB) を放線菌と同一のフラスコで培養すると、放線菌の代謝プロファイルが変化することが知られている。著者らはこの培養法を複合培養と命名し、生物活性物質の探索に利用してきた (Onaka *et al.*, 2011)。これまでに、インドロカルバズールやプテロラクトン、ポリエナムクロラクタムなど様々な化合物が複合培養によって発見されてきた (Derewacz *et al.*, 2015; Hoshino *et al.*, 2015; Hoshino *et al.*, 2015; Hoshino

et al., 2015; Hoshino *et al.*, 2017; Hoshino *et al.*, 2018; Hoshino *et al.*, 2018; Onaka *et al.*, 2011)。

本研究では、複合培養を利用して真核生物の膜脂質に作用する化合物のスクリーニングを行った。膜脂質は細胞膜の主要な構成因子であり、膜蛋白質との相互作用を介して、シグナル伝達や細胞の極性の決定などの生体プロセスに関与する。しかし、それらのプロセスにおける膜脂質の機能の解析は進んでいない。これは、膜脂質が構造多様性に富んでおり、適切な解析ツールがないことに起因する。わずかではあるが膜脂質と相互作用する低分子化合物が膜脂質の局在やそれが関与する生体プロセスの解析に使われている (Nishimura *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2014; Hannich *et al.*, 2011)。この種の化合物は、抗真菌剤や抗生物質のリードとしても期待される。

酵母のエルゴステロール生合成欠損株が、膜脂質を標的とした抗真菌剤に耐性を示すことが知られている。このこ

¹⁾現北海道大学理学研究院

E-mail: 尾崎太郎: ozaki@sci.hokudai.ac.jp

尾仲宏康: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者: 杉山龍介, 西村慎一, 掛谷秀昭

(京都大学大学院薬学研究科)

とを利用して分裂酵母野生型株と変異株に対して異なる活性を示す化合物をスクリーニングし、放線菌 *Streptomyces nigrescens* HEK616 の複合培養時特異的に生産される新規テトラヒドロキノリンアルカロイドを発見した。また、同じ培養液からは同一の生合成起源を有すると予想されるスピロヘミアミナル骨格を持つ化合物群も見出した。更にこれらの骨格情報に基づいて、HEK616 株のドラフトゲノムシーケンスからその生合成遺伝子群を見出した。

実験方法

5aTHQs の単離と構造決定

分裂酵母のエルゴステロール生合成欠損株 (*erg2Δ* および *erg31Δerg32Δ*) を用いて、酵母の膜脂質に作用する低分子化合物のスクリーニングを行った (Nishimura *et al.*, 2010)。YE5S (0.5% Yeast extract, 3% D-glucose, 225 μg/ml of 5S (adenine, histidine, leucine, uracil, lysine) 培地で培養を行った対数増殖中期の培養液を OD₅₉₅ が 0.033 となるように希釈し、培養抽出物の DMSO 溶液を終濃度 1% (v/v) となるように添加した。その後、30℃で24時間培養を行い、OD₅₉₅ をプレートリーダー (EnVision-2103, PerkinElmer) を用いて測定した。スクリーニングサンプルは石川県舳倉島から採集した土壌より分離した放線菌約 1000 株を *T. pulmonis* と複合培養した培養液のブタノール抽出物を用いた。その結果、*S. nigrescens* HEK616 の培養抽出物に活性が見出された。

S. nigrescens HEK616 株と *T. pulmonis* TP-B0596 の複合培養液 800ml から菌体を回収し、クロロホルム：メタノール (1:1) を用いて菌体成分を抽出した。抽出液を濃縮後、90%メタノールと *n*-ヘキサンを用いて分画した。*n*-ヘキサン層を回収し、シリカゲルクロマトグラフィーで分画した (*n*-ヘキサン：酢酸エチル)。目的化合物を含む画分を ODS カラムクロマトグラフィーでさらに精製した (メタノール：水)。5aTHQ を含む画分を逆相 HPLC (一次精製カラム：COSMOSIL 5C₈-MS, 溶媒：84%メタノール；二次精製カラム：COSMOSIL Cholester, 溶媒：89%メタノール) で分画し、精製化合物を得た。各化合物の構造は 1次元および2次元の NMR, 質量分析を行って決定した。また、5aTHQ-10a の絶対配置は化合物と合成標品をそれぞれ大類-赤坂エステルへと導いて、それぞれの ¹H NMR スペクトルを比較することで決定した。

ストレプトアミナルの単離と構造決定

S. nigrescens HEK616 株と *T. pulmonis* TP-B0596 の複合培養液 1L から菌糸を回収し、クロロホルム：メタノール (1:1) を用いて菌体成分を抽出した。抽出液を濃縮

し、90%メタノールと *n*-ヘキサンを用いて分画した。90%メタノール層を回収し、ODS カラムクロマトグラフィー (移動相：水・メタノール)、シリカゲルクロマトグラフィー (移動相：クロロホルム・メタノール) を用いて分画した。また、*n*-ヘキサン層をシリカゲルクロマトグラフィー (移動相：*n*-ヘキサン・酢酸エチル、およびクロロホルム・メタノール) に供し、分画した。ストレプトアミナル (Streptoaminal) を含有する画分を NH-シリカゲルカラムクロマトグラフィー (移動相：*n*-ヘキサン・酢酸エチル) に供し、ストレプトアミナルの側鎖の異なる混合物を合わせて 86.5mg 得た。このうち、41.6mg を逆相 HPLC (カラム：COSMOSIL 5C₈-MS, 溶媒：67%メタノール・33%水・0.1% TFA) を用いて精製し、2.4mg のストレプトアミナル-9n, 3.0mg のストレプトアミナル-9i, 2.1mg のストレプトアミナル-8n をそれぞれ TFA 塩として得た。

標識化合物を用いた生合成経路の解析

S. nigrescens HEK616 と *T. pulmonis* を V-22 培地に接種し、30℃で2日間培養を行った。この培養液を種培養とし、100ml の A-3M 培地に対してそれぞれ 3ml、および 1ml 接種した。この培養液を 30℃で培養し、培養開始 72 時間後まで 24 時間ごとに [¹³C] 酢酸ナトリウム、あるいは [1,2-¹³C₂] 酢酸ナトリウムを 50mg ずつ計 200mg 添加した。5 日間の培養終了後、5aTHQ 類を精製し、¹³C NMR に供し、酢酸の取り込みパターンを観測した。

生合成遺伝子の探索

S. nigrescens HEK616 株のドラフトゲノム解析を行った。イルミナ社の Genome Analyzer GAIIx を用いて解析した。得られたリードは、Edena および Velvet を用いてアッセンブルした。なお、以上のライブラリー作製、配列解析、*de novo* アッセンブリーはタカラバイオ社に委託した。

得られたデータをもとにデータベースを構築し、BLAST を用いて標的遺伝子を探索した。BLAST は、機能解析済みのポリケチド合成酵素の KS ドメイン、および窒素原子の導入に関与すると推測したアミノ基転移酵素のアミノ酸配列をクエリとして行った。

同定した遺伝子クラスターを PCR 反応により増幅した後、大腸菌-放線菌シャトルベクター pTYM19gt にクローニングした (Hayashi *et al.*, 2014)。構築したプラスミド pTYM19gt-stm を大腸菌 *Escherichia coli* S17-1 株に導入した後、放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に接合伝達を利用して導入した。得られた形質転換体を *T. pulmonis* と同時に A-3M 培地に接種し、30℃で10日間培養を行った。培養終了後、代謝産物をクロロホルム：メタノール (1:1) で抽出し、LC-MS 分析に供した。

遺伝子破壊

λ RED 相同組換え法を用いて、pTYM19gt-stm ベクター上で各 *stm* 生合成遺伝子へ欠失変異を導入した。pTYM19gt-stm ベクターと、PCR により増幅したアプライン耐性遺伝子 *aac(3)IV* をエレクトロポレーション法により大腸菌 *E. coli* BW25141 株へ導入し、相同組換えにより *stmB*, *stmD*, *stmF*, *stmG*, *stmH* 遺伝子領域を耐性遺伝子カセットで置換した。各形質転換体から定法に従いプラスミドを抽出した後、*Xba*I で消化することで耐性遺伝子カセットを切り出し、セルフライゲーションすることで欠失変異を導入した。各プラスミドを上述の方法と同様に *S. lividans* TK23 へ導入し、形質転換体の代謝産物を分析した。遺伝子破壊による極性効果がないことを確認するため、各破壊遺伝子の相補株を作製し、代謝産物の分析を行った。

結果および考察

5aTHQ の単離と構造決定

分裂酵母野生型株およびエルゴステロール生合成欠損株に対する生育阻害活性を比較し、前者に選択的に活性を示す化合物をスクリーニングした。分裂酵母のエルゴステロール生合成欠損株（以下欠損株）は、アムホテリシン B やシリノマイシン E のように脂質を標的とする抗生物質に対して耐性を示すことが知られており (Hampsey, *et al.* 1997; Iwaki *et al.*, 2008; Nishimura *et al.*, 2010; Sugiyama *et al.*, 2014), 同様に分裂酵母野生型株に特異的に活性を示す化合物は分裂酵母の生体膜に作用する化合物であることが期待される。放線菌純粋培養液および複合培養液から目的の活性を探索したところ、放線菌 *S. nigrescens* HEK616 と *T. pulmonis* TP-B0596 の複合培養抽出物に活性を見出すことができた。活性画分をカラムクロマト

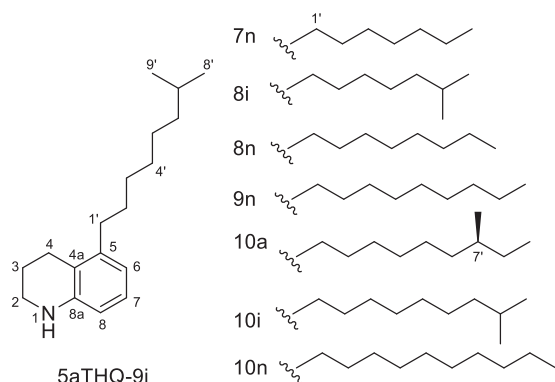


Fig. 1 Structures of 5aTHQs. The numbers indicate the length of alkyl chains. i: iso-; n: normal-; a: anteiso-.

ラフィーにより分画し、8種の関連化合物を見出した。NMRおよび質量分析を用いて構造決定を行った結果、いずれの化合物も1,2,3,4-tetrahydroquinolineの骨格を有しており、5位に鎖長・分岐様式の異なるアルキル基を有していることが明らかになった。各化合物は側鎖の鎖長と分岐様式に従って命名した(5aTHQ)(Fig.1)。側鎖の7'位にメチル基を有する5aTHQ-10aについては、天然物および合成標品を大類-赤坂エステルへと導いて、それぞれの¹H NMRを比較することで絶対配置を(7'S)であると決定した。これは大類-赤坂法をキラルアミンの立体化学の決定に応用した初めての例である。

ストレプトアミナルの単離と構造決定

側鎖構造の異なる8種の類縁体が見られる5aTHQ類が質量分析において、分子量の差が14ごとに検出されるイオンピークのクラスタが検出されることに着目し、同様のイオンピークのクラスタを探索することで新規の化合物群を容易に取得できると期待し、研究を行った。5aTHQが単離された*S. nigrescens* HEK616と*T. pulmonis* TP-B0596の複合培養液を精査したところ、分子量差14の新たなイオンピーククラスタ(*m/z* 270, 284, 298, 312, 326)が見出された。これらの化合物をカラムクロマトグラフィーにより精製し、3種の化合物を得ることができた。NMRと質量分析による構造解析を行った結果、いずれも[5,5]-スピロヘミアミナル構造を有する新規化合物であることが明らかになった(Fig.2)。9位のアルキル基の鎖長と分岐様式が異なる構造であったため、5aTHQと同様にそれぞれストレプトアミナル-9n, -9i, -8nと命名した。また、合成標品との比較から絶対配置を(5R, 7S, 9S)と決定した。

5aTHQとストレプトアミナルの構造を比較したところ、環化様式と酸化度は異なるものの同一の炭素骨格から構成されていることが推定された。このことから、これらの化合物の生合成経路には関連があることが示唆

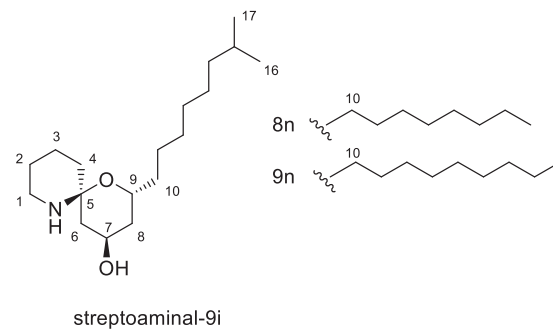
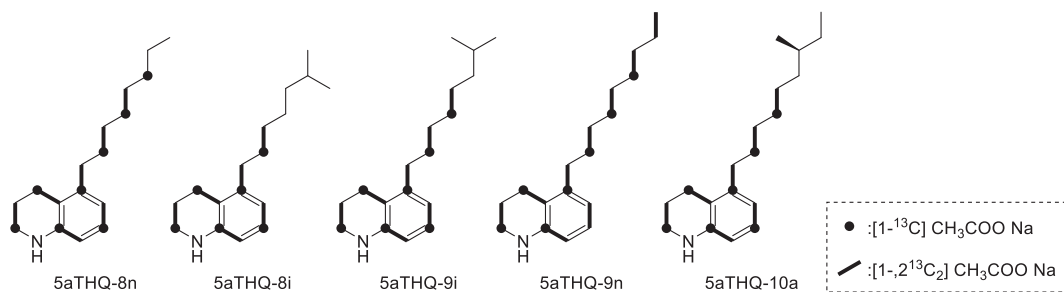


Fig. 2 Structures of streptoaminals.

Fig. 3 ^{13}C labeling pattern of 5aTHQs.

される。次節以降ではその生合成解析を行った。

標識化合物を用いた生合成経路の解析

5aTHQ の生合成解析にあたり、その化学構造からポリケチド合成酵素によって生合成されると予想した。そこでポリケチド化合物の基質となる酢酸の取り込み実験を行った。 *S. nigrescens* HEK616 と *T. pulmonis* TP-B0596 の複合培養に $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウムおよび $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸ナトリウムを添加し、5aTHQ の標識パターンを試験した。標識化合物の ^{13}C NMR 解析の結果、5aTHQ のテトラヒドロキノリン骨格のすべての炭素に ^{13}C の取り込みが確認された。この際、酢酸の1位の炭素はTHQの2, 4, 5, 7, 8a位に、2位の炭素は3, 6, 8, 4a位に選択的に取り込まれることが分かった (Fig.3)。また、側鎖アルキル基にも酢酸が連続的に取り込まれることが明らかになった。これらの結果から、5aTHQ 類の生合成には、予想通り、酢酸単位の連続的な縮合反応を触媒するポリケチド合成酵素が関与することが示唆された。

^{13}C 標識酢酸の取り込みパターンから、5aTHQ の生合成経路を以下のように推測した (Fig.4)。5aTHQ には側鎖の鎖長や分岐の様式が異なる複数の類縁体が存在することから、5aTHQ 類を生合成するポリケチド合成酵素は酢酸単位以外にもイソ酪酸やプロピオン酸に由来する様々な開始基質を利用できると推測される。炭素鎖はアセチル CoA を単一基質として取り込んで伸長した後、チオエステルの還元的な開裂によってアルデヒドとして放出される。生じたアルデヒドがアミノ基転移酵素の作用によってアミノ基へと変換された後、環化反応が進行することで5aTHQ の骨格が合成されると考えられる。この環化反応が自発的に進行するか酵素の作用によるものかは、この段階で結論することはできなかった。

生合成遺伝子の同定・遺伝子破壊

S. nigrescens HEK616 染色体 DNA の次世代シーケンサ

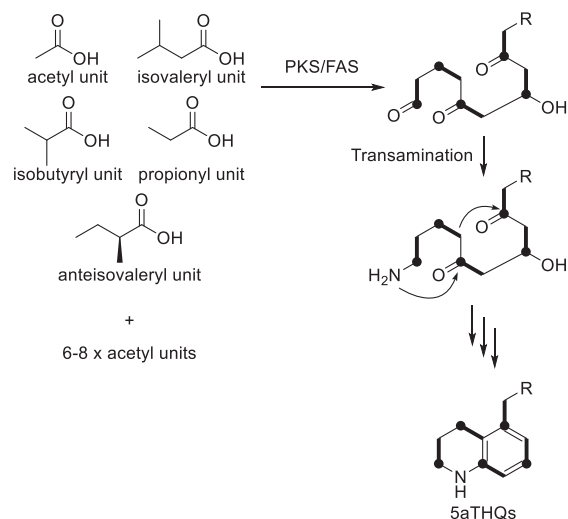
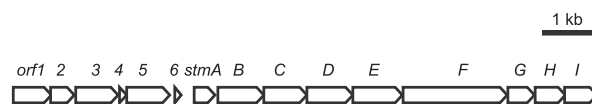


Fig. 4 Proposed biosynthetic pathway of 5aTHQs predicted by feeding experiments.

Fig. 5 The *stm* gene cluster of *Streptomyces nigrescens* HEK616.

による塩基配列の解読、および Edena を用いた *de novo* アセンブリによって総塩基長約 9.3 Mb のドラフトシーケンズデータを得ることができた。標識実験の結果をもとに、BLAST のアルゴリズムを用いてポリケチド生合成遺伝子を探索したところ、15 遺伝子からなる遺伝子クラスターを同定することができた (Fig. 5)。後述する異種発現によって *stmA-I* がストレプトアミナルの生合成遺伝子であることが確かめられたため、本遺伝子クラスターを *stm* 遺伝子群と命名した。本遺伝子クラスターは、ACP (acyl carrier

protein, StmA), KS (ketosynthase, StmB-E), aminotransferase-reductase (StmF), KR (ketoreductase, StmG & StmH), type II TE (thioesterase, StmI) をコードする遺伝子を含んでいた (Table 1). 相同性を示す遺伝子クラスターは、グラム陽性およびグラム陰性のバクテリアにも存在し, *Streptomyces albulus*, *Pseudomonas putida*, *Photobacterium gaetbulicola*, *Vibrio gazogenes* などにも見

出された. *stmA* の上流に存在する6つのORF (*orf1-6*) は他の *Streptomyces* の遺伝子クラスターには保存されていたが, グラム陰性菌由来の遺伝子クラスターには存在しなかった. この *orf1-6* オペロンは P450 や転写制御因子などから構成されていた (Table 1).

4つのKSは既知KSの分子進化系統樹においてII型PKSのKS, およびCLF (chain length factor) と近いク

Table 1 Deduced function of ORFs in *stm* gene cluster.

ORF	Amino acids	Proposed function	Homologous protein Organism, identity/similarity
ORF1	353	oxidoreductase	hypothetical protein <i>Streptomyces albulus</i> , 87%/92%
ORF2	215	Transcription factor	TetR family transcriptional regulator <i>S. albulus</i> , 85%/90%
ORF3	392	P450	putative cytochrome P450 hydroxylase <i>S. albulus</i> , 86%/91%
ORF4	64	Ferredoxin	hypothetical protein <i>S. albulus</i> , 76%/84%
ORF5	397	Ferredoxin reductase	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase <i>S. albulus</i> , 75%/81%
ORF6	61	Hypothetical protein	-
StmA	192	ACP	hypothetical protein <i>S. albulus</i> , 87%/93%
StmB	436	KS	3-oxoacyl-ACP synthase <i>S. albulus</i> , 83%/88%
StmC	398	CLF	Putative beta-ketoacyl synthase <i>S. albulus</i> , 76%/78%
StmD	428	KS	3-oxoacyl-ACP synthase <i>S. albulus</i> , 89%/93%
StmE	463	CLF	Putative beta-ketoacyl synthase <i>S. albulus</i> , 81%/87%
StmF	961	aminotransferase/reductase	Pyridoxalphosphate dependent aminotransferase, class III <i>S. albulus</i> , 85%/90%
StmG	248	KR	3-oxoacyl-ACP reductase <i>S. albulus</i> , 85%/92%
StmH	264	KR	short-chain dehydrogenase <i>S. albulus</i> , 86%/89%
StmI	254	Type II TE	thioesterase <i>S. albulus</i> , 71%/79%

レードに分類されることが分かった (Fig.6). StmB と StmD は, KS における活性残基として知られるシステイン残基が保存されていることから, 分子進化系統樹から示唆されたように, KS として機能すると考えられる. 一方で StmC と StmE ではシステイン残基がセリンやア

ラニンで置換されており, CLF として機能すると考えられた. これらの遺伝子の並び方を考慮すると, StmB と StmC, StmD と StmE がそれぞれ一対の KS-CLF として機能すると推測される. これらの KS/CLF は芳香族ポリケチドを合成する既存の II 型 PKS とは異なるク

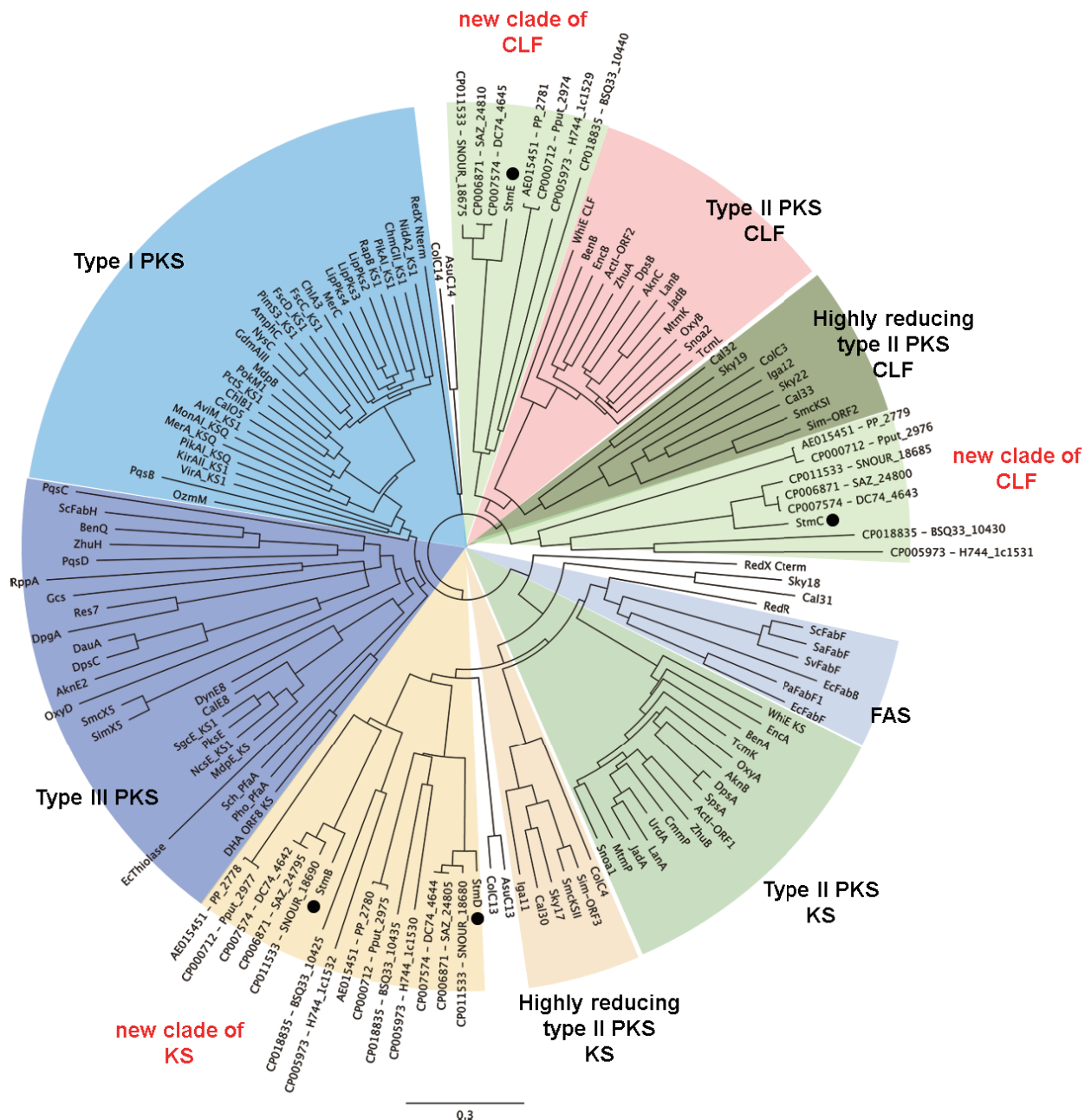


Fig. 6 Phylogenetic tree for StmB, StmC, StmD, StmE, and selected PKSs and FASs. StmB and StmD belong to a phylogenetic clade different to the KSs of type II PKSs and FASs. StmC and StmE belong to a phylogenetic clade different to the CLFs of typical type II PKSs. Black dots indicate the position of StmB, StmC, StmD, and StmE. The phylogenetic tree was generated using the Geneious tree builder exploiting the neighbor-joining method. Distances were obtained from the global alignment of all sequence pairs using BLOSUM62. StmB, StmC, StmD, StmE resemble KSs and CLFs of type II PKS system but are classified into the new clades.

レードに分岐することから、新たなファミリーのII型PKSであることが示唆される。

興味深いことに、StmFのN末端領域はアミノ基転移酵素と、C末端領域はグルタミル tRNA 還元酵素と相同性を示し、本タンパク質が二機能性酵素であることが示唆された。各ドメインの相同タンパク質の機能から考えると、StmFはC末端領域においてチオエステル結合の還元的開裂を触媒してポリケチド鎖をアルデヒドとして切り出し、続いてN末端領域においてアミノ基転移反応を行い、炭素鎖の末端に1級アミンを生成すると考えられる。

StmGとStmHはどちらも3-オキソアシル ACP 還元酵素と相同性を示した。その為、これらはそれぞれポリケチド鎖の伸長過程でケト基の還元を触媒するKRであると考えられる。また、StmIはtype II TEと相同性を示すことから、炭素鎖伸長過程で生じる誤ったアシル鎖をACPから切り出す校正酵素であると考えられる(Kotowska, M. & Pawlik, 2014)。

stm遺伝子クラスターの異種発現

前述の各遺伝子の機能予測の結果から、*stmA-I*がストレプトアミナルと5aTHQの基本骨格の生合成に関与すると考えられた。そこでこれらの遺伝子をクローニングし、*S. lividans* TK23を宿主として異種発現を行った。異種発現の際には、*stmA-I*をゴードスポリン前駆体遺伝子*godA*プロモーターの下流にクローニングした。

形質転換体の代謝産物をLC-MSで分析した結果、ストレプトアミナル-9n、-9iを生産していることが標品との比較によって明らかになった (Fig. 7A)。その他の類縁体についても生産が確認された。しかしながら、形質転換体の純粋培養液からは5aTHQの生産は確認されなかった。そこで、*godA*プロモーターが複合培養時に活性化されることから、形質転換体を*T. pulmonis*との複合培養に供した。同時に*T. pulmonis*による放線菌の代謝応答の可能性も考慮し、*S. lividans* TK23に対してHEK616と同様の応答を示すことも期待した。複合培養液をLC-MSに供したところ、5aTHQ-9i、-9n、-10aが生産されたことが標品との比較から明らかになった (Fig. 7B)。本結果から、5aTHQとストレプトアミナルが同一のPKSによって生合成されることが明らかになった。

THQとストレプトアミナルの生合成についてさらに知見を得るために、遺伝子破壊実験を行った。2種のKS遺伝子*stmB*と*stmD*、アミノ基転移酵素・還元酵素*stmF*を欠失させたプラスミドを作製し*S. lividans* TK23に導入したところ、いずれの形質転換体でもTHQとストレプトアミナルの生産が失われた。このことから、

両化合物が同一のポリケチド合成酵素によって生合成されることが確かめられた。KRと考えられる*stmG*および*stmH*を欠失させたプラスミドを*S. lividans* TK23に導入したところ、同様に5aTHQの生産が失われた。興味深いことに、*stmH*欠損株ではストレプトアミナル

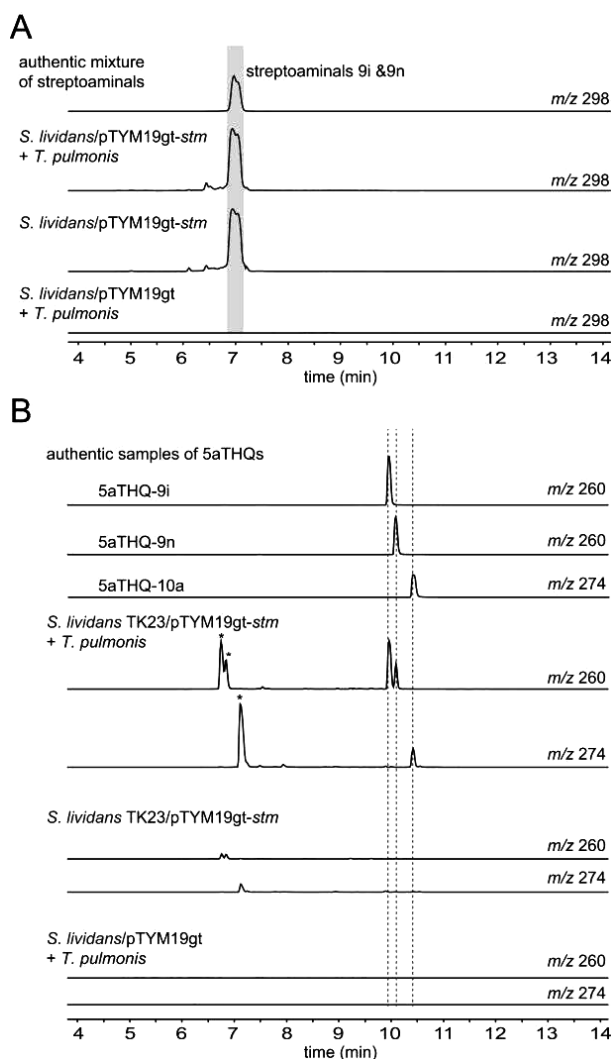


Fig. 7 Heterologous expression of *stmA-I* in *Streptomyces lividans* TK23. A. The transformant produced streptoaminal-9i and -9n both in the presence and in the absence of *Tsukamurella pulmonis*. Chromatograms are extracted at *m/z* 298 that is corresponding to streptoaminals-9i and -9n. B. The transformant produced 5aTHQs only in the presence of *T. pulmonis*. Chromatograms are extracted at *m/z* 260 and *m/z* 274 that are corresponding to 5aTHQ-9n and -9i, and 5aTHQ-10a. Asterisks indicate unidentified metabolite specifically produced by the transformants.

の生産も失われたが, 一方で *stmG* 欠損株では生産量が減少するものの, ストレプトアミナールが生産されていた (Fig.8).

ストレプトアミナールと 5aTHQ の推定生合成経路

バイオインフォマティクスによる機能推定, 異種発現, および遺伝子破壊実験の結果から, ストレプトアミナールと 5aTHQ の生合成経路を以下のように推測した (Fig.9). 両者の基本骨格は II 型 PKS による鎖伸長, 還元的切り出しとアミノ化によって生合成される. 生合成されるポリケチド鎖の酸化度の違いによって, 異なる環化様式のストレプトアミナールと 5aTHQ が生成すると考えられる.

鎖長と分子様式の異なる様々な類縁体が存在することから, 生合成は脂肪酸合成経路由来の β -ヒドロキシアシル-ACP とマロニル-ACP の縮合によって開始される. KS-CLF である *StmB/C* あるいは *StmD/E* のどちらかがこの反応を担うと考えられる. 続く鎖伸長段階では, β -ケトアシル ACP は *StmG* と *StmH* によって, β -ヒドロキシアシル ACP へと変換される. 非酵素的な環化反応によって ACP から切り出された副生物が生産されないことから, ケト基の還元は伸長のサイクルごとに行われると考えられる. 同様の事例はイシガミドの生合成においてポリエンを合成する特異な II 型 PKS でも知られてい

る (Du *et al.*, 2018). 生合成後半の環化反応ではケト基が必要となるため, 2 段階目の伸長の際のケト還元はスキップされると考えられる. また, 3 段階目の伸長の際は, ケト基の還元によって生じた水酸基はさらに脱水とエノイル還元を受けると考えられる. *stm* 遺伝子クラスターにはこれらの反応を担う酵素遺伝子が存在しないため, 代わりに脂肪酸合成系の酵素がこの反応を触媒すると推測される. ポリケチド鎖の伸長が終了すると, *StmF* の C 末端ドメインによる還元的切り出しによってアルデヒドが生成した後, N 末端ドメインによってアミノ基へと変換される. 生じたアミノ基が分子内のケト基へと求核攻撃することで, 環状イミンが生成する. この環状イミンが速やかにストレプトアミナールへと互変異性化することが合成標品を用いて確かめられている (Sugiyama *et al.*, 2016). 5aTHQ は上記の過程で生成する中間体 **1** あるいは **2** が酸化されることで生成する中間体 **3** を経由して生合成されると考えられる. 興味深いことに, 2 種存在する KS/CLF がどちらも生合成に必要であることから, これらはポリケチドの伸長過程においてそれぞれ異なる鎖長の中間体を認識して伸長反応を触媒すると考えられる.

stmG 欠損株においては 5aTHQ の生産が失われる一方で, ストレプトアミナールの生産が完全には失われないことが分かっている. このことを考慮すると, 上記の **1**

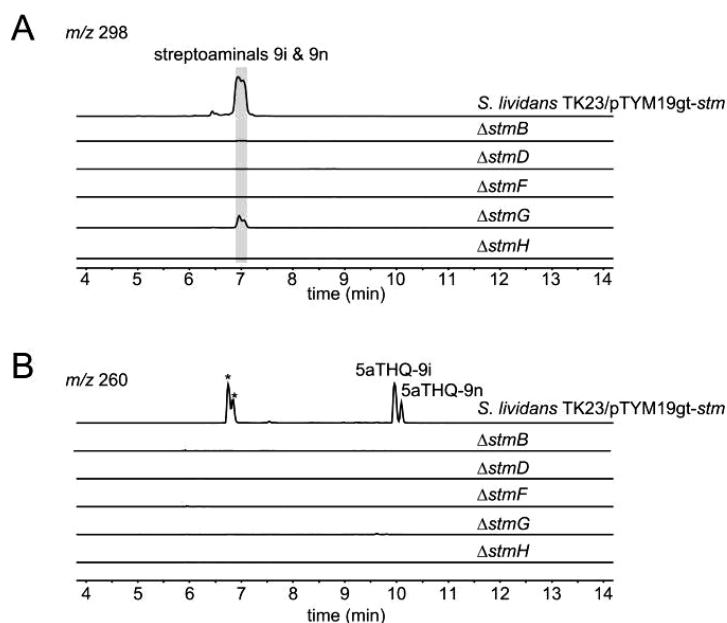


Fig. 8 Gene deletion analysis. *stmB*, *stmD*, *stmF*, *stmG*, and *stmH* were deleted using λ RED recombination. A. All the transformants, except Δ *stmG* strain, abolished production of streptoaminals. Chromatograms are extracted at m/z 298. B. All the transformants abolished production of 5aTHQs. Chromatograms are extracted at m/z 260.

複合培養を用いた新規アルカロイドの同定と生合成に関する研究

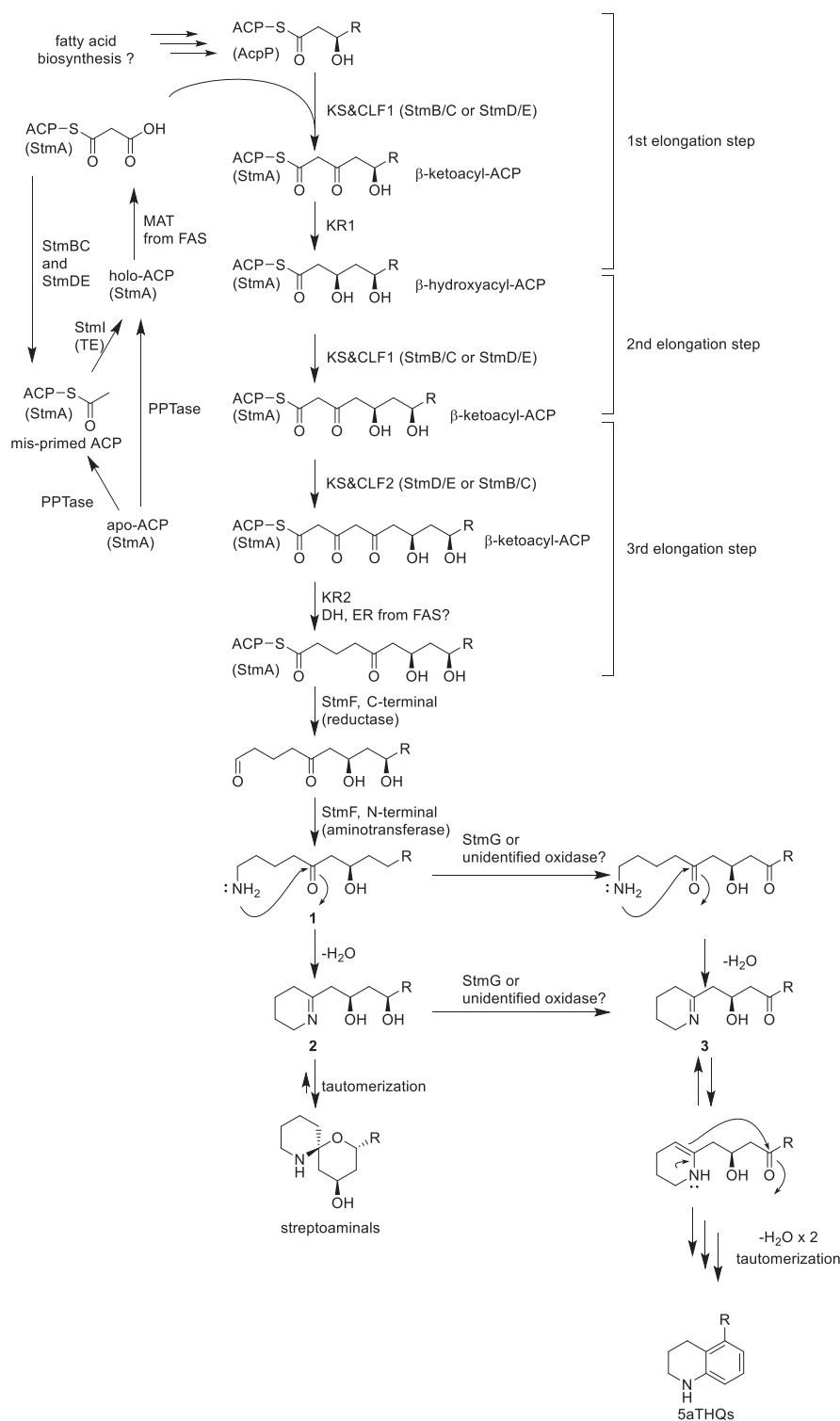


Fig. 9 Proposed biosynthetic pathway for streptoaminals and 5aTHQs. StmB and StmC, and StmD and StmE likely form distinct KS-CLF pairs. Either of them (indicated as KS&CLF1) might be responsible for the first two steps of chain extension, and the other (KS&CLF2) for the last step. Two KR, StmG and StmH, would catalyze ketoreduction at different step of chain elongation. After the chain elongation, reductive cleavage and transamination are catalyzed by StmF. Subsequent cyclization and tautomerization yielded streptoaminals. For the biosynthesis of 5aTHQs, oxidation of one hydroxy group would be necessary, which might be catalyzed by StmG or other unidentified oxidase.

あるいは2の脱水素反応をStmGが担う可能性が考えられる。異なる可能性として、*T. pulmonis*との複合培養において特異的に活性化される未知の酸化酵素がこの反応に関与することも考えられる。後者の場合、生産菌である*S. nigrescens* HEK616と異種発現の宿主である*S. lividans* TK23の両者で5aTHQが複合培養特異的に生産されることから、両者に共通した酸化酵素の存在が示唆される。現在、純粋培養時及び複合培養時の比較転写解析を進めており、複合培養時の遺伝子発現変化について知見が得られつつある。今後の解析によって、複合培養による放線菌の代謝変化の分子機構が明らかになると期待される。

要 約

複合培養は、放線菌に数多く潜在する二次代謝経路を活性化する有用な手法の一つである。本研究では、複合培養を出芽酵母の生体膜に作用する化合物のスクリーニングに応用し、新規アルカロイドである5aTHQの同定に成功した。同時に5aTHQと共通する炭素骨格を有し、酸化度・環化様式が異なるストレプトアミナルも見出すことができた。生産菌のゲノム解析と異種発現によって生合成遺伝子を同定し、両化合物群がどちらも新規のII型PKSによって生合成されることを明らかにした。複合培養によって放線菌の二次代謝経路が活性化されるメカニズムは明らかにされていないが、今回複合培養時特異的に生産される5aTHQの生合成遺伝子および生産菌のゲノム配列が明らかになったことで、複合培養時の転写プロファイルの変化を解析することが可能になった。今後、複合培養による二次代謝活性化機構が分子レベルで明らかになることで、未利用の放線菌遺伝子資源をより効率的に利用できるようになると期待される。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 杉山龍介, 西村慎一, 尾崎太郎, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 2014. テトラヒドロキノリン骨格を有する新規放線菌代謝物の構造多様性と生物活性. 日本薬学会134年会. 3月, 熊本.
- 2) 尾崎太郎, 森夕希子, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 2014. 放線菌の複合培養法による新規テトラヒドロキノリン類の単離とその生合成. 日本農芸化学会2014年度大会. 3月, 東京.
- 3) 尾崎太郎, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 2014. 複合培養を利用した新規テトラヒドロキノリン類の単離とその生合成に関する研究. 2014年度(第29回)日本放線菌学会大会. 6月, 茨城.
- 4) 尾崎太郎, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 2014. 複合培養により見出された新規テトラ

ヒドロキノリン類の生合成遺伝子の同定と解析. 第10回生合成勉強会(「生合成マシナリー」第6回若手シンポジウム). 8月, 東京.

- 5) Ryosuke Sugiyama, Shinichi Nishimura, Taro Ozaki, Hiroyasu Onaka & Hideaki Kakeya. 2015. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, membrane-interacting lipophilic metabolites, found in combined-culture of *Streptomyces* sp. HEK616 and *Tsukamurella pulmonis*. Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era. January, San Diego, U.S.A.
- 6) 杉山龍介, 西村慎一, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 2016. 脂質結合性天然物の活用—放線菌複合培養液より見出した新規アルカロイド群に関する研究. 日本薬学会第136年会. 3月, 横浜.
- 7) 下村杜人, 尾崎太郎, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 2016. 複合培養特異的に生産されるテトラヒドロキノリン生合成遺伝子の解析. 日本農芸化学会2016年度大会. 3月, 札幌.
- 8) 西村慎一, 杉山龍介, 仲谷崇宏, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 2016. 微生物の複合培養で得られる5aTHQとstreptoaminalの構造と構造. 第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム. 10月, 千葉.
- 9) 下村杜人, 尾崎太郎, 杉山龍介, 西村慎一, 浅水俊平, 掛谷秀昭, 尾仲宏康. 2017. 複合培養によって生産されるテトラヒドロキノリン化合物の解析. 第32回日本放線菌学会. 9月, 長野.

原著論文

- 1) Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Kakeya, H. 2015 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. Org. Lett. 17: 1918-1921
- 2) Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Kakeya, H. 2016 Discovery and total synthesis of streptoaminals: Antimicrobial [5,5]-spirohemiaminals from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. Angew. Chem.Int. Ed. 55: 10278-10282

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって開設された微生物潜在機能探索寄付講座においてなされたものである。本助成を賜った発酵研究所に対して、ここに厚く御礼申し上げます。本寄付講座世話人である東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・大西康夫教授のご支援とご協力に感謝の意を表します。5aTHQおよびストレプトアミナルの単離と構造解析、生物活性試験は京都大学大学院・薬学研究科システムケモセラピー・制御分子学分野(掛谷研究室)で行われたものである。同掛谷秀昭教授, 西村慎一助教, 杉山龍介氏に厚く御礼申し上げます。生合成研究でご助言を賜りました東京大学大学委員農学生命科学研究科応用生命工学専攻・勝山陽平准教授に感謝の意を表します。

文 献

- Bilyk, O., Brötz, E., Tokovenko, B., Bechthold, A., Paululat, T. & Luzhetskyy, A. 2016. New simocyclinones: Surprising evolutionary and biosynthetic insights. *ACS Chem. Biol.* **11**:241-250.
- Derewacz, D.K., Covington, B.C., McLean, J.A., Bachmann, B.O. 2015. Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery. *ACS Chem. Biol.* **10**: 1998-2006.
- Du, D., Katsuyama, Y., Onaka, H., Fujie, M., Satoh, N., Shin-Ya, K. & Ohnishi, Y. 2016. Production of a Novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem* **17**: 1464-1471.
- Du, D., Katsuyama, Y., Shin-Ya, K. & Ohnishi, Y. 2018. Reconstitution of a Type II polyketide synthase that catalyzes polyene formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**:1954-1957.
- Hampsey, M. 1997. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1099-1133.
- Hannich, J.T., Umehayashi, K. & Riezman, H. 2011. Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**.
- Hayashi, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Ikeda, H., Omura, S., Oku, N., Igarashi, Y., Tomoda & Onaka, H. 2014. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.* **21**: 679-688.
- Hoshino, S., Okada, M., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Abe, I. 2017. Mycolic acid containing bacterium stimulates tandem cyclization of polyene macrolactam in a lake sediment derived rare actinomycete. *Org. Lett.* **19**:4992-4995.
- Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Onaka, H. & Abe, I. 2015. Niizalactams A-C, multicyclic macrolactams isolated from combined culture of *Streptomyces* with mycolic acid-containing bacterium. *J Nat Prod.* **78**: 3011-3017.
- Hoshino, S., Ozeki, M., Wong, C. P., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Morita, H., Onaka, H. & Abe, I. 2018. Mirilactams C-E, novel polycyclic macrolactams isolated from combined-culture of *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 and mycolic acid-containing bacterium. *Chem. Pharm. Bull.* **66**: *in press*.
- Hoshino, S., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015. Chojalactones A-C, cytotoxic butanolides isolated from *Streptomyces* sp. cultivated with mycolic acid containing bacterium. *Org. Lett.* **17**: 1501-1504.
- Hoshino, S., Wong, C.P., Ozeki, M., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H., & Abe, I. 2018. Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *J. Antibiot.*, **71**: *in press*.
- Hoshino, S., Zhang, L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Onaka, H. & Abe, I. 2015. Arcyriaflavin E, a new cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated by combined-culture of mycolic acid-containing bacteria and *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823. *J. Antibiot.* **68**: 342-344.
- Iwaki, T., Iefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., Takegawa, K. 2008. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **154**: 830-841.
- Kotowska, M. & Pawlik, K. 2014. Roles of type II thioesterases and their application for secondary metabolite yield improvement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 7735-7746.
- Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., Yoshida, M. 2010. Marine antifungal theonellamides target 3beta-hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 519-526.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Pohle, S., Appelt, C., Roux, M., Fiedler, H.P. & Süßmuth, R.D. 2011. Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skyllamycin: deciphering unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 6194-6205.
- Sugiyama, R., Nishimura, S., Matsumori, N., Tsunematsu, Y., Hattori, A., Kakeya H. 2014. Structure and biological activity of 8-deoxyheronamide C from a marine-derived *Streptomyces* sp.: heronamides target saturated hydrocarbon chains in lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **136**: 5209-5212.

放線菌複合培養液からの抗生物質-シデロフォア連結化合物の発見

浅水 俊平, 菅井 佳宣, 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
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

A new sideromycin-like antibiotic from combined-culture of *Streptomyces hygroscopicus* HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*.

Shumpei Asamizu, Yoshinori Sugai, Hiroyasu Onaka

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

A new sideromycin-like antibiotic was identified in a combined-culture of *Streptomyces hygroscopicus* HOK021 and *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596. The planar structure and two absolute stereo-chemistries were assigned based on a spectroscopic analysis and modified Marfey's method. The identified compound was a conjugant of FabF inhibitor platensimycin and siderophore enterobactin dimer connected by a C-S bond. The isolated antibiotic, named harundomycin (HDM), showed ferric iron (Fe^{3+}) chelating activity. HDM had moderate minimum inhibitory concentration (MIC) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant enterococci (VRE). The MIC of HDM was compared with platensimycin under an iron depleted condition. Intriguingly, while the PTM reduced bioactivity, HDM retained growth inhibition activity, which implied that the catechol unit binds Fe^{3+} and mimics a siderophore to support the active transport of the HDM into the cell and the released PTM acts as the growth inhibitor. The HDM was likely produced by activation of more than two gene loci including *ptm* and *ent* biosynthetic gene clusters in HOK021, and a subsequent uncharacterized reaction was involved that formed thioester linkage between two independent natural products. These results show that bacteria may have evolved to use offensive delivery systems during competitive interaction and suggest that even known secondary metabolites could be validated in an ecological system involving the complex soil microbiome.

Key words: *Streptomyces*, mycolic acid-containing bacteria, sideromycin, anti-MRSA, anti-VRE

緒 言

放線菌は臨床的に重要な薬剤を含む二次代謝産物 (SM) を生産する菌糸状に生育するグラム陽性細菌である。近年の放線菌ゲノム解析により、放線菌は20-40個の潜在的SM生合成遺伝子クラスター (BGC) を有することが明らかになったが、実験室における培養条件下では限られたSM-BGCのみしか発現されない。したがって、残りの休眠状態または十分な発現のないBGCの活性化は、新規な天然産物を発見するために有

望な方法となると考えられる。

放線菌は、時には生態学的ニッチにおける環境変化、外的ストレスに対応する生存戦略 (環境適合) のために多様な特殊代謝 (=SM) を進化させたと考えられる (van der Meij *et al.*, 2017)。これらのSMの生態学的機能を理解することは、実験室の培養条件下では発現されない多数のいわゆる「潜在性」BGCの発現やその機能を解析するために必要であることが考えられる。中でも最近注目されているように、「潜在性」SM-BGCの一部では、他の微生物の活動を感知して発現されている可能性が示唆されている。他の微生物の増殖などの活動を感知し、二次代謝の発現パターンを変化させる方法としては、複数の細菌によって引き起こされる必須栄養素 (炭素源となる糖や脂質、窒素源となるアミノ酸、無機リン酸など) の動的変化、特定の化学物質、また場合によっては他の

E-mail: 浅水俊平 (asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)
菅井佳宣 (yoshinorisugai2158@gmail.com)
尾仲宏康 (aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)
共同研究者: 河合盛進 (トヨタ紡織株式会社基礎研究所),
荒川宜親 (名古屋大学大学院医学系研究科)

細菌との物理的な相互作用が考えられる (Urem *et al.*, 2016).

細菌における環境適合の例として, シデロフォアを用いて鉄の取り込みを他の細菌と競合することが知られている (Johnstone & Nolan, 2015). *Streptomyces* 属放線菌は, 広く一般的に hydroxamate 型シデロフォアである desferrioxamine を生産することが知られるが, *Streptomyces coelicolor* A3(2) は *Amycolatopsis* sp. AA4 との競合において, 特異的に鎖長の異なるアシル化 desferrioxamine 類を生産することが報告されている (Traxler *et al.*, 2013). 大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性細菌は一般的にカテコール型シデロフォアである enterobactin を生産することが知られ (Reitz *et al.*, 2017), 最近ではいくつかの *Streptomyces* 属放線菌もカテコール型シデロフォアである enterobactin を生産することが報告されている (Fiedler *et al.*, 2001).

天然には, このシデロフォアによる鉄の取り込み機構を巧みに利用し, 他の微生物との生存競争に打ち勝とうとする戦略を獲得した仕組みが存在する (Klahn & Bronstrup, 2017). シデロマイシン類として知られる抗生物質の一群は, 抗生物質「弾頭」にシデロフォアが連結する構造を有する. このため細菌が有するシデロフォアの特異的/非特異的トランスポーターを介してシデロマイシン類は細胞内へ輸送されることが示されている. シデロフォアに擬態して, 抗生物質を相手の細胞内に取り込ませるため, 「トロイの木馬」型抗生物質ともいわれる. 天然の「トロイの木馬」機構に着想を得た最近のいくつかの有機合成研究では, シデロフォア「輸送体」を連結することによって, 抗生物質「弾頭」の抗菌活性を増強する効果を明らかにしている (Johnstone & Nolan, 2015). したがって, これら抗生物質 - シデロフォア結合体は, 抗生物質の菌体内輸送機構を強化するために有望な戦略であると考えられている.

Tsukamurella pulmonis TP-B0596 を含むミコール酸含有細菌 (MACB) は広範囲の放線菌に対して効果的に SM 生産を誘導することが示されており, この方法を「複合培養」と呼称している (Onaka *et al.*, 2011). MACB による抗生物質生産の誘導機構は, 物理的な相互作用を始めとして様々な要因を伴った複雑な機構であると考えられるが, この複合培養法を用いて広範囲の放線菌に対して二次代謝産物生産誘導スクリーニングを行ったとき, 複合培養法時特異的な物質生産 (つまり潜在的二次代謝物生産を活性化する現象) が観察され, 新規化合物の発見に成功している (Onaka, 2017). 複合培養法から新規 SM の発見は効果的であることが示されたが, 生態学的な側面における微生物間相互作用の競合的場面を表すような「抗生物質」の探索・発見はこれまで限られていた.

そこで, 本研究では複合培養時に特異的に生産される抗菌性二次代謝産物を探索した.

スクリーニングの過程で, 森林土壌由来 *Streptomyces hygroscopicus* HOK021 は, シデロフォアであるエンテロバクチン (ENT), 脱水 ENT 二量体 (DED), また FabF 阻害剤 Platensimycin (PTM), PTM と DED との縮合体である新規シデロマイシン様抗生物質 (Harundomycin, HDM) を生産することを発見した. これらの化合物の生産は, HOK021 を TP-B0596 と複合培養した場合に特異的に生産された. 本研究では, HDM の単離, 構造決定, シデロフォア活性及び生物活性を報告する.

実験方法

複合培養を用いた抗生物質のスクリーニング

2014 年に北海道富良野市の東京大学北海道演習林で集めた森林土壌から, ISP4 寒天培地を用いたフェノール希釈法により, 59 種の放線菌を単離した. 各放線菌および *T. pulmonis* を, 100 ml の V-22 種培地を含む 500 ml の K-1 フラスコ中でそれぞれ培養した. フラスコを回転振盪機 (200 rpm, 30°C) で振盪し, 放線菌を 3 日間, *T. pulmonis* を 2 日間培養した. 放線菌培養液 3 ml および *T. pulmonis* 培養液 1 ml を同時に 100 ml の A-3M 生産培地を含む 500 ml K-1 フラスコに移し, 回転振盪機 (200 rpm, 30°C, 8 日間) にて培養した. 等量の *n*-ブタノールで全培養液を抽出し, 抽出物を *Bacillus subtilis* に対してペーパーディスク法による抗菌試験を行った.

HOK021 株培養抽出物の分析

HOK021 純粋培養, *T. pulmonis* 純粋培養, それらの複合培養液からの抽出物を超高性能液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化/四重極飛行時間/質量分析法 (UPLC-ESI-QTOF-MS) を用いて分析した. UPLC 装置 (Agilent 1290) 及び ESI-QTOF-MS 装置 (Agilent iFunnel 6550) を代謝産物解析及び化合物同定に用いた. 化合物の粗精製は, ODS 充填剤 (COSMOSIL 75C18-PREP, ナカライ) を用いたオープンカラムにより行った. 化合物の精製は, COSMOSIL AR-II (ナカライ) 及び XTerra (Waters) カラムを用いた HPLC 装置 (Agilent1260) により行った. 化合物の構造決定には, 核磁気共鳴装置 500 MHz NMR (JEOL) 及び 600 MHz NMR (JEOL) を用い, ¹H, ¹³C NMR 及び各種 2 次元 NMR を測定し, 行った.

最少生育阻害濃度

グラム陽性細菌として, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Enterococcus faecalis* ATCC 2921, *E. faecium* ATCC

35667, *E. faecium* ATCC 51299 (VRE 株), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 4330 (MRSA 株) を用いた。グラム陰性細菌として, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 49472, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を用いた。

結 果

抗生物質生産菌の同定

スクリーニングを行った株の中で, HOK021 株は, 複合培養において特異的に抗生物質の生産を示した。したがって, HOK021 と *T. pulmonis* との複合培養物において生産された抗生物質を探索した。HOK021 の部分 16S rDNA は, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *glebosus* (AB184479) の基準株と最も高い類似性 99.6%

(1463/1469) を示したことから, *Streptomyces hygroscopicus* HOK021 と命名した。

複合培養における PTM と ENT の同定

HOK021 純粋培養, *T. pulmonis* 純粋培養, それらの複合培養液からの抽出物を UPLC-ESI-QTOF-MS を用いて分析し, クロマトグラムを比較すると, 複合培養液の抽出物中に多数のピークが出現することが観察された (Fig. 1B)。まず抽出物中の既知化合物を検索したところ, m/z 670.15 $[M+H]^+$ を示すイオンを同定した。推定分子式は, シデロフォア・エンテロバクチン (ENT) (Fig. 1A, 2) と同一の分子式 $C_{30}H_{28}N_3O_{15}$ を示した。 m/z 670.15 $[M+H]^+$ の衝突誘起開裂 (CID) では, 2つの主要なフラグメントイオンピーク, m/z 447.10 および 224.05 をもたらし, これは ENT において報告された値と一致した。ENT の化学構造は, 精製化合物の 1H NMR によ

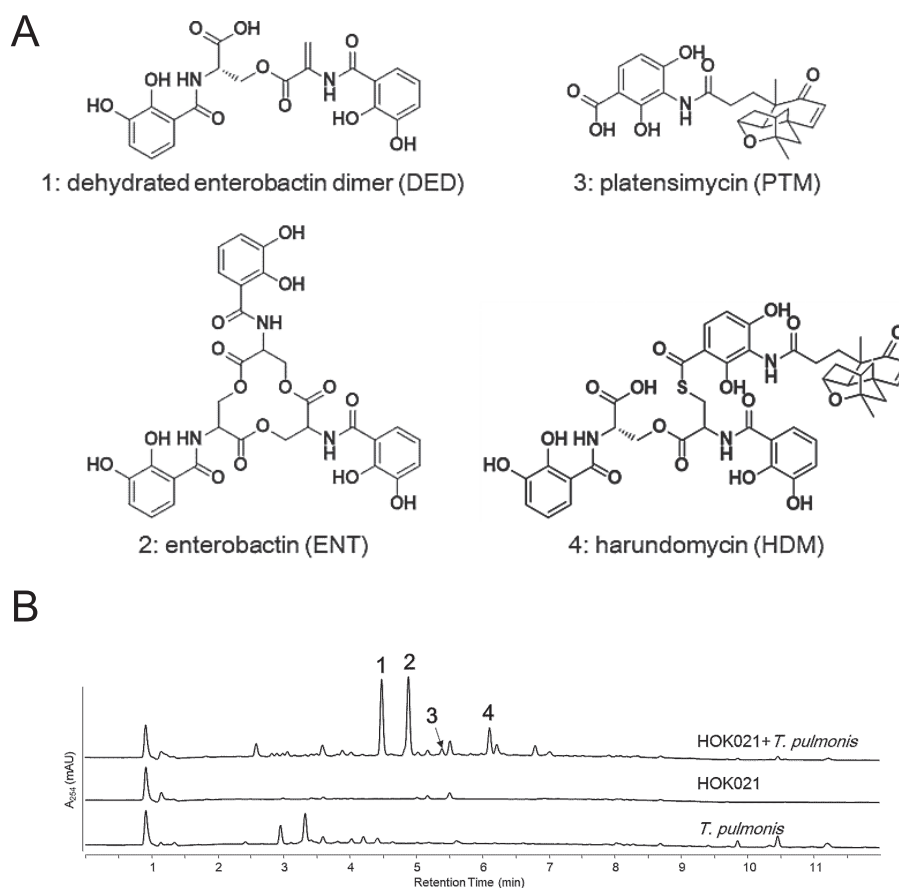


Fig. 1 Chemical structures and HPLC traces of isolated compounds. (A) Chemical structures of dehydrated enterobactin dimer (DED, 1), enterobactin (ENT, 2), platensimycin (PTM, 3), harundomycin (HDM, 4). (B) HPLC traces of HOK021 and *T. pulmonis* combined-culture (top), HOK021 mono-culture (middle), and *T. pulmonis* mono-culture (bottom). Number (1-4) indicated the respective compounds.

でも確認し、ピーク2はENTであると同一した(Fig.1B)。抽出物は抗菌活性を示したことから、抽出物を更に解析したところ、 m/z 442.18 [M+H]⁺を示すイオンピークを見出した。推定された分子式は、FabF阻害剤として知られる抗生物質PTM (Fig.1A, 3) と同一の分子式 $C_{24}H_{27}NO_7$ であった。 m/z 442.18 [M+H]⁺のMS/MS分析では典型的なフラグメントイオンピーク m/z 273.15が存在し、PTMにおいて報告された値と一致した。PTMの化学構造は、精製化合物の¹H NMRによっても確認し、ピーク3はPTMであると同一した (Fig.1B)。

複合培養液中のPTMとENTの未知誘導体

GNPS (Global Natural Products Social) Molecular Networking 分析 (Wang *et al.*, 2016) を利用し、3種類の培養液抽出物に由来する化合物イオンを比較した。培地及び *T. pulmonis* 純粋培養からの抽出物をブランクとし、HOK021 および HOK021 と *T. pulmonis* 複合培養を対照として実施した。

Molecular Networking 解析の結果、PTMの質量イオン m/z 442.18 [M+H]⁺ が、多数の誘導体 (質量イオンが274から1127までの合計20個) と共にクレードを形成していることが示された。分子ネットワークによって同一された親イオンを表す各値について抽出イオンクロマトグラム (EIC) を描画したところ、 m/z 904.26 [M+H]⁺ が最も高い強度を示し、またPTM誘導体としての報告例はなかった (Fig.1B, 4)。そこで、このイオンピークを示す分子について、後述するように精製し、構造決定を行った。またMolecular Networking 解析の結果、ENTの質量イオン m/z 670.15 [M+H]⁺ も、独立したクラスターを形成していることも見出した。分子ネットワークによって同一された親イオンを表す各値についてEICを描画したところ、 m/z 447.10 [M+H]⁺ が最も強い強度を示し、天然由来のENT誘導体としての報告例はなかった (Fig.1B, 1)。そこで、このイオンピークを示す分子について、後述するように精製し、構造決定を行った。

HDMとDEDの精製

新規PTM誘導体 (Fig.1B, 4) および新規ENT誘導体 (Fig.1B, 1) を単離するために、HOK021と *T. pulmonis* の複合培養液を10.8L調製した。培養液を等量の酢酸エチル (EtOAc) で2回抽出し、EtOAc層を真空下で乾燥させて合計8.7gの粗抽出物を得た。EtOAc抽出物を低圧ODSカラムクロマトグラフィーで分離した。得られた画分について、更にフェニルエチルカラム (Cosmosil PE-MS, ナカライ) およびC18カラム (Cosmosil AR-II, ナカライ) を用いたセミ分取逆相HPLCに供した。最終的に、HDM (16.7mg) およびDED (8.6mg) を精製した。

DEDの構造解明

DEDを白色粉末として単離した。HR-ESIMS (m/z 447.1032 [M+H]⁺, $C_{20}H_{19}N_2O_{10}$ の計算値: 447.1034) により分子式は $C_{20}H_{18}N_2O_{10}$ と推定された。DEDはDMSO-*d*₆ 溶媒に溶解し、平面構造は、¹H NMR (500 MHz, JEOL), ¹³C NMR (125 MHz, JEOL), 及びHH-COSY, Rotating frame overhauser effect spectroscopy (ROESY), Heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), Heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) を含む一連の2D NMR分析によって決定した (Fig.2B,C)。DEDの¹³Cおよび¹H NMRデータをTable 1に示した。¹H NMRには、 α -メチンプロトン (δ_H 4.88), エキソメチレンプロトン (δ_H 6.55, 5.80), メチレンプロトン (δ_H 4.64, 4.59), 2つのNHプロトン (δ_H 10.81, 9.21), 6つの芳香族メチン (δ_H 7.37-6.70) が推定された。¹³C NMRには18個の共鳴ピークが観察され、そのうちの2つ (δ_C 148.73, 118.85) については、HMQCおよびHMBC分析から2つの¹³C化学シフトの重複が確認された。その結果、DED予想分子式と一致する20個の共鳴ピークが同一された。¹³C NMRには、4つのカルボニル炭素 (δ_C 170.23-163.15) の存在が示唆され、Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) 135 NMRから2つの二級炭素 (δ_C 109.27, 64.42) の存在が示唆された。またFig.2に示したROESY及びHMBC相関からDEDの平面構造を決定した。

改良Marfey法を用いたDEDの絶対立体化学の決定

DEDの平面構造には1つの不斉中心が存在した。精製したDEDを6N HClを用いて100°Cで14時間、酸加水分解を行い、酸加水分解試料をL-FDLAで処理し、LC-QTOF-MSで分析した。L-FDLA誘導体化L-セリンおよびD-セリンを基準として比較すると、加水分解生成物中のL-FDLA誘導体化セリンはL-セリンと同一の保持時間を示した。この結果から、DEDの絶対立体化学は(S)-立体配位であると決定された (Fig.1A, 1)。

HDMの構造解明

HDMのHRQTOFMS分析から、分子式 $C_{44}H_{45}N_3O_{16}S$ (観測値: m/z 904.2616 [M+H]⁺; 計算値: m/z 904.2593 [M+H]⁺) が推定され、HDMは硫黄原子を含むことを示唆した。HDMをpyridine-*d*₆ 溶媒に溶解し、¹H NMR (500 MHz, JEOL), ¹³C NMR (125 MHz, JEOL) 及びHH-COSY, ROESY, HMQC, HMBCを含む2D NMR分析によって決定した (Fig.2E, F)。HDMの¹³Cおよび¹H NMRデータをTable 2に示した。

PTM部位に関して、化学シフトをPTMの報告値と比較した結果、HDMの部分構造にPTMに保存された

放線菌複合培養液からの抗生物質-シデロフォア連結化合物の発見

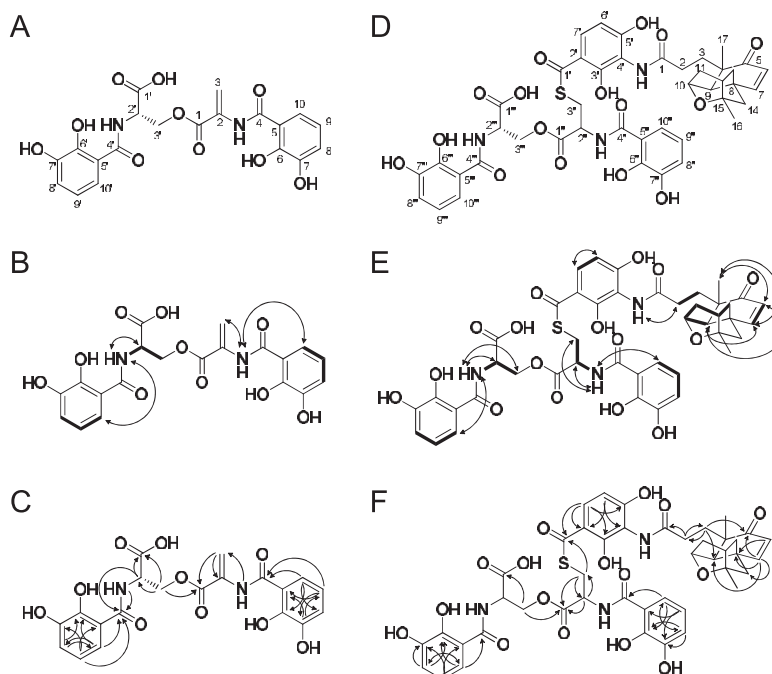


Fig. 2 2D NMR correlation of DED and HDM.

(A) Atom numbering for DED. (B) HH-COSY (thick bond) and ROESY (arrow) correlation of DED. (C) HMBC correlation (arrow) of DED. (D) Atom numbering for HDM. (E) HH-COSY (thick bond) and ROESY (arrow) correlation of HDM. (F) HMBC correlation (arrow) of HDM.

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR assignment for DED

position		DED δ_{C}	DED δ_{H}	δ_{H} (J in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
Dala-DHBA					
1	C $^{\circ}$	163.15			
2	C $^{\circ}$	132.15			
3	CH $_2$	109.27	5.8	s, 1H	1
			6.55	s, 1H	1, 2
4	C $^{\circ}$	164.71			
4a	NH		10.81	br.s, 1H	3
5	C $^{\circ}$	118.48			
6	C $^{\circ}$	146.04			
7	C $^{\circ}$	146.2			
8	CH	118.54	6.97	d, J = 8.0, 1H	6, 10
9	CH	118.85*	6.74	t, J = 8.0, 1H	4, 5, 7
10	CH	120.13	7.37	d, J = 8.0, 1H	4, 6, 8
Ser-DHBA					
1'	C $^{\circ}$	170.23			
2'	CH	51.49	4.88	m, 1H	1', 4'
3'	CH $_2$	64.42	4.59	dd, J = 7.0, 11.5, 1H	2'
			4.64	dd, J = 4.0, 10.51H, 1H	1, 1', 2'
4'	C $^{\circ}$	168.75			
4a'	NH		9.21	br.d, 1H	4'
5'	C $^{\circ}$	115.64			
6'	C $^{\circ}$	148.73**			
7'	C $^{\circ}$	148.73**			
8'	CH	118.85*	6.93	d, J = 8.0, 1H	6', 10'
9'	CH	118.15	6.7	t, J = 8.0, 1H	4', 5', 7'
10'	CH	118.22	7.34	d, J = 8.0, 1H	4', 6', 8'

See figure 2 for atom position numbering. CH $_3$: primary carbon, CH $_2$: secondary carbon, CH: tertiary carbon, C $^{\circ}$: quaternary carbon. #: exchangeable positions.

Table 2 ^1H and ^{13}C NMR assignment for HDM

position		HDM δ_{C}	HDM δ_{H}	δ_{H} (J in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
ketoride					
1	C $^{\circ}$	174.52			
2	CH $_2$	32.04	2.75	m, 1H	1,3
			2.68	m, 1H	1
3	CH $_2$	32.38	2.02	m, 1H	5
			2.66	m, 1H	2,9
4	C $^{\circ}$	47.02			
5	C $^{\circ}$	203.60			
6	CH	127.56	5.94	d, $J = 10.0$, 1H	8
7	CH	154.34	6.37	d, $J = 10.0$, 1H	5,8,9,14
8	C $^{\circ}$	46.46			
9	CH	46.87	2.42	s, 1H	3,4,5,8,10,11,13,14,17
10	CH	76.76	4.46	brs, 1H	8,12,15
11	CH $_2$	41.10	1.8	d, $J = 11.5$, 2H*	10,12, 13, 15
			1.9	m, 1H	9,12,13
12	CH	45.35	2.2	t, $J = 6.5$, 1H	8,10,11,15,16
13	CH $_2$	43.35	1.57	m, 1H	9,11,12
			1.8	d, $J = 11.5$, 2H*	14
14	CH $_2$	55.23	1.48	d, $J = 11.0$, 1H	7,8,9
			1.72	brd, $J = 11.0$, 1H	12,13
15	C $^{\circ}$	87.15			
16	CH $_3$	23.57	1.4	s, 3H	12,14,15
17	CH $_3$	24.79	1.13	s, 3H	3,5,9
1a	-	-	10.39	brs, 1H	
ADHBA					
1'	C $^{\circ}$	194.86(194.69)			
2'	C $^{\circ}$	115.61(115.48)			
3'	C $^{\circ}$	156.79			
4'	C $^{\circ}$	114.09(113.96)			
5'	C $^{\circ}$	160.3			
6'	CH	110.62(110.51)	6.66	d, $J = 9.5$, 1H	2',4'
7'	CH	128.83(128.76)	7.5	*dqf-cosy	1',2',3',5'
Cys-DHBA					
1''	C $^{\circ}$	171.26(171.19)			
2''	CH	53.65	5.42	s, 1H	1'',3''
3''	CH $_2$	30.91(30.98)	3.87	m, 1H	1'', 1'',2''
			4.11	m, 1H	1'', 1'',2''
4''	C $^{\circ}$	170.61(170.51)			
4a''	NH	-	10.31	br, 1H	4''
5''	C $^{\circ}$	117.69(118.03) #			
6''	C $^{\circ}$	150.90*HMBC			
7''	C $^{\circ}$	148.44(148.40)			
8''	CH	120.16	7.25	*dqf-cosy	6'',7'',10''
9''	CH	117.91(117.83) #	6.79	t, $J = 8.0$, 1H	5'',7''
10''	CH	119.47 #	7.89	d, $J = 8.0$, 1H	4'',6'',8''
Ser-DHBA					
1'''	C $^{\circ}$	172.91(172.84)			
2'''	CH	54.03(53.87)	5.6	brs, 1H	
3'''	CH $_2$	66.22(66.34)	5.08	dd, $J = 5.0$, 1H	1'''
			5.22, 5.39	5.22 (m, 1H), 5.39 (m, 1H)*	1'''
4'''	C $^{\circ}$	170.10(170.34)			
4a'''	NH	-	9.98	br, 1H	
5'''	C $^{\circ}$	117.69(118.03) #			
6'''	C $^{\circ}$	150.53*HMBC			
7'''	C $^{\circ}$	148.50(148.48)			
8'''	CH	120.26	7.3	*dqf-cosy	6''', 7''', 10'''
9'''	CH	117.91(117.83) #	6.86	t, $J = 8.0$, 1H	5''', 7'''
10'''	CH	119.47 #	7.95	d, $J = 8.0$, 1H	4''', 6''', 8'''

See figure 2 for atom position numbering. CH $_3$: primary carbon, CH $_2$: secondary carbon, CH: tertiary carbon, C $^{\circ}$: quaternary carbon. (*) assigned based on HSQC or HMBC since overlapped carbon chemical shifts were observed.

化学シフトが観察された。¹H NMRには、2つのメチル(δ_{H} 1.13, 1.40)、5つのメチレン(δ_{H} 1.48-2.75)、2つのオレフィンメチン(δ_{H} 6.37, 5.94)、2つの芳香族メチン(δ_{H} 7.50, 6.66)、オキシメチン(δ_{H} 4.46)、NHプロトン(δ_{H} 10.39)などが存在した。また¹³C NMRには、10個の四級炭素が存在し、ケトン(δ_{C} 203.6)、酸素と結合した sp^3 四級炭素(δ_{C} 87.2)、酸素と結合したオレフィン炭素(δ_{C} 160.3, 156.8)、2つのカルボニル炭素(δ_{C} 174.5, 194.9)などが存在した。最も重要な化学シフトの変化は、3-アミノ-2,4-ジヒドロキシ安息香酸(ADHBA)部位のカルボニル炭素(PTM: δ_{C} 175.2からHDM: δ_{C} 194.8)の¹³C NMRで観察された。この低磁場への化学シフトの変化は、フェノール性カルボン酸がフェノール性チオエステルに変換されたことを示唆した。HH-COSYは、2つのメチレン相関(C2-C3)、*cis*-オレフィン相関(C6-C7)、C9-C13およびオルトカップリング芳香族(C6'-C7')相関の、4カ所の連結部分構造を示した(Fig.2E)。NHのC1カルボニルへのHMBC相関は観察されなかったが、NHのC2メチレンへのROESY相関が観察され、2つの部分構造のアミド結合を介する連結が支持された。これは、PTMに対するアミド結合の切断により生じる、ESI-MSにおけるフラグメントイオン(m/z 273)の検出によっても支持された。C1'カルボニルの化学シフトに違いはあるが、アミド結合を介した五環式ケトライド(Fig.1A, 4 化学構造右上)および3-アミノ-2,4-ジヒドロキシ安息香酸(ADHBA, Fig.1A, 4 化学構造中央上)単位からなるPTM部位の存在が確認された。

ENT二量体部位に関して、推定されたHDMの分子式($\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{S}$)は、24度($1+44-45/2+3/2$)の不飽和を示した。推定された分子式と一致して、¹³C NMRは44個の共鳴を示し、DEPT135 NMRは7個の二級炭素を含む24個の化学シフトを示した。PTM部分は5つの二級炭素を含んでいたため、未知の部分構造には2つの二級炭素を含むことが示唆された。¹H NMRでは、2つのメチレン(δ_{H} 3.87と4.11及び、5.08と5.22)、6つの芳香族メチン(δ_{H} 6.79, 6.86, 7.25, 7.30, 7.89, 7.95)、および2つの非遮蔽 α -メチン(δ_{H} 5.60, 5.42)が観察された。¹³C NMRでは、4つの酸素と結合した四級炭素(δ_{C} 148.4, 148.5, 150.5, 150.9)、および4つのカルボニル炭素(δ_{C} 170.1, 170.6, 171.3, 172.9)を含む10個の非プロトン化炭素が観察された(Table 2)。PTMとENT二量体の連結に関する相関については、C1'カルボニル炭素には、H7'の芳香族メチン、そしてH3''メチレンからのHMBC相関が観察され、各部位の結合が確立された。また推定化学構造に対して、HDMは矛盾のないMS/MSフラグメンテーションパターン; m/z 663, m/z 424, 及び m/z 273を示し、決定したHDM平面化学構

造を支持した。

改良 Marfey 法を用いた HDM の絶対立体化学の決定

改良 Marfey 法を用いて HDM の絶対立体化学に関する分析を行った。HDM を 6N HCl 中で、100°C (14 時間) で酸加水分解を行い、酸加水分解した試料を L-FDLA で処理し、LC-QTOF-MS で分析した。L-Ser と D-Ser の L-FDLA 誘導体をコントロールとしたところ、HDM に存在するセリン残基部位は、L-Ser と同一の保持時間を示した。このことから C2''' の絶対立体配置は (S) であると決定した。一方、FDLA 誘導体化システインは観察されなかった。システインは酸加水分解により酸化システインを形成することが知られており、このことが原因であると考えられた。そこで加水分解したサンプルを $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_2\text{H}$ (100 μL , 9:1) で、3 時間氷上で処理し、安定なシステイン酸にシステインを変換し、 HCO_2H を添加後、真空中で乾燥させた。サンプルを L-FDLA で処理し、L-Cys と D-Cys に由来するシステイン酸の L-FDLA 誘導体をコントロールとし、保持時間を LC-QTOF-MS で比較分析した。HDM のシステイン部位は、L-Cys と D-Cys に由来するシステイン酸と同一保持時間の両方にピークが存在し、ピーク面積値から算出した結果、ほぼ (S):(R)=1:1 の混合物であることが明らかになった (Fig.1A, 4)。

HDM および DED の鉄鉄キレート化活性

エンテロバクチン (ENT) は、グラム陰性細菌にしばしば観られるシデロフォアである。HDM と DED の化学構造には、第二鉄イオン (Fe^{3+}) との錯体形成が知られているカテコール単位が存在した。そこで、単離精製した DED および HDM、また対照としての ENT を用いて、鉄イオン (Fe^{3+}) キレート活性について試験した (Fig.3)。ENT、DED、または HDM を FeCl_3 溶液にインキュベートした。ENT を FeCl_3 溶液中にインキュベーションした結果、 m/z 670.1534 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ から 723.0642 への 52.91 Da のマスシフトをもたらした。これは予想通り、ENT-第二鉄錯体 [$\text{M}-3\text{H}+\text{Fe}^{3+}+\text{H}$]⁺ の形成を示した。しかし、DED または HDM と FeCl_3 とのインキュベーションでは予想外に 66.89 Da シフトを生じた (HDM: m/z 904.2620 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ から 971.1515, DED については m/z 447.1044 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ から 513.9956)。これは FeCl_3 が触媒として反応し、カテコール部位を酸化 (酸素原子添加) したためであることが考えられた。そこで、 FeSO_4 (第一鉄, Fe^{2+}) とのインキュベーションによる錯体形成を調べた。この実験では、化合物-第二鉄錯体 [$\text{M}-3\text{H}+\text{Fe}^{3+}+\text{H}$]⁺ の形成を示す 52.91 Da のマスシフトが HDM 及び DED において観察され、第二鉄錯体を形成することが出来ること

が示された。次いで、キレート活性の強度を Chrome Azurol S (CAS) 比色アッセイを用いて調べた。比較するコントロールとして、ENT および Deferoxamine mesylate を用いた。HDM と DED は Deferoxamine mesylate よりも高い鉄キレート効果を示した。以上の結果から、HDM と DED は第二鉄イオン (Fe^{3+}) と錯体を形成し、キレート活性を有するシデロフォアであることが示された (Fig. 3)。

T. pulmonis または *C. glutamicum* は HOK021 の HDM 産生を誘導した

HDM, PTM, ENT, 及び DED の真の生産菌を調べるために、HOK021 を他のミコール酸含有細菌との複合培養を行った。*C. glutamicum* ATCC 13032 株, *R. opacus* B4 株, *R. erythropolis* PR4 株を試験した。興味深いことに、ENT および DED がミコール酸含有細菌との複合培養において生産されたが、PTM および HDM は、*T. pulmonis* または *C. glutamicum* との複合培養においてのみ生産された。antiSMASH などのバイオインフォマティクスツールを用いて *C. glutamicum* (NC_003450), *R. opacus* (AP011115), *R. erythropolis* (NC_012490) の全ゲノム配列を検索したが、既知の *ptm* と *ent* の BCG は同定できず、PTM と ENT の生産者が HOK021 株であることを支持した。

HDM と PTM の最小生育阻害濃度 (MIC)

PTM は、*Streptomyces platensis* MA7327 株から単離され、MRSA および VRE に対する抗菌活性を示し、また FabF 阻害剤として知られている。HDM は、PTM に

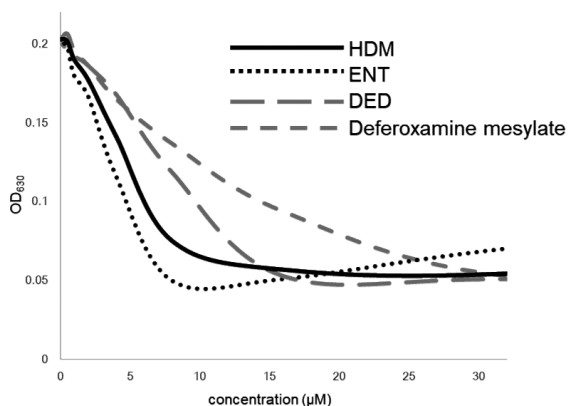


Fig. 3 Chrome Azurol S Assay for HDM and DED. Fe^{3+} chelating activity of HDM (black line), ENT (black dot line), DED (wide gap gray dot line), and deferoxamine mesylate (gray dot line) were compared. Decrease of absorption (OD_{630}) indicate the chelating of ferric iron by the respective test compounds. Experiments were done in $n=3$.

ENT 二量体が連結した構造を有していた。これまでの構造活性相関研究では、PTM の ADHBA 部位のカルボン酸部位が活性に必須であることが示されていた (Rudolf *et al.*, 2017)。一方 HDM では、このカルボン酸部位には ENT 二量体が連結し、これまでの知見では FabH に対する阻害活性、その結果起こる抗菌活性は発揮できないと考えられた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) およびバンコマイシン耐性エンテロコッカス (VRE) に対する HDM の最小生育阻害濃度 (MIC) を測定し、PTM の MIC と比較した (Table 3)。バンコマイシン感受性エンテロコッカス (MIC $16\mu\text{M}$) および VRE (MIC $16\mu\text{M}$)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MIC $32\mu\text{M}$) および MRSA (MIC $16\mu\text{M}$) に対する MIC を比較したところ、HDM は PTM よりも高い MIC を示した。つまり、HDM の生育阻害活性は PTM より低くなっているが、予想外に、失われず維持されていることが明らかになった。一方、鉄欠乏培地 (ID-CAMHB) を用いて MIC を測定したところ、PTM の MIC は 4~16 倍上昇した (Table 3)。しかしながら、HDM の MIC の上昇率は総じて PTM ほどではなく (2 倍程度)、MRSA についてはその抗菌活性は 2 倍程度増加した。また、HeLa 細胞を用いた細胞傷害活性を調べたところ、測定した濃度において、殺細胞活性は示さなかった。

考 察

S. hygroscopicus HOK021 と *T. pulmonis* TP-B0596 との複合培養において、新規な sideromycin 様抗生物質 HDM の産生が、その前駆体である PTM, DED, ENT の生産と共に発見された。

細菌競合により誘導される HOK021 に存在する可能性のある「トロイの木馬」戦略

HDM 化学構造は、PTM 骨格の 3-アミノ-2,4-ジヒドロキシ安息香酸 (ADHBA) 部位のカルボン酸部位に修飾を受けていた。構造活性相関 (SAR) 研究では、カルボキシレートの改変が黄色ブドウ球菌に対する PTM の増殖阻害活性を減少させることを示していた (Rudolf *et al.*, 2017)。これは、PTM カルボキシレートが大腸菌由来の脂肪酸生合成に関与する分子標的 FabF の His340, His303 および触媒 Cys163 残基と直接的に相互作用するためである (Rudolf *et al.*, 2017)。本研究では予想外に、CS 結合により嵩高い ENT 二量体修飾された HDM が MRSA および VRE を含む試験した細菌に対する増殖阻害活性を保持することを示した。しかし、PTM 母核自身の活性を比較すると、試験したすべての細菌でほぼ 2~16 倍活性が減少した。

Table 3 MIC for HDM and PTM in ID-CAMHB

	CAMHB		ID-CAMHB	
	PTM	HDM	PTM	HDM
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051	16	64	128	128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC2921	2	32	16	32
<i>E. faecium</i> ATCC35667	0.5	16	8	32
<i>E. faecalis</i> (VRE) ATCC 51299	4	16	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) ATCC29213	4	32	32	>128
<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC43300	2	16	16	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978	>128	>128	>128	>128
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	>128	>128	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC49472	>128	>128	>128	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>128	>128	>128	>128

MIC were compared based on mole concentration of HDM and PTM (μM). CAMHB: Mueller Hinton Broth (Cation-Adjusted), ID-CAMHB: Iron Depleted-CAMHB.

シデロマイシン類の抗生物質としては、グラム陽性の *Streptomyces* 属放線菌種から、アルボマイシン、サルマイシンおよびフェリマイシン、グラム陰性の *Klebsiella* 属細菌から MccE492 が単離されている (Klahn & Bronstrup, 2017). シデロマイシンに共通する構造的特徴は、シデロフォアと抗生物質が共有結合した分子であることである。シデロフォア部分の連結は、特異的トランスポーターを介して細胞内に能動的に化合物を輸入することにつながる。アルボマイシンでは、ABC型トランスポーター (FhuCGBG) を介して細胞内に輸入した後、細胞内でプロテイナーゼ N 酵素が、ヌクレオシド系抗生物質 SB-217452 とシデロフォア部位を加水分解し、SB-217452 は標的分子であるセリル-tRNA 合成酵素に結合して抗菌活性を発揮する (Pramanik & Braun, 2006)。

したがって、HDM が同様の作用機構を有した場合、鉄制限下において生育阻害活性が増加すると予測した。*Staphylococcus aureus* は、ENT などのカテコール型シデロフォアを生産しないが、SstABCD 遺伝子産物 (ABC型トランスポーター) は *S. aureus* による ENT を含むカテコール型シデロフォアを取り込む機能があることが示されている (Beasley *et al.*, 2011)。鉄欠乏培地 (ID-CAMHB) (Hackel *et al.*, 2017) を用いて、HDM の MIC を試験し、PTM の MIC と比較した。鉄欠乏培地では、PTM の MIC が予想外に増加した (8~16 倍)。一方、HDM の MIC は、わずかに増加した (2 倍) のみであった。PTM 活性の低下は、PTM が静菌的抗生物質であることから、その増殖能が低下したことにより、抗生物質に対する感受性が低下したことが考えられた。この結果は、IDM-CAMHB 培地では HDM の方が PTM よりも *S. aureus* 細胞内に輸送された可能性を示唆している。病原体の宿主細胞は高度に鉄分制限された状態であることが知られている。この結果は、鉄分制限された環境で増殖している病原体をシデロフォア結合体である HDM で治

療する利点をもたらす可能性がある。また、抗菌スペクトルに関し、PTM のものと、HDM のものが良く一致したことから、PTM が抗菌活性を担う分子であることが示唆された。一方、HDM の細胞内への取り込み後、チオエステル結合がどのように切断され、PTM が解離するかについて、酵素的または非酵素的メカニズムを含めて不明であり、今後の解析が必要である。

デヒドロアラニンを含む天然産物

デヒドロアラニンを含むデヒドロアミノ酸構造は、リボソーム合成され翻訳後修飾を受けるペプチド系化合物 (RiPP) などの微生物二次代謝産物で良く見出されている構造である。デヒドロアラニンを酵素的に生成する機構は、ナイシン生合成における NisB (デヒドラターゼ) などにおいてよく研究されている (Ortega *et al.*, 2015)。また、非リボソームペプチド (NRP) にもデヒドロアミノ酸構造は存在するが、デヒドロアミノ酸形成に関する知見はない。さらに、デヒドロアミノ酸は細菌シデロフォアではほとんど見られず、*Halomonas* sp. LOB-5 由来の Loihichelin に存在するデヒドロアラニン (Homann *et al.*, 2009) や、*Teredinibacter turnerae* T7901.52 由来の turnerbactin に存在するデヒドロブチリン (Han *et al.*, 2013) のみである。よって DED におけるデヒドロアラニン構造の形成機構は不明であるが、恐らく ENT の二量体が前駆体となり、セリン残基から変換されると推定される。

HDM 生合成におけるチオエステル結合の形成

PTM および ENT の生合成遺伝子は明らかになっており、その生合成機構も推定されている (Reitz *et al.*, 2017; Rudolf *et al.*, 2017)。HDM を生成するためには、PTM と DED または ENT 二量体との間にチオエステル結合を形成する必要がある。PTM と ENT 二量体が結合した精製 HDM 中のシステイン残基の α -炭素の立体化学は、

S-およびR-立体配置がほぼ1:1の比で存在していた。しかし、HDMのジアステレオマーは試験したカラム条件下で分離できないため、細胞内で変換されたか、抽出/精製プロセス中に生成されたアーティファクトであるか、立体異性が起こる原因は不明である。Platensimycinチオカルボン酸類縁体は、*Streptomyces platensis*の培養物から既に見出されていた(Dong *et al.*, 2016)。チオカルボン酸を含む天然物は、ほとんど発見されていない。*Pseudomonas* sp. 由来のPyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid)、および*Pseudomonas fluorescens* ATCC17400由来のthio-quinolobactinのみであるが、それはチオカルボン酸が不安定で容易に加水分解されるためであると考えられる(Dunbar *et al.*, 2017)。有機合成反応において、 α 、 β -不飽和カルボニル炭素へのチオ酢酸またはチオカルボン酸類を求核基とした1,4-付加反応は、温和な条件でも反応が起こる(Hintermann & Turockin, 2012)。そのことから、HDMの合成では、PTMチオカルボン酸をDED上の α 、 β -不飽和カルボニルに1,4-付加(マイケル付加)することにより、チオエステル結合が形成される可能性が示唆された。

結果のまとめ及び今後の展望

S. hygroscopicus sp. HOK021と*T. pulmonis* TP-B0596を複合培養し、特徴的チオエステル結合によってPTMとDEDが連結された新規シデロマイシン様抗生物質HDMを発見した。HDMにおいてPTMとDEDを連結する生合成機構や、HDMが抗菌活性を発現する作用機構に関して未解明であり、今後の詳細な解析が必要である。

複合培養法により、微生物間の相互作用は、重要な抗菌活性を有する前例のないSMを得るための方法論となり得る大きな可能性を示した。また、これまでに例のない変換反応により新規な複合天然産物を生産できる可能性が示唆された。*Streptomyces*属細菌は、細菌間の競合的な相互作用において、抗生物質をシデロフォアによって偽装するトリックを使用し、土壌マイクロビームにおいて生存を有利にする仕組みを獲得していることを改めて示した。

要 約

Streptomyces hygroscopicus HOK021と*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596の複合培養物から、新規なシデロマイシン様抗生物質が同定された。平面構造および2つの絶対立体化学は、各種機器分析および改良Marfey法に基づいて決定した。同定された化合物は、FabF阻害剤・PTMとシデロフォア・ENTダイマーがC-S結合により

連結された化合物であった。ハランドマイシン(HDM)と命名した本抗生物質は、 Fe^{3+} キレート活性を示した。またHDMは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対して中程度の最小阻害濃度(MIC)を示した。興味深いことに、鉄欠乏培地でのPTMとHDMのMICを比較すると、PTMは生物活性を低下させたが、HDMは増殖阻害活性をほぼ維持した。このことからHDMはシデロフォアを模倣し、細胞内にて切り離されたPTMが増殖阻害剤として作用する可能性が示唆された。HDMは、HOK021株ゲノムに存在するPTM(*ptm*)とENT(*ent*)生合成遺伝子クラスターを含む2つ以上の遺伝子座の活性化によって産生された可能性があり、その後の未同定の連結機構を介し、2つの独立した天然物をチオエステル結合で連結したと考えられた。土壌マイクロビームにおいて細菌は競合的に相互作用する中で、抗生物質の輸送機構を発達させるために進化した可能性があり、複合培養を用いることで既知の二次代謝産物にも、機能的付加価値を加えることが可能であることが示唆された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) A. A. C. Pramana, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka. 2017. Analysis of intergeneric bacteria induced specialized metabolites with antibiosis from soil isolated actinomycetes. The 2nd A3 Foresight Symposium on "Chemical & Synthetic Biology of Natural Products", May 24th, Jeju, Korea.
- 2) A. A. C. Pramana, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka. 2017. Analysis of combined-culture induced specialized metabolites with antibiosis from *Streptomyces* sp. HOK021. 第32回日本放線菌学会大会. 9月7-8日, 長野.
- 3) A. A. C. Pramana, S. Kawai, M. Kato, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Suzuki, Y. Arakawa, H. Onaka. 2018. Discovery of a new antibiotic-siderophore hybrid compound from combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*. 2018年度日本農芸化学会大会. 3月15-18日, 名古屋.
- 4) 浅水俊平, 尾仲宏康. 2018. 異属細菌間の相互作用がもたらす放線菌特殊代謝. 2018年度日本農芸化学会大会. 3月15-18日, 名古屋.

原著論文

- 1) S. Asamizu, A. A. C. Pramana, S. Kawai, Y. Sugai, Y. Arakawa, H. Onaka. (Manuscript in preparation)

謝 辞

本研究において主要な実験(活性物質スクリーニング, 大量培養及び化合物精製)は東京大学大学院農学生命科学研究科のアプロリアグスチャヤマナ氏(2016年4月~2018年3月まで修士学生)により行われた。薬剤

耐性菌の最小生育阻害濃度に関する実験はトヨタ紡織株式会社 基礎研究所の河合盛進氏及び名古屋大学医学研究科の荒川宜親教授との共同研究により行った。この場をお借りし深く感謝いたします。

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金（平成24年10月～29年9月）により行われた。また本研究の一部は科研費基盤研究B（尾仲宏康 25292046）、科研費若手研究B（浅水俊平 16K18673）による研究助成により行われた。

文 献

- Beasley, F.C., Marolda, C.L., Cheung, J., Buac, S. & Heinrichs, D.E. 2011. *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infect. Immun.* **79**: 2345-2355.
- Dong, L.B., Rudolf, J.D. & Shen, B. 2016. Antibacterial sulfur-containing platensimycin and platencin congeners from *Streptomyces platensis* SB12029. *Bioorg. Med. Chem.* **24**: 6348-6353.
- Dunbar, K.L., Scharf, D.H., Litomska, A. & Hertweck, C. 2017. Enzymatic carbon-sulfur bond formation in natural product biosynthesis. *Chem. Rev.* **117**: 5521-5577.
- Fiedler, H.P., Krastel, P., Muller, J., Gebhardt, K. & Zeeck, A. 2001. Enterobactin: the characteristic catecholate siderophore of *Enterobacteriaceae* is produced by *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 147-151.
- Hackel, M.A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J.A. & Sahn, D.F. 2017. In vitro activity of the siderophore cephalosporin, cefiderocol, against a recent collection of clinically relevant Gram-negative bacilli from North America and Europe, including carbapenem-nonsusceptible Isolates (SIDERO-WT-2014 Study). *Antimicrob. Agents. Chemother.* **61**: e00093.
- Han, A.W., Sandy, M., Fishman, B., Trindade-Silva, A.E., Soares, C.A., Distel, D.L., Butler, A. & Haygood, M.G. 2013. Turnerbactin, a novel triscatecholate siderophore from the shipworm endosymbiont *Teredinibacter turnerae* T7901. *PLoS One* **8**: e76151.
- Hintermann, L. & Turockin, A. 2012. Reversible generation of metastable enols in the 1,4-addition of thioacetic acid to alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **77**: 11345-11348.
- Homann, V.V., Sandy, M., Tincu, J.A., Templeton, A.S., Tebo, B.M. & Butler, A. 2009. Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. *J. Nat. Prod.* **72**: 884-888.
- Johnstone, T.C. & Nolan, E.M. 2015. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans.* **44**: 6320-6339.
- Klahn, P. & Bronstrup, M. 2017. Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials. *Nat. Prod. Rep.* **34**: 832-885.
- Onaka, H. 2017. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)* **70**: 865-870.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400-406.
- Ortega, M.A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M.C., van der Donk, W.A. & Nair, S.K. 2015. Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature* **517**: 509-512.
- Pramanik, A. & Braun, V. 2006. Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* **188**: 3878-3886.
- Reitz, Z.L., Sandy, M. & Butler, A. 2017. Biosynthetic considerations of triscatechol siderophores framed on serine and threonine macrolactone scaffolds. *Metallomics* **9**: 824-839.
- Rudolf, J.D., Dong, L.B. & Shen, B. 2017. Platensimycin and platencin: inspirations for chemistry, biology, enzymology, and medicine. *Biochem. Pharmacol.* **133**: 139-151.
- Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C. & Kolter, R. 2013. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *MBio* **4**: e00459.
- Urem, M., Swiatek-Polatyńska, M.A., Rigali, S. & van Wezel, G.P. 2016. Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* **102**: 183-195.
- van der Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I. & van Wezel, G.P. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 392-416.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.T., Crusemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderon, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.C., Yang, Y.L., Humpf, H.U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., P. C.A.B., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarquo, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodriguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.M., Phapale, P., Nothias, L.F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Muller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.O., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutierrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. & Bandeira, N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **34**: 828-837.

ゴードスポリン作用機構の解析

尾崎 太郎¹⁾, 菅井 佳宜, 浅水 俊平, 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
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Goadsporin, a specific inhibitor of actinomycetal signal recognition particle.

Taro Ozaki¹⁾, Yoshinori Sugai, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential, Department of Biotechnology,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Goadsporin (GS) is a secondary metabolite produced by *Streptomyces* sp. TP-A0584. This compound activates secondary metabolism and induces sporulation of various actinomycetes. At higher concentrations, GS also exhibits growth inhibition activity. GS is active only against actinomycetes and does not exhibit these activities against other bacteria. Despite these unique characteristics, the molecular target of GS had not previously been identified. In the present study, we identified that GS interacted with Ffh, a proteinaceous component of the bacterial signal recognition particle (SRP). GS inhibited the recognition of signal peptide, resulting in a disturbance of protein secretion. We also revealed that GS interacted with Ffhs derived from pathogenic actinomycetes, suggesting that GS potentially inhibited the growth of these bacteria. To the best of our knowledge, GS is the first small molecule that inhibits the function of SRP. GS would be an attractive scaffold for future development of novel biologically active peptides.

Key words: goadsporin, signal recognition particle, antibiotics, protein secretion, signal peptide

緒 言

ゴードスポリン (goadsporin; GS) は *Streptomyces* sp. TP-0584 の二次代謝産物であり, *Streptomyces lividans* TK23 の色素生産・形態分化の誘導を指標に単離された化合物である (Onaka *et al.*, 2001) GS は 19 残基の直鎖ペプチドであり, 構造中に含窒素芳香環であるアゾールや, デヒドロアラニンを複数含む特徴的な構造を有している (Fig. 1A; Igarashi *et al.*, 2001). 本化合物は, *S. lividans* 以外にも様々な放線菌に対して活性を示し, 1 μ M 程度の低濃度では色素などの二次代謝産物の生産や放線菌の形態分化を誘導する. *Streptomyces* 属放線菌のゲノム上には通常 30 個以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在するが (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008), 実際に培養を行って

もそれらのごく一部に由来する代謝産物しか同定されない. それ以外の遺伝子クラスターは休眠状態にあると考えられるが, 生物活性を有する低分子化合物が数多く潜在する有用な遺伝子資源だと考えられる. そのため, RNA ポリメラーゼやリボソームタンパク質の変異株の利用 (Hosaka *et al.*, 2009) や, 汎用宿主を利用した異種発現 (Komatsu *et al.*, 2010) などが広く試みられている. GS のように広い作用スペクトルを示す化合物によって潜在的な二次代謝を活性化することができれば, 新規天然物の探索において有用な手法になりうると期待される. また, GS は, 高濃度では放線菌の生育を阻害することも知られており, 抗生物質としての利用も期待される. しかしながら, GS の分子標的は明らかにされておらず, 作用機構に関する研究は進展してこなかった.

GS の生合成遺伝子クラスターのクローニングによって, 10 遺伝子からなる *god* 遺伝子群が同定された (Fig. 1B, Onaka *et al.*, 2005). その一つである *godI* 遺伝子は, 遺伝子破壊と異種発現実験から, 生合成酵素をコードするのではなく, 生産菌における自己耐性遺伝子であ

¹⁾現北海道大学理学研究院

E-mail: 尾崎太郎: ozaki@sci.hokudai.ac.jp

尾仲宏康: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

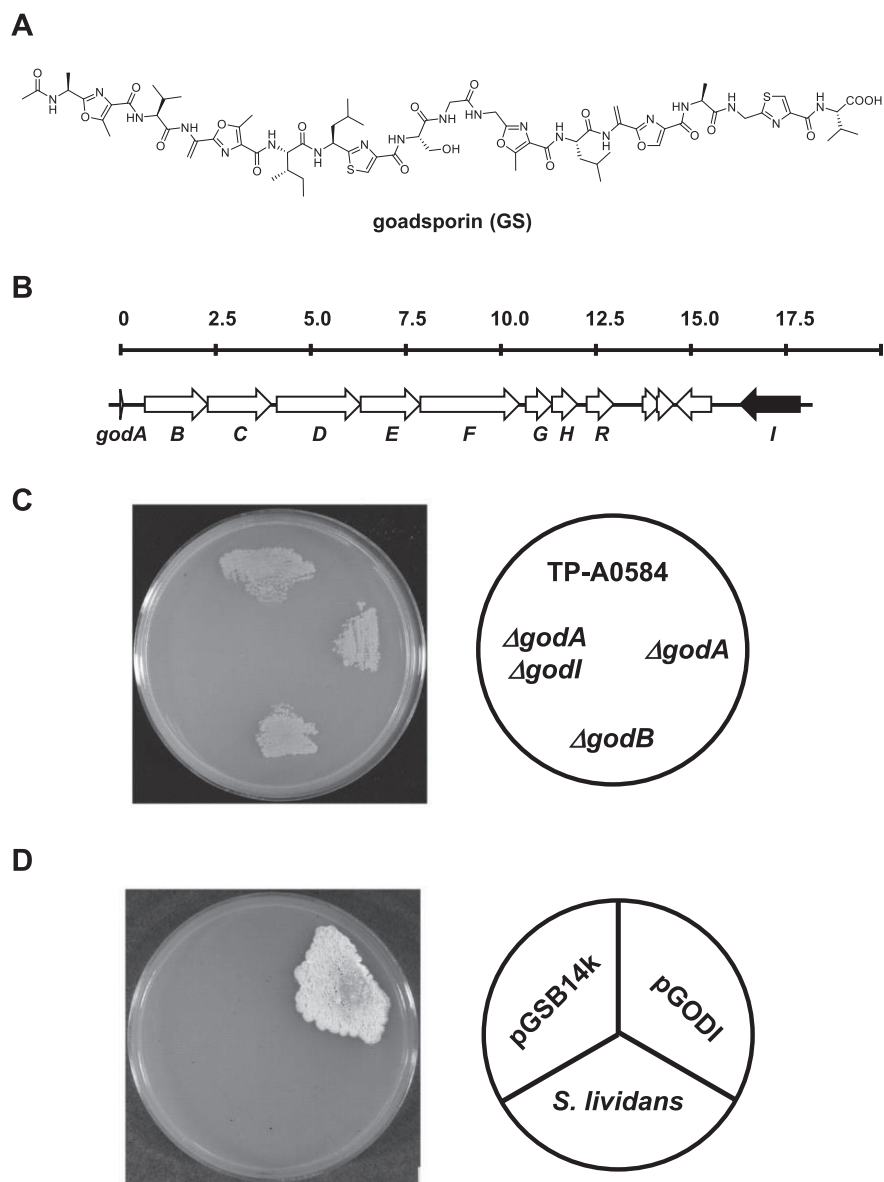


Fig. 1 Properties of goadsporin (GS). **A.** Structure of goadsporin. **B.** Biosynthetic gene cluster of GS. **C.** Analysis of GS sensitivity of producing strain and its deletion mutants. Producing strain (TP-A0584), $\Delta godA$, and $\Delta godB$ strains can grow on the Bennett's agar plate containing GS ($7 \mu\text{g ml}^{-1}$). $\Delta godA \Delta godI$ strain are sensitive to GS and cannot grow on the same plate. **D.** Analysis of GS sensitivity of *Streptomyces lividans* and its transformant harboring pGODI and pGSB14K. pGODI is a plasmid that contains *godI* under the *ermE** promoter. pGSB14K is a cosmid that contains the genetic regions from *godA* to *godR*. Only the transformant harboring pGODI shows GS resistance on the same plate in Fig. 1C.

ることが明らかにされた。TP-A0584株において *godI* 遺伝子を欠失させると、本菌株はGSに感受性を示すようになる (Fig. 1C)。また、GS感受性の *S. lividans* TK23を宿主として *godI* 遺伝子を異種発現すると、本菌株はGS耐性を獲得する (Fig. 1D)。 *godI* はシグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle: SRP) の構成タンパク

質である Ffh をコードしている。SRP はタンパク質の分泌・細胞内局在化に関与するタンパク質・RNA 複合体であり、生物に普遍的に保存されている (Saraogi *et al.*, 2011)。分泌タンパク質の翻訳過程で、シグナルペプチドがリボソームから出現してくると SRP はこれを結合し、SRP 受容体との相互作用を介して新生タンパク質-

ゴードスポリン作用機構の解析

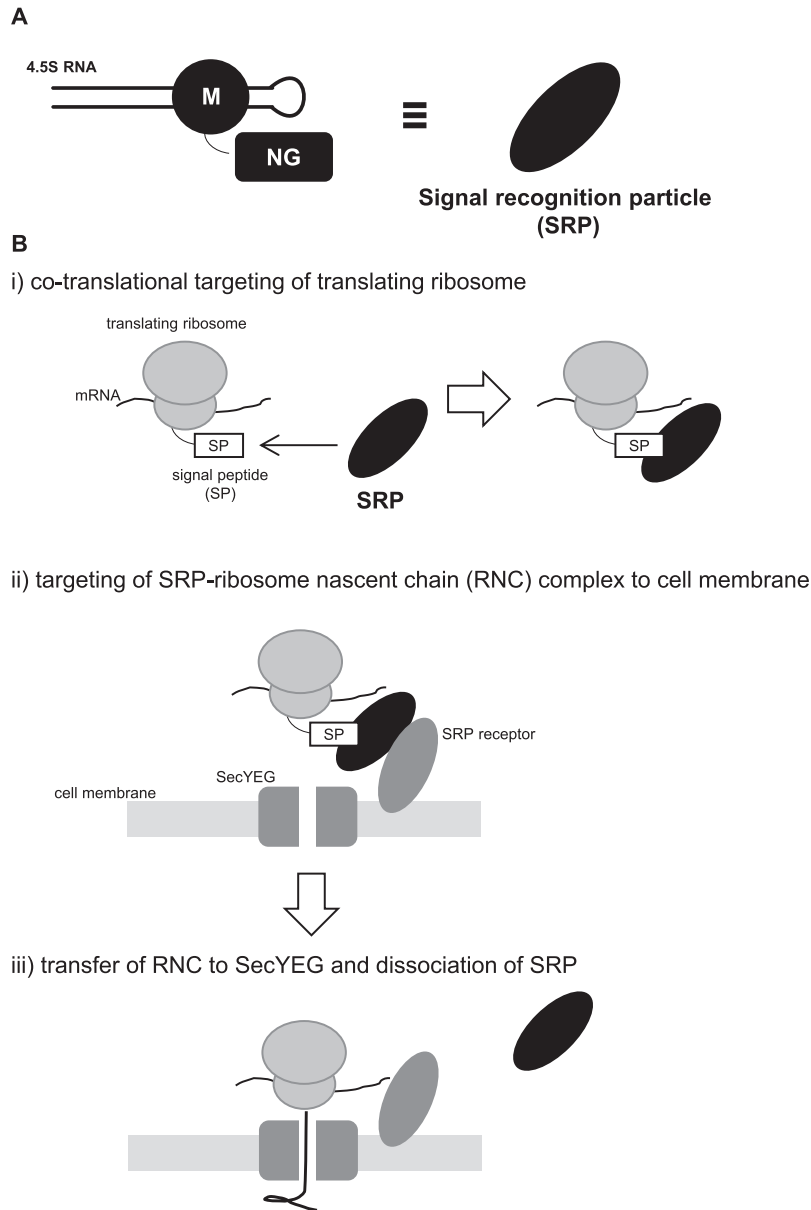


Fig.2 Schematic representation of bacterial signal recognition particle (SRP). **A.** Bacterial SRP consists of 4.5S RNA and Ffh, which has N, G, and M domains. M domain is responsible for the interaction with 4.5S RNA and signal peptide (SP). **B.** The role of SRP during co-translational protein targeting. (i) SRP interacts with SPs when it appears during translation. (ii) SRP-ribosome nascent chain (RNC) complex are then targeted to cell membrane via interaction between SRP and SRP receptor. (iii) SP is released from SRP and transferred to SecYEG. SRP dissociates from its receptor that is triggered by the hydrolysis of GTP.

リボソーム複合体を小胞体膜や細胞膜上へと誘導する (Fig.2). 真核生物のSRPにおいては、複数のタンパク質がRNAと複合体を作ることが知られているが、このうちSRP54がシグナルペプチドの結合タンパク質であり、機能の中枢を担う。原核生物のSRPはより単純な構成であることが知られており、RNAとSRP54ホモロ

グであるFfh (fifty four homolog) を主要な構成要素とする。Ffhは3つのドメインから構成されることが知られており、それぞれNドメイン、Gドメイン、Mドメインと呼ばれている。N・Gドメインは細胞膜上に存在するSRP受容体と相互作用する領域であり、Mドメインはシグナルペプチドの認識ドメインである。放線菌に

においても, *S. lividans* の SRP が, 同定されている (Palacin *et al.*, 2003). Ffh と通常放線菌は *ffh* 遺伝子を 1 コピーしか持たないが, TP-A0584 株は *godI* 以外にも *ffh* 遺伝子を 1 コピー有していた. このことから, GS が Ffh を標的として作用することが示唆されていた. これまでに Ffh を標的とする薬剤は知られていない. そのため, GS の作用機序を明らかにすることで, 将来的には SRP を標的とした新規抗生物質の開発が可能になると期待される. そこで本研究では, GS 作用機構の解明を目的として研究を行った.

実験方法

ピアコアを用いた表面プラズモン共鳴の観測による相互作用の解析

大腸菌発現用に最適化した遺伝子配列を設計, 合成した. *godI* および *ffh* 遺伝子を PCR で増幅後 (それぞれプライマー No. 1 と 2 及び No. 3 と 4 を使用. Table 1), pET26b(+) ベクターにクローニングし, 大腸菌 BL21 (DE3) 株を宿主として, 定法に従いヒスチジンタグ付き組換えタンパク質を調製した. この際, 各遺伝子のコドンの使用頻度を大腸菌に最適化した合成遺伝子 (GENEWIZ 社) を用いた. 各タンパク質は Ni-NTA カラム, 陽イオン交換カラム (SP Sepharose High Performance, 16 x 180 mm, GE ヘルスケア) を用いて, SDS-PAGE 上で単一のバン

ドになるまで精製した.

得られた組換えタンパク質をセンサーチップ CM-5 にアミンカップリング法を用いて固定化した. Biacore T-200 (GE ヘルスケア) を用いて GS との相互作用を解析した. 相互作用解析は, HBS-P バッファー (+2.5 % DMSO) を流速 $30 \mu\text{l min}^{-1}$ で用いて 25°C で行った. タンパク質を固定化していないフローセルを対照として分析を行った. この際, GS の終濃度が, 0.8, 4, 8, 20, 40, 100, 200, 1000 nM となるようにアナライト溶液 (HBS-P バッファー (+2.5 % DMSO)) を調製した. GsFfh を用いた際は, 10 mM Gly-HCl (pH 1.0) を 1 分間送液して, センサーチップ表面を再生した. 解析終了後, BIA evaluation software を用いて 1:1 結合モデルにセンサーグラムをフィッティングし, K_D 値を算出した.

ドメインスワッピングによる相互作用部位の解析

GsFfh と GodI のキメラタンパク質遺伝子をギブソンアセンブリー法により構築した. GsFfh の NG ドメイン (1—888 塩基, M1—R296, プライマー No. 7 及び No. 8) GodI の M ドメイン領域 (889—1557 塩基, I297—L519, プライマー No. 5 及び No. 6) 及び pUC19 (プライマー No. 9 及び No. 10) をそれぞれ PCR により増幅した. 増幅した DNA 断片をアッセンブリー反応に供した. 反応産物を用いて *E. coli* DH5 α を形質転換し, 形質転換体から目的プラスミドを調製した. 配列を確認した後,

Table 1 Oligonucleotides used in this study.

No.	Name	Sequence (5' to 3')
1	godIFw-NdeI	GGG <u>CATATG</u> TCGATACCCTGTCGGACCG (NdeI)
2	godI26Rv-XhoI	GGGCTCGAGCAGCAGGTCTTTGAATTCCTG (XhoI)
3	ffhFw-NdeI	GGGCATATGTTTCGATACCCTGAGTGACCGC(NdeI)
4	ffh26Rv-XhoI	GGGCTCGAGACGCATGAATTTTTTAAATTC (XhoI)
5	GodI-M-Fw	ACCGCATGGCGTCCCGCATCCTCGGCATGGGTGACGTGC
6	GodI-M-Rv	GGTCGACTCTAGAGGATCCAAGCTTCTACAGCAGGTCCTTGAAC
7	Ffh-NG-Fw	GTACCCGGGGATCCTCTAGACATATGTTTCGATACCCTCTC
8	Ffh-NG-R	GCACGTCACCCATGCCGAGGATGCCGGACGCCATGCCG
9	pUC19-F	AGGACCTGCTGTAGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTGCAG
10	pUC19-R	TCGGAGAGGGTATCGAACATATGGGATCCCCGGGTACCGAG
11	Ffh-A142T-F	GAGCGGTTCTTCGAGACGCGCAAGATGATGTGC
12	Ffh-A142T-R	CGACATCATCTTGC GCGTCTCGAAGAACCCTC
13	Ffh-LPGdel-F	GCGCAGGGCGCGGCATGCCGGGCATCCCCG
14	Ffh-LPGdel-R	CGGGATGCCCGGCATGCCCGGCCCTGCGC

pTYM1ep ベクター (Onaka *et al.*, 2005) にサブクローニングし、接合法を用いて *S. lividans* TK23 に導入した。また、*ffh* 遺伝子への部位特異的変異は、アジレント・テクノロジー社の QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて定法に従って行った。A142T 変異の導入にはプライマー No.11 と No. 12 を、LPG 欠損変異にはプライマー No. 13 と No. 14 を用いた。

目的のプラスミドを構築後、接合法を用いて各遺伝子を *S. lividans* TK23 に導入した。得られた形質転換体を培養し、胞子懸濁液として回収した後、1 スポット当たり約 1,000 細胞となるよう希釈し、Fig.2B のようにベネット寒天培地に植菌した。30℃ で 4 日間培養したのち、各形質転換体の生育を確認した。

GS による蛋白質の菌体外分泌阻害試験

S. lividans TK23 株を SL-glycerol 培地 (Berka *et al.*, 1996) に接種し、30℃ で 2 日間培養した。この際、GS を終濃度 0, 0.3, 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ となるように添加した。培養終了後、培養上清を回収し、トリクロロ酢酸で処理し、得られた沈殿画分を SDS-PAGE で分析した。

ピアコアによる Sti1 シグナルペプチド、Ffh の相互作用解析と GS による阻害試験

Sti1 シグナルペプチド (MRNTARWAATLGLTATAVC GPLAGASLA) を固相合成により、調製した (ライフテイン社)。シグナルペプチドをアミンカップリング法を用いてセンサーチップ CM5 に固定化した。未処理のフローセルに blank immobilization を行い、対照として用いた。アナライト溶液は 100nM GsFfh あるいは GodI

を用いた。各アナライト溶液を送液する前に、異なる濃度の GS と混合し、4℃ で 3 分間インキュベートした。各サイクルの終了後に、10mM Gly-HCl (pH1.0) を 1 分間送液して、センサーチップ表面を再生した。分析およびデータの解析は、前述の方法に従った。

病原性放線菌由来 SRP との相互作用解析

結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, およびジフテリア菌 *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 13129 の Ffh [MtFfh (accession No. NP_217432) および CdFfh (accession No. CAE50059)] を、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、合成 DNA を調製した。なお、合成 DNA の設計と調製は、GENEWIZ 社に依頼した。各遺伝子断片を pET26b(+) にサブクローニングし、大腸菌 BL21 株を宿主として組換えタンパク質を調製した。上記と同様の方法で表面プラズモン共鳴を測定し、 K_D 値を算出した。

結果および考察

表面プラズモン共鳴を用いた GS と Ffh の相互作用解析

ピアコア T-200 を用いて SPR シグナルを観測し、GsFfh および GodI と GS の相互作用を解析した。GsFfh をリガンドとしてセンサーチップに固定化し、GS をアナライトとして分析を行った。GS を 0.8nM から 1,000nM の範囲で調製してフローセルに送液し、相互作用を解析した。その結果、GS 濃度の上昇に応じて、レスポンス値が上昇することが分かった (Fig.3A)。一方、GS 耐性タンパク質である GodI をセンサーチップに固定化した

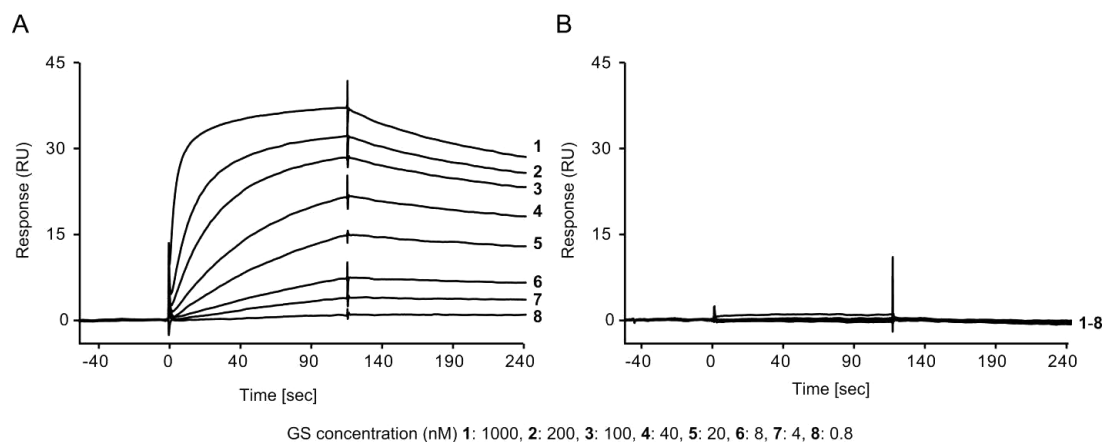


Fig. 3 Surface plasmon resonance (SPR) analysis showing the interaction between GS and either of GsFfh or GodI. **A.** Biacore sensorgrams showing the interaction between GsFfh and GS. **B.** Biacore sensorgrams analyzing the interaction between GodI and GS. Up to 1,000nM of GS, GodI did not show detectable interaction.

場合, GS濃度を1,000nMまで上昇させてもセンサーグラムの上昇は観測されなかった (Fig.3B). このことから, GSはGsFfhと特異的に相互作用することが明らかになった. GsFfhとGSが1:1のモル比で結合することを仮定してフィッティングを行い, GsFfhに対するGSの K_D 値を7nMと算出した. センサーグラムの形状からもGSが緩やかに解離していることがわかり, GsFfhとGSの相互作用が強固なものであることが示唆された.

ドメインスワッピングによる相互作用部位の解析

一般的に, FfhはN末端側からNドメイン, Gドメイン, Mドメインの3種のドメインから構成されることが知られている. このうち, 最もC末端側に位置するMドメインがシグナルペプチドの認識ドメインであることが知られている (Saraogi *et al.*, 2013). GsFfh, GodI, および放線菌由来Ffhのアミノ酸配列を比較したところ, GodIに特異的な残基としてMドメイン中に存在する426番目のスレオニン残基を見出すことができた (Fig.4). 他の放線菌由来のFfhにおいてはこの残基はアラニンとして保存されている. また, 多くの原核生物由来のFfhにおいて, この位置はメチオニン残基として保存されている. シグナルペプチドとの複合体結晶構造が報告されている *Sulfolobus solfataricus* 由来のSRP54の結晶構造において, このメチオニン残基はシグナルペプチドの結合部位を構成する残基の一つとして知られている (Janda *et al.* 2010). これらのことから, GSがMドメインを標的として作用すること, およびGodIにおいてMドメインのアミノ酸残基の変異がGS耐性化に重要であると仮説を立て, 検証することとした.

初めに, GsFfhのMドメインをGodIのMドメインに置換したキメラタンパク質Ffh(NG)-GodI(M)をコードした変異遺伝子を構築し, *S. lividans* TK23へ導入した. 得られた形質転換体のGS感受性を試験したところ, *godI*導入株と同程度のGS耐性を示すことが分かった (Fig.5, lane 6). このことから, GodIのMドメインがGS耐性化に寄与することが明らかとなった. 次に, FfhにおいてA426T変異を導入したところ, わずかにGS耐性を示すようになった (Fig.5, lane 4). このことから, アラニン残基がスレオニンへと置換することがGS耐性化に寄与することが分かった. ただし, GodI導入株と比較すると耐性が弱いため, この変異のみで耐性化を全て説明することはできず, 他の残基の変異による寄与もあると考えられる.

GSはSRPによるシグナルペプチドの結合を阻害する

GSがFfhのMドメインを標的とすることが示唆されたため, 本化合物がタンパク質の分泌を阻害していると

推測した. そこで, *S. lividans* TK23株培養液にGSを添加して培養したのち, 培養上清に存在するタンパク質をSDS-PAGEを用いて分析した. その結果, 分子量約9kDaのタンパク質がGS存在下で消失することが明らかとなった (Fig.6). タンパク質をPVDF膜に転写後, プロテインシーケンサでN末端のアミノ酸配列を解析した結果, 本タンパク質がSti1であることが明らかとなった. Sti1はプロテアーゼとして知られるサブチリシンの阻害剤であり, このタンパク質が*S. lividans*の培養上清に検出されることが既に報告されている (Strickler *et al.*, 1992). また, 本タンパク質の分泌はSRPに依存したものであると考えられている (Schaerlaekens *et al.*, 2001; Keersmaeker *et al.*, 2006). そこで, 本タンパク質のN末端に存在するシグナルペプチドとGsFfh, GodIの相互作用を解析することとした.

Sti1のシグナルペプチドとFfhの相互作用, およびGSによる阻害効果を検証した. Sti1シグナルペプチドを化学合成し, センサーチップCM-5に固定化した. FfhおよびGodIをアナライトとして分析したところ, どちらのタンパク質も濃度依存的にセンサーグラムが上昇することが分かった (Fig.7AB). それぞれのSti1シグナルペプチドに対する K_D 値を算出したところ, GsFfhの K_D 値が11nM, GodIの K_D 値が18nMと同程度の値が算出された. このことから, 両タンパク質がどちらもFfhとして機能していることが強く示唆された.

次にGSによる阻害効果を検証した. アナライト溶液 (GsFfhあるいはGodI) にあらかじめGSを添加してインキュベートした後, 同様にフローセルに送液し, SPRを測定した. その結果, GsFfhとSti1の相互作用はGS存在下で濃度依存的に減少し, 100nMの濃度で完全に阻害されることが分かった (Fig.7C). このことから, GSがシグナルペプチドの結合を阻害していることが示唆された. 一方で, GodIには阻害が見られないことから (Fig.7D), GS存在下でもGodIはシグナルペプチドを結合できることが示唆された. そのため, GS存在下でGodIがFfhの代わりに機能することで耐性が発揮されると考えられる.

病原菌由来FfhとGSの相互作用

GSは放線菌に対して特異的に活性を示す薬剤である. これは, 放線菌由来のFfhと他の生物種 (原核微生物) のFfhの構造の違いに起因すると考えた. 既に述べたように, 放線菌のFfhにおいてはシグナルペプチドに近接する残基がアラニンとして保存されており, メチオニン残基が保存されている他の原核生物由来のFfhとは配列が異なる. GodIではこの残基がスレオニンに置換されることが耐性に重要であった. このことから, 同じ部位

ゴドスポリン作用機構の解析

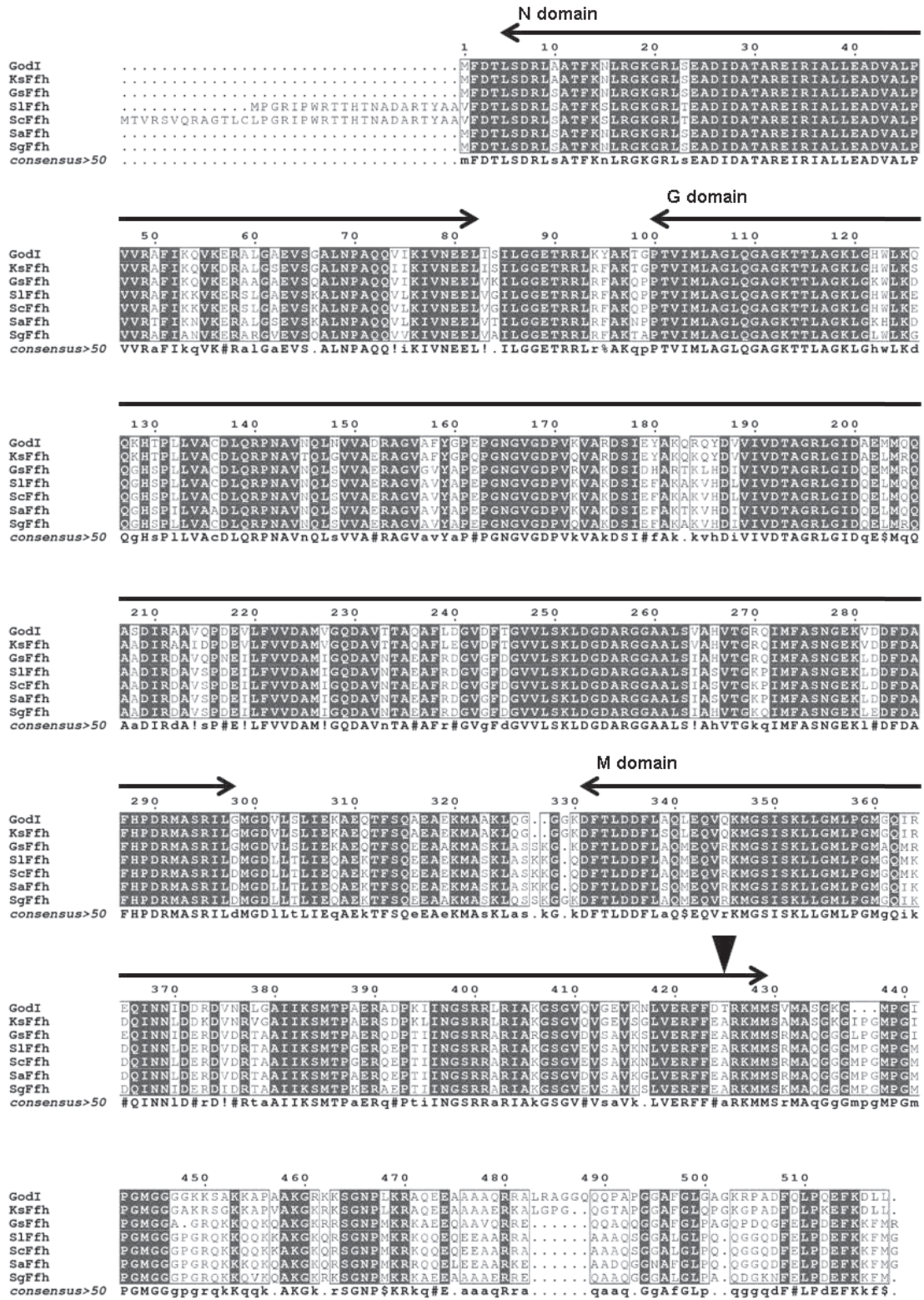


Fig. 4 Amino acid sequence alignment GodI and Ffhs of actinomycetes. The regions coding N, G, M domains predicted by Pfam are shown by arrows. The position of 425T of GodI are shown by black rectangle. KsFfh: *Kitasatospora setae* KM-6054; SlFfh: *Streptomyces lividans* TK24; ScFfh: *Streptomyces coelicolor* A3(2); SaFfh: *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893; SgFfh: *Streptomyces griseus* NBRC13350.

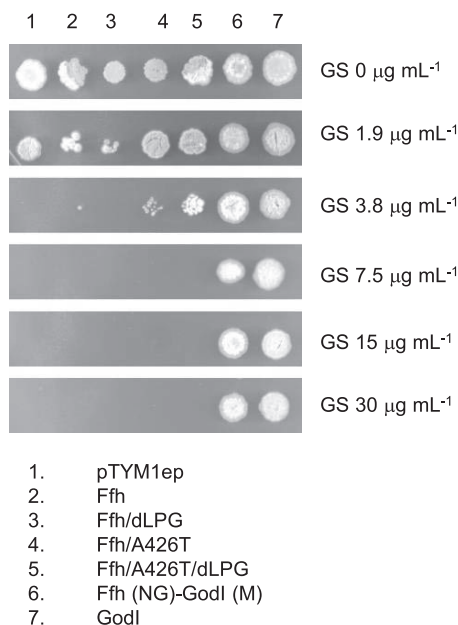
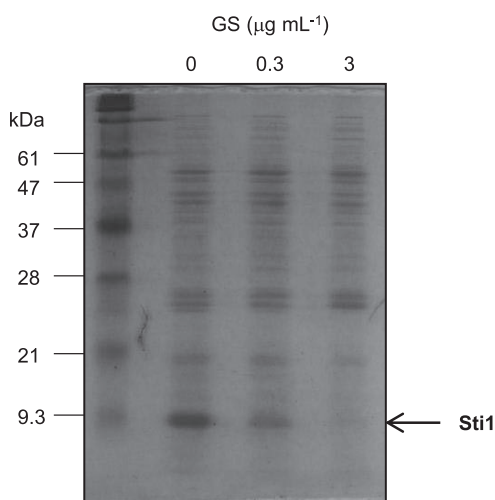


Fig. 5 Growth test of the transformants harboring Ffh variants on the GS-containing plates. *S. lividans* TK23 harboring *Gsffh*, *godI*, or *GsFfh* mutants were grown on the plates containing various concentrations of GS (0 to 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The transformant harboring pTYM1ep (empty vector) was used as a control strain. The results showed that M domain of GodI is sufficient for the GS resistance. Site directed mutagenesis of A426T and deletion of LPG contributed to GS resistance, but other mutation would also be required because the transformant still could not grow on the plates containing GS at the concentrations above 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

がアラニン残基となっている Ffh であれば GS によって阻害されると考えられる。公開データベースに登録されている Ffh の配列を精査した結果、*Streptomyces* 属や近縁の放線菌以外に、広義の放線菌 (actinobacteria) に含まれる微生物の Ffh においてもこの部位がアラニンとして保存されていることを見出した。そこで、GS がそれらの Ffh も標的として活性を示すと考え、結核菌 *M. tuberculosis*、およびジフテリア菌 *C. diphtheriae* の Ffh (MtFfh、および CdFfh) に対する相互作用を検証した。

各 *ffh* 遺伝子を大腸菌配列用に最適化した合成 DNA として設計し、大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) 株を宿主として組換えタンパク質を調製した。Biacore T-200 を用いて前述と同様の方法で相互作用を解析したところ、MtFfh に対する GS の K_D 値が 31 nM、CdFfh に対する K_D 値が 372 nM であることが分かった (Fig. 8)。このことから、GS がこれらの病原菌に対しても活性を有する可能性が示された。ただし、 K_D 値が高いことから GsFfh に対する相互作用よりも弱いと考えられる。センサーグラムの形状が箱型であることから GS の結合速度と解離速度が速いことがわかり、GsFfh に対する相互作用よりも弱いことが考えられる。



Sti1

MRNTRWAATLGLTATAVCGPLAGA
 SLASPATAPASLYAPSALVLTVGHG
 ESAATAAPLRAVTLTCAPTASGTHP
 AAAAACAE LRAAHGDPSALAAEDSV
 MCTREYAPVVVTVDGVWQGRRLSYE
 RTFANECVKNAGSASVFTF

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the secreted proteins of *S. lividans* TK23 in the presence of GS. Secretion of Sti1 was inhibited by GS. Amino acid sequence of Sti1 is shown in the right panel. SP predicted by SignalP 4.1 is shown by bold letters.

ゴードスポリン作用機構の解析

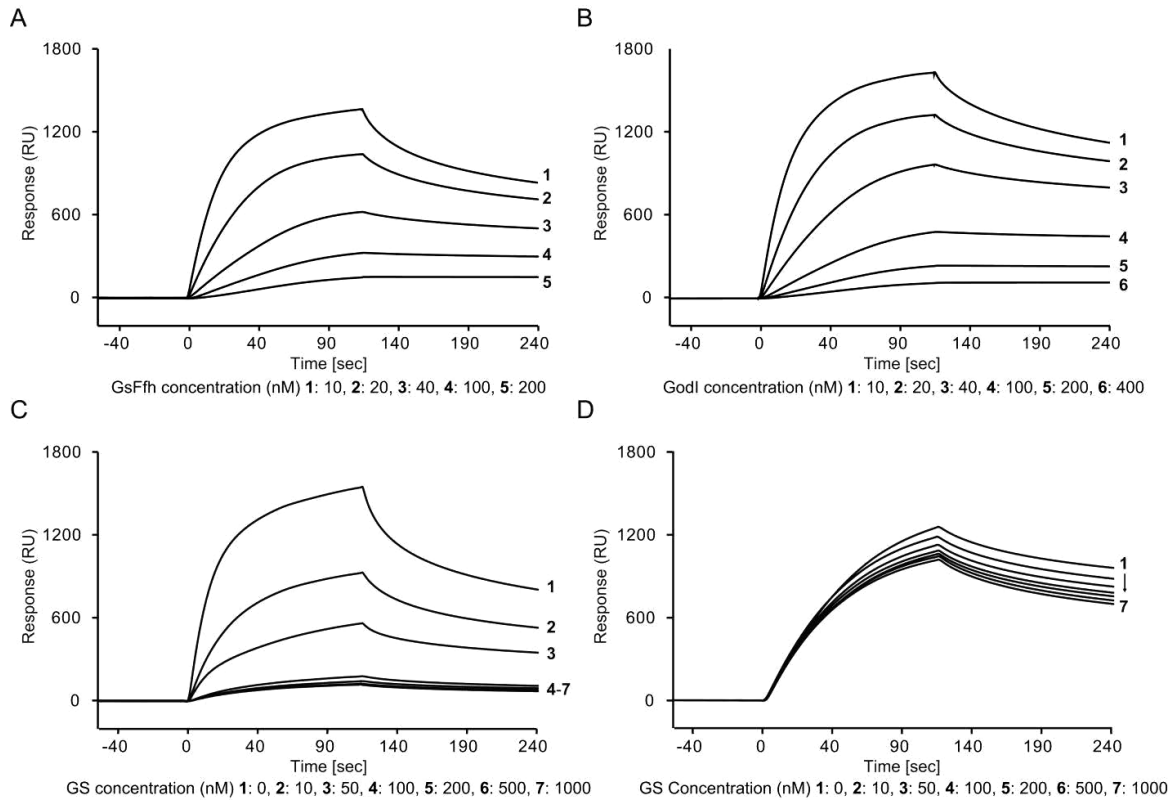


Fig. 7 Recognition of StI1 signal peptide by GsFfh and GodI, and Biacore sensorgrams showing interference by GS for interaction between GsFfh and signal peptide. A. Biacore sensorgrams showing the interaction between GsFfh and StI1 signal peptide. **B.** Biacore sensorgrams showing the interaction between GodI and StI1 signal peptide. **C.** GS inhibited the interaction between GsFfh and StI1 signal peptide. GsFfh (100 nM) and GS are pre-mixed before analysis. The interaction was completely lost at the GS concentrations above 100 nM. **D.** GS did not inhibit the interaction between GodI and StI1. GodI (100 nM) and GS are pre-mixed before analysis. GodI still interacts with StI1 even in the presence of 1000 nM of GS.

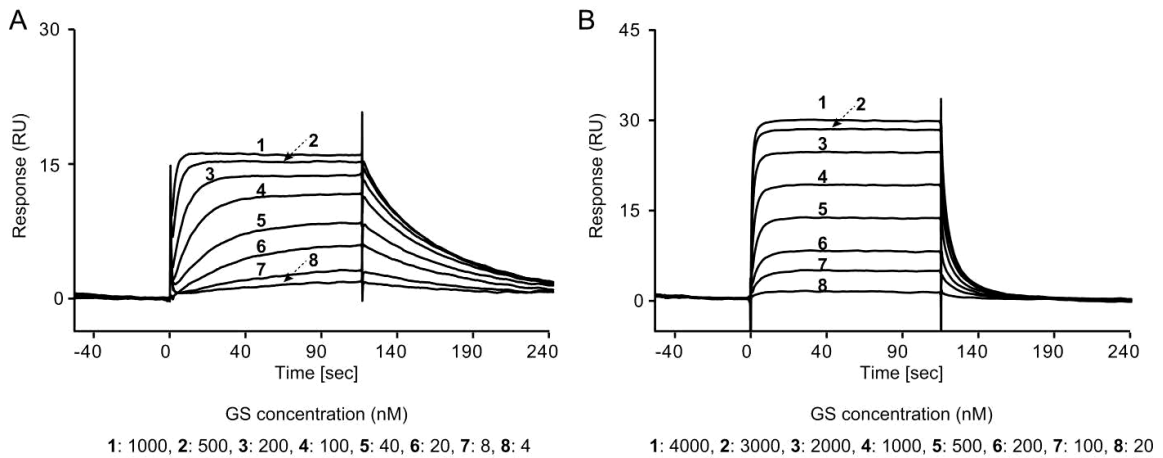


Fig. 8 SPR analysis showing the interaction between GS and Ffhs of pathogenic actinomycetes. A. Biacore sensorgrams showing the interaction between MtFfh and GS. **B.** Biacore sensorgrams showing the interaction between CdFfh and GS. MtFfh: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; CdFfh: *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129.

まとめ及び今後の展望

2015年にWHOが公開した資料（Antibacterial Agents in Clinical Development）によると、現在、早急に対処すべき病原菌として結核菌、カルバペネム耐性 *Pseudomonas aeruginosa*, 同 *Acinetobacter baumannii*, 同 *Enterobacteriaceae* が指摘されている。さらに、現時点での抗生物質開発のパイプラインは既存抗生物質の改良によるものがほとんどであるが、このような開発では短期的な解決法にしかならず、多剤耐性菌による感染症を根本的に解決することはできない。将来におけるパンデミックな病原菌の蔓延が危惧されており、既存の抗生物質とは作用点が重ならず、耐性機構が異なる革新的な抗生物質の開発が待ち望まれている。本研究によって、GSの作用点がSRPであることが明らかとなった。今後、本知見を基にSRPを分子標的とした抗生物質が開発されることが期待できる。別項で述べるようにGS生合成酵素は基質特異性が寛容であり、GSの骨格改変による新たな薬剤の創製が期待される。また、GSはSRPに結合する初めての薬剤であり、タンパク質の分泌・細胞内局在に関する研究に適用可能な生化学試薬としての利用も期待される。

要 約

放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 株が生産する二次代謝産物であるGSは、様々な放線菌に対して二次代謝の誘導、形態分化の促進、生育の阻害など特徴的な生物活性を示すが、その分子標的は明らかにされておらず、作用機構に関する研究は進んでいなかった。本研究では、表面プラズモン共鳴を用いてGSがSRPの構成タンパク質であるFfhと相互作用することを示した。GS生産菌が有するFfhホモログであるGodIは同様の条件でGSと相互作用しないこともわかり、GS耐性型のFfhであることが示唆された。続いて、FfhとGodIのドメインスワッピングにより、標的部位がシグナルペプチドの認識を担うMドメインであることが明らかになった。さらに、この知見をもとにGSを添加して放線菌 *S. lividans* の液体培養を行ったところ、SRP依存的事であることが知られているSti1の分泌が阻害されることが分かった。化学合成したSti1シグナルペプチドとFfhの間には相互作用が観測されたが、GS存在下でこの相互作用は阻害された。同様の相互作用はGodIとSti1の間にも観測されたため、GodIはFfhとして機能しうると考えられる。また、GS存在下でもGodIとSti1の結合は妨げられないことから、GS生産菌においてはGS耐性

型FfhであるGodIが、Ffhの機能を代替することで耐性が発揮されると結論した。これまでに、Ffhを標的とする薬剤は知られておらず、GSはその初めての例である。結核菌などの病原性放線菌が有するFfhとGSの間に *in vitro* で相互作用が検出されたことから、本研究で得られた知見をもとに新規の抗生物質の開発が可能になると期待される。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2013. 二次代謝誘導物質ゴードスポリン耐性化機構の解析. 2013年度 (第28回) 日本放線菌学会大会. 9月5-6日, 広島.
- 2) Ozaki, T., Asamizu, S. & Onaka, H. 2015. Characterization of the mechanism for the goadsporin self-resistance. Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era. 11-14 January, San Diego, U.S.A.
- 3) 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2015. 二次代謝誘導物質ゴードスポリンの作用機構の解析. 日本農芸化学会2015年度大会. 3月27日, 岡山.
- 4) 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2015. 二次代謝誘導物質ゴードスポリンの作用に関する研究. 第6回醗酵学フォーラム. 9月6日, 富山.
- 5) 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2015. 二次代謝誘導物質ゴードスポリン作用機構の解析. 第30回日本放線菌学会. 9月7-8日, 富山.
- 6) 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2016. 二次代謝誘導物質ゴードスポリン作用機構の解析. 日本農芸化学会2016年度大会. 3月28日, 札幌.
- 7) Sugai, Y. 2016. Mode of action by goadsporin, the inducer of secondary metabolism and morphogenesis in actinomycetes. The 1st A3 Foresight Symposium on "Chemical & Synthetic Biology of Natural Products". 23 August, Shanghai, China.
- 8) 金田彬, 尾崎太郎, 菅井佳宜, 浅水俊平, 千田俊哉, 尾仲宏康. 2017. 薬剤ターゲットをFfhとするゴードスポリンの新規作用機構解析. 日本農芸化学会2017年度大会. 3月18日, 京都.
- 9) Kanada, A., Ozaki, T., Sugai, Y., Asamizu, S., Senda, T. & Onaka, H. 2017. Analysis of interaction between secondary metabolisms inducing peptide goadsporin and Ffh. A3 Foresight Network on Natural Products. 23 May, Jeju, Korea.
- 10) Kanada, A., Ozaki, T., Sugai, Y., Asamizu, S., Senda, T. & Onaka, H. 2017. Analysis of interaction between secondary metabolisms inducing peptide goadsporin and Ffh. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 24 May, Jeju, Korea.
- 11) 金田彬, 菅井佳宜, 浅水俊平, 千田俊哉, 尾仲宏康. 2017. Goadsporinとそのターゲットタンパク質Ffhの相互作用の解析. 第32回日本放線菌学会. 9月7-8日, 長野.
- 12) 金田彬, 尾崎太郎, 菅井佳宜, 浅水俊平, 千田俊哉, 尾仲宏康. 2018. 二次代謝誘導ペプチドgoadsporinの作用解析. 日本農芸化学会2018年度大会. 3月15-18日, 名古屋.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成 24 (2012) 年度寄付講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。また、Biacore T-200 を用いた相互作用解析でお力を賜りました高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉教授に感謝の意を表します。

文 献

- Batey, R.T., Rambo, R.P., Lucast, L., Rha, B. & Doudna, J.A. 2000. Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science*. **287**: 1232-1239.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. **417**: 141-147.
- Berka, T.R., Fornwald, J.A., Gorniak, J.G., Rosenberg, M., Strickler, J.E. & Taylor, D.P. 1996. Protein protease inhibitors from streptomycetes. US Patent, US5498529A.
- De Keersmaecker, S., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Lammertyn, E. & Anné J, Geukens N. 2006. Evaluation of TatABC overproduction on Tat- and Sec-dependent protein secretion in *Streptomyces lividans*. *Arch. Microbiol.* **186**: 507-512.
- Elvekrog, M.M. & Walter, P. 2015. Dynamics of co-translational protein targeting. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **29**: 79-86.
- Hainzl, T., Huang, S., Meriläinen, G., Brännström, K. & Sauer-Eriksson, A.E. 2011. Structural basis of signal-sequence recognition by the signal recognition particle. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 389-391.
- Hayashi, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Ikeda, H., Omura, S., Oku, N., Igarashi, Y., Tomoda & Onaka, H. 2014. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.* **21**: 679-688.
- Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A. & Ochi, K. 2009. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat. Biotechnol.* **27**: 462-464.
- Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **54**: 1045-1053.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 526-631.
- Janda CY, Li J, Oubridge C, Hernández H, Robinson CV, Nagai K. 2010. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature*. **465**: 507-510.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P. & Stroud, R.M. 1998. Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* **94**: 181-191.
- De Keersmaecker, S, Vrancken, K., Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Anné, J. & Geukens, N. 2006. Evaluation of TatABC overproduction on Tat- and Sec-dependent protein secretion in *Streptomyces lividans*. *Arch. Microbiol.* **186**: 507-512.
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. & Ikeda, H. 2010. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 2646-2651.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**: 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Palacín, A., de la Fuente, R., Valle, I., Rivas, L.A. & Mellado, R.P. 2003. *Streptomyces lividans* contains a minimal functional signal recognition particle that is involved in protein secretion. *Microbiology* **149**: 2435-2442.
- Palomino, C. & Mellado, R.P. 2005. The *Streptomyces lividans* cytoplasmic signal recognition particle receptor FtsY is involved in protein secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 57-62.
- Schaerlaekens, K., Schierová, M., Lammertyn, E., Geukens, N., Anné, J. & Van Mellaert, L. 2001. Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **183**: 6727-6732.
- Saraogi, I. & Shan, S.O. 2011. Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic*. **12**: 535-542.
- Saraogi, I. & Shan, S.-o. 2014. Co-translational protein targeting to the bacterial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 1433-1441.
- Strickler, J.E., Berka, T.R., Gorniak, J., Fornwald, J., Keys, R., Rowland, J.J., Rosenberg, M. & Taylor, D.P. 1992. Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. Purification, activity, cloning, and expression. *J. Biol. Chem.* **267**: 3236-3241.

In vitro 再構成系を用いたゴードスポリン生合成酵素の解析と合理的な類縁体設計

尾崎 太郎¹⁾, 菅井 佳宣, 浅水 俊平, 尾仲 宏康

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 微生物潜在機能探索寄付講座

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Dissection of goadsporin biosynthetic machinery by *in vitro* reconstitution leading to *in vivo* production of designer analogues

Taro Ozaki¹⁾, Yoshinori Sugai, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

Goadsporin (GS) is a member of a growing family of natural products called RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides). GS has a unique linear structure containing an N-terminal acetyl moiety, six azoles, and two dehydroalanines in the peptidic main chain. Although the enzymes involved in GS biosynthesis have already been identified, substrate tolerance and recognition determinants of the respective enzymes have yet to be elucidated. In the present study, we report a one-pot synthesis of GS using a flexible *in vitro* translation system (FIT system) integrated with recombinant enzymes. The FIT system allows us to readily prepare not only the precursor peptide GodA from its synthetic DNA template, but also 52 mutants, enabling us to analyze substrate tolerance of each modification enzyme and the modification determinants of the GodA sequence. The knowledge obtained from *in vitro* experiments has also led us to rationally design and produce GS analogues *in vivo*. The methodology demonstrated in this study can also be applied to other RiPP biosynthetic machinery, enabling rapid investigation of post-translational modifications that confer structural diversity and biological activity.

Key words: goadsporin, biosynthesis, RiPPs, *in vitro* translation

緒 言

ゴードスポリン (goadsporin, GS) は放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産する二次代謝産物である (Onaka *et al.*, 2001). 19 残基の直鎖ペプチドの骨格が、複素環やデヒドロアラニン、アセチル基で高度に修飾された特異な構造を有している (Igarashi *et al.*, 2001). GS は放線菌に対して、顕著な抗菌活性を示す。標的とする放線菌には、ジャガイモそうか病の原因菌である *Streptomyces*

scabies JCM 7914 のような病原菌も含まれる。また、1 μ M 程度の低濃度において GS は放線菌の形態分化や二次代謝を誘導することも知られている。さらに GS はタンパク質の分泌・局在に関わるシグナル認識粒子 (Signal recognition particle; SRP) を標的とする、報告例のない作用機序を有することが示唆されている。これらのことから、GS は新規の抗生物質や潜在的二次代謝を活性化するための魅力的な骨格を有しているといえる。

GS の生合成遺伝子クラスターは 10 の遺伝子から構成される (*godA-I*, *godR*) (Onaka *et al.*, 2005)。このうち *godA* 遺伝子は 150 bp の短い遺伝子であり、49 残基のペプチド GodA をコードしている。GodA の C 末端側 19 残基は GS の構造に対応した配列であり、この部分が生合成酵素による翻訳後修飾を受けることで GS が生合成される。このような特徴を有するペプチド系天然物を

¹⁾ 現北海道大学理学研究院

E-mail: 尾崎太郎: ozaki@sci.hokudai.ac.jp

尾仲宏康: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者: 後藤佑樹 (東京大学大学院理学系研究科),

菅 裕明 (東京大学大学院理学系研究科),

池田治生 (北里大学北里生命科学研究科)

RiPPs (Ribosomally-synthesized and Post-translationally modified Peptides) と総称することが提唱されている (Arnison *et al.*, 2013). RiPPs には顕著な生物活性を有する分子が多いことから, 近年注目されている化合物群の一つである. また, RiPPs の翻訳後修飾酵素には寛容な基質特異性を示すものが多く知られており, 生合成工学による経路の改変・新規類縁体の創製などの点からも有望な一群である.

GS の生合成においては, 初めに GodA が *godA* 遺伝子の転写と翻訳により合成される. GodA の N 末端側 30 残基はリーダーペプチド (LP) と呼ばれ, 修飾酵素による基質認識部位だと考えられている. これに対して, C 末端側 19 残基はコアペプチド (CP) と呼ばれ, 前述のようにこの領域が修飾を受けることで GS が生合成される. CP に存在するセリン・スレオニン・システイン残基は, YcaO ドメインを有する脱水環化酵素 (Li *et al.*, 1996; Dunbar *et al.*, 2012; Dunbar *et al.*, 2014; Koehnke, *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2005) である GodD とニトロリダクダーゼドメインを有する脱水素酵素 (Li *et al.*, 1996; Melby *et al.*, 2014; Milne, *et al.* 1999) GodE によりアゾリンを経て複素芳香環であるアゾールへと変換される. また, 一部のセリン残基は *O*-グルタミル化とグルタミン酸の脱離によって, デヒドロアラニンへと変換される. これらの反応はランチペプチド脱水酵素 LanB (Garg *et al.*, 2013; Ortega *et al.*, 2015) の N 末端ドメイン, C 末端ドメインとそれぞれ相同性を示す GodF と GodG によって触媒される (Ozaki *et al.*, 2015). N 末端の LP は, GodB によって消化されると考えられる. LP の消化によって生じたアミノ基が, GNAT ドメイン (Vetting *et al.*, 2005; Reyna-González *et al.*, 2016) を有するアセチル基転移酵素 GodH によってアセチル化されることで GS が生成する.

RiPPs 生合成における翻訳後修飾酵素は, しばしば寛容な基質特異性を示す. そのため, 前駆体遺伝子に変異を導入することで生合成経路に前駆体アナログを供給し, 類縁体を創製する試みがなされてきた (Zhang & Kelly, 2012; Zhang & Liu, 2013; Deane *et al.*, 2013; Tianero *et al.*, 2012). しかし, 各修飾酵素の基質特異性を検証するには, 基質となるペプチドを化学合成や組換えタンパク質として調製する必要があり, それらの作業には多大な労力が必要とされる. GS 生合成に関しては, 既にいくつかの類縁体創製が可能であることは示されていたが (Onaka *et al.*, 2005), 各修飾酵素の基質認識について系統的な検証は行われていなかった.

本研究では, 無細胞翻訳系を用いて前駆体ペプチドを合成し, GS 生合成酵素の基質特異性を調査することとした. 後藤ら (2011) は, 再構成無細胞翻訳系と人工リ

ボザイムを組み合わせることで FIT (flexible *in vitro* translation) システムを開発した. 本システムでは, 鋳型となる DNA を添加することで, 天然・非天然アミノ酸を構成単位とする様々なペプチドを簡便に合成することが可能である. 後藤ら (2014) はさらに, FIT システムを用いて脱水環化酵素 PatD の基質特異性を詳細に調査し, 本酵素が広範な基質を *in vitro* で修飾可能であることを示した. 本論文では, FIT システムを用いて GodA を調製し, 翻訳後修飾酵素による反応に供することで, ワンポットで GS を合成することに成功した (Fig.1). さらに, 様々な基質類縁体を調製し翻訳後修飾酵素の基質特異性を網羅的に検証した. 得られた知見を応用することで新たな GS 類縁体を論理的に設計することが可能となり, *in vitro* だけでなく *in vivo* の生産系にも適用できることを示した.

実験方法

前駆体ペプチド GodA* およびそのアナログ体合成のための鋳型 DNA の調製

GodA およびそのアナログ体の配列をコードした合成 DNA をプライマー伸長と PCR により調製した. 各反応には KOD-Plus-Ver. 2 (東洋紡) を利用した (プライマーの詳細は Ozaki *et al.* (2017) の Supplementary Table 5 及び 6 を参照のこと). プライマー伸長は 100 μ l のスケールで行い, 95 $^{\circ}$ C で 1 分間インキュベートした後, 各プライマーを終濃度 1 μ M で使用した. 50 $^{\circ}$ C で 1 分間のアニリングと 68 $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長を 5 サイクル行った. 反応液のうち 5 μ l を PCR の鋳型として用いた. 1 段階目の PCR は, 100 μ l の反応溶液でプライマー濃度 0.5 μ M で行った. 95 $^{\circ}$ C で 40 秒, 50 $^{\circ}$ C で 40 秒, 68 $^{\circ}$ C で 40 秒のサイクルを 5 回行った. この反応液から 0.5 μ l を以降の PCR の鋳型とした. 最終段階の PCR は同様の反応を 14 サイクル行った. アガロースゲル電気泳動で増幅を確認した後, FastGene Gel/PCR Extraction (ニッポンジーン) を用いて目的断片を精製した.

生合成遺伝子のクローニングと組換えタンパク質の調製

GS 生合成酵素は, 大腸菌 BL21 (DE3) を宿主とした組換えタンパク質として調製した. *godD* の塩基配列は, 大腸菌を宿主とした発現系に合わせてコドンの使用頻度を最適化した. 合成 DNA を鋳型として PCR により目的配列を増幅した後, pET16b の NdeI-XhoI サイトにクローニングした. *godE*, *godF*, *godH* は, TP-A0584 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR により増幅し, それぞれ pET26b(+) の NdeI-HindIII サイト, pET15b の NdeI-XhoI サイトにクローニングした. *lazF* は, コスミド pKU465-

In vitro 再構成系を用いたゴードスポリン合成酵素の解析と合理的な類縁体設計

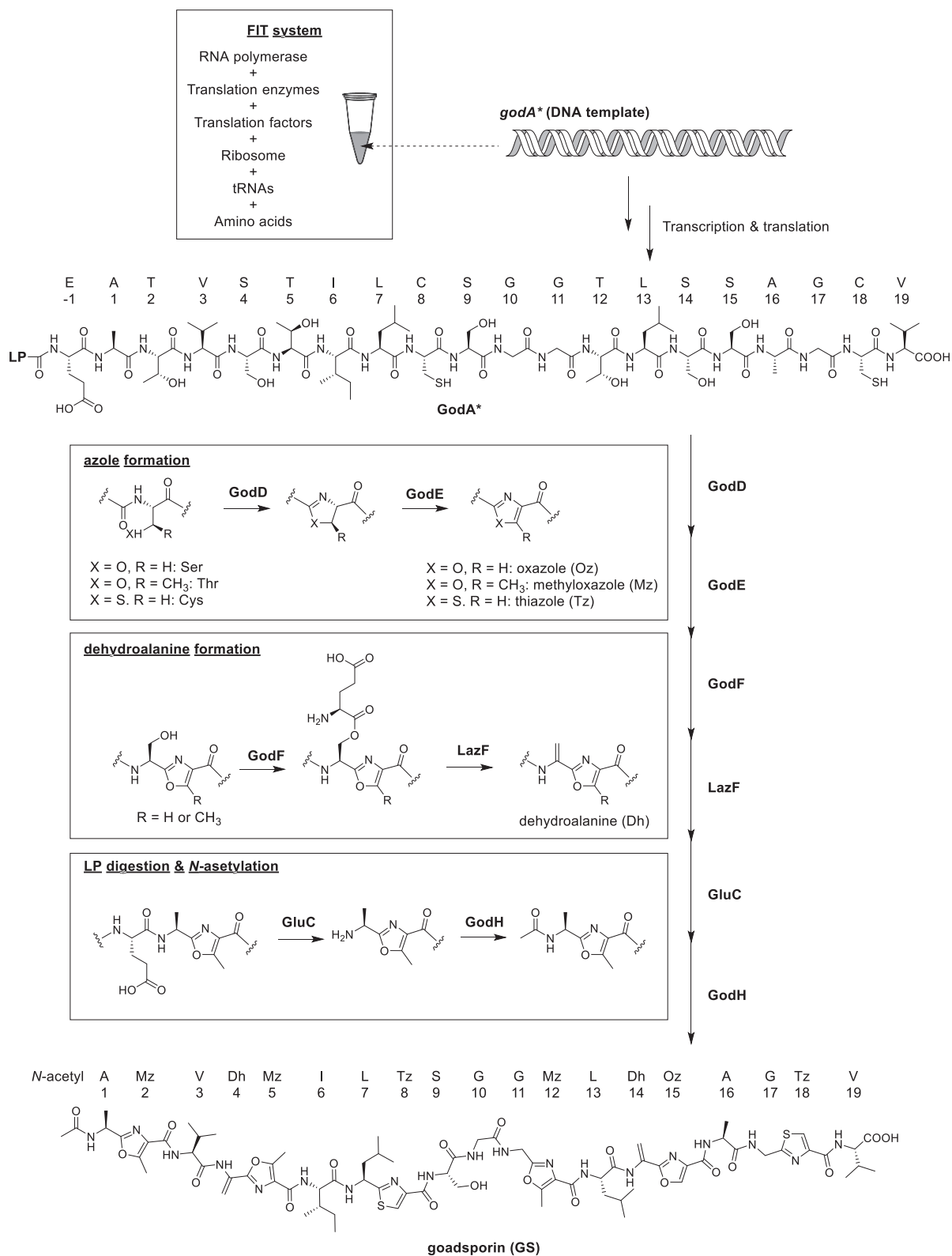


Fig. 1 Schematic representation of FIT-GS system. After DNA templates are prepared by primer extension and PCR, precursor peptides can be synthesized by *in vitro* transcription and translation. Post-translational modification of synthesized peptide yielded godospirin (GS).

ltc18-6C (Hayashi *et al.*, 2014) を鋳型としたPCRにより増幅し, pET26b(+) のNdeI-XhoIサイトにクローニングした。

構築したプラスミドpET16-godD, pET26-godE, pET15-godF, pET15-godH, pET26-lazFをそれぞれBL21 (DE3) に導入した。GodDの発現の際は, シャペロンプラスミドpGro7(タカラバイオ株式会社)も導入し, シャペロンタンパク質GroEL, GroESとの共発現を行った。得られた形質転換体をカルベニシリン (50 μ g/ml), クロラムフェニコール (20 μ g/ml), アラビノース (0.5 μ g/ml) を含むLB培地に植菌し, 30 $^{\circ}$ Cで2時間培養した。その後, 培養温度を18 $^{\circ}$ Cに下げ, さらに20時間培養した。そのほかのタンパク質については, 形質転換体をZYM-5052培地に植菌し, 18 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。培養終了後, 菌体を4,720gで10分間遠心し, 菌体を回収した。

各菌体を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0) に懸濁し, 菌体を破碎した。10,300gで30分間遠心し, 未破碎の細胞と不溶性画分を除いた。可溶性画分をNi-アフィニティークロマトグラフィーに供し, 目的タンパク質を精製した。

酵素反応条件

翻訳因子, 酵素, リボソーム等を論文に記載の方法で調製した (Goto *et al.*, 2011) (各酵素, 化合物の終濃度などの詳細はOzaki *et al.* (2017) を参照のこと)。翻訳反応は0.25 μ lの鋳型DNAを含む2.5 μ lの反応溶液で行い, 37 $^{\circ}$ Cで30分間反応を行った。翻訳終了後, 反応溶液に修飾酵素を終濃度各1 μ Mで添加し, 10mM MgCl₂, 5mM ATP, 1mM DTTの存在下, 15 μ lの溶液中で反応を行った。25 $^{\circ}$ Cで24時間反応を行った後, C-Tip C18カラム (日京テクノス) を用いてサンプルを脱塩し, MALDI-TOF-MS (ultrafleXtreme, ブルカーダルトニクス) により分析した。

GS酵素合成の際は, 翻訳反応を7.5 μ lのスケールで行った。この反応産物を上記と同様の修飾反応に供した。反応の進行を確認した後, 30 μ lの反応液に1 μ gのGluCエンドペプチダーゼ (ロシュ) を添加し, 37 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行った。消化反応後, GodHを終濃度6 μ Mとなるように添加し, 30 $^{\circ}$ Cで1時間反応を行った。反応溶液を凍結乾燥した後, 100 μ lのDMSOに溶解し, LC-MS (amaZon-SL, ブルカーダルトニクス) を用いて分析した。

*in vivo*でのGSアナログの生産

*godA*への部位特異的変異の導入と類縁体の生産は, 既存の方法に従った (Onaka *et al.*, 2005)。Streptomyces sp. TP-A0584 *AgodA* および Streptomyces sp. TP-A0584

AgodA/pGODRを宿主として, GSアナログを生産した。各形質転換体を7日間培養した後, *n*-ブタノールで抽出し, LC-MS (ACQUITY UFLC, Xevo G2-S Tof, Waters) を用いて分析した。

GS-10SA11の精製

Streptomyces sp. TP-A0584 *AgodA* に pTYM-10SA11 および pGODRを導入した。形質転換体をV-22培地 (Onaka *et al.*, 2001) に接種し, 30 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。この培養液を種培養とし, 3mlを100mlのGS培地 (6.0% maltose, 4.0% pharmedia, 1.0% yeast extract, 1.0% diaion HP20, pH7.0) に植え継いだ。培地は500ml容K-1フラスコに調製し, 30 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。

2.8lの培養液を調製し, 等量の*n*-ブタノールを用いて抽出した。有機層を回収し, ロータリーエバポレーターを用いて乾固することで11gの粗抽出物を得た。この乾固物を500mlの水に懸濁し, *n*-ヘキサンによる洗浄を2回行った。水層を回収し, 等量の酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル層を回収し, 乾固することで1.2gの抽出物を得た。この抽出物をクロロホルム:メタノール (10:1) に溶解し, LH-20カラムクロマトグラフィーに供した。クロロホルム:メタノール (10:1) を用いてカラムを展開し, GS-10SA11を含む画分を集めて乾固した。得られた0.3gの粗精製サンプルをHPLC(カラム: Protein-R (5 μ m, ϕ 4.6x250mm, ナカライテスク), 溶媒: アセトニトリル, 水, TFA (10%アセトニトリル 0-2min, 10-95%アセトニトリル 2-25min, 95%アセトニトリル 25-30min, 0.1% TFAを添加), 流速: 1.5ml min⁻¹, 温度: 40 $^{\circ}$ C) を用いて精製した。約2.5mgの精製品を得られるまでHPLCによる精製を繰り返した。

GS-tandemの生産

GS-tandemの配列をコードした合成DNA (Genewiz社) を, pTYM1gkのNdeI-HindIIIサイトに挿入した。このプラスミドをStreptomyces sp. TP-A0584 *AgodA* に導入し, 得られた形質転換体をGS-10SA11と同様の方法で培養した。

2.9lの培養液を調製し, クロロホルム:メタノール (1:1) を用いて抽出した。有機層を回収し, ロータリーエバポレーターを用いて乾固した。その乾固物を90%メタノールに懸濁し, *n*-ヘキサンで洗浄した。90%メタノール層を回収・乾固し, 2.2gの粗抽出物を得た。この抽出物を60%メタノールに溶解し, ジクロロメタンを用いて抽出した。ジクロロメタン層を回収・乾固し, 0.7gの抽出物を得た。この抽出物をクロロホルム:メタノール (5:1) に溶解し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。クロロホルム:メタノール (5:1) で

カラムを展開し、GS-tandemを含む画分を回収・乾固した。得られた部分精製品をクロロホルム：メタノール（10：1）に溶解し、LH-20カラムクロマトグラフィーに供した。クロロホルム：メタノール（10：1）でカラムを展開し、22mgの粗精製品を得た。このサンプルをHPLC（カラム：Protein-R（5 μ m, ϕ 10x250mm, ナカライテスク）、溶媒：アセトニトリル、水、TFA（59%アセトニトリル, 0.05% TFAを添加）、流速：3.0ml min⁻¹、温度：40℃）を用いて精製した。2.1mgのGS-tandemを得た。

結 果

前駆体ペプチドGodA*の調製

前駆体ペプチドGodAを再構成無細胞翻訳系FITシステムを用いて調製した。この際、MALDI-TOF-MSで分析する際のイオン化効率を向上させるために、開始メチオニンの直後に連続したリジン残基を三つ挿入した。また、LPの消化を担うと考えられたGodBは膜結合ドメインを有し、可溶性タンパク質として調製することができなかった。そのため、市販のエンドプロテアーゼGluCで消化できるよう、CPの直前にグルタミン酸残基を挿入した。この改変GodAをGodA*と呼称する。FITシステムを用いてGodA*を翻訳合成した後、MALDI-TOF-MSを用いて分析した結果、 m/z 5,482を示すシグナルが検出された（Fig.2A）。これはGodA*に存在する2残基のシステイン間でジスルフィド結合を形成したものと一致する。そのため、以降の修飾反応では終濃度1mMのDTTを添加して実験を行った。

修飾酵素の調製

GSの生合成酵素は、大腸菌を宿主とした組換えタンパク質として調製した。GodD, GodE, GodF, GodHは可溶性タンパク質として発現・精製ができたが、GodGについては活性タンパク質を得ることができなかった。そのため、ラクタゾール生合成経路における相同タンパク質LazFを代わりに利用することにした（Hayashi *et al.*, 2014）。LazFはGodGに相同性を示すN末端ドメインとともに、C末端領域にはアゾリンをアゾールへと酸化する脱水素酵素ドメインを有する二機能性酵素であり、可溶性タンパク質として発現・精製することができた。精製したGodEとLazFは黄色を呈しており、補酵素としてフラビンが結合していると考えられた。メタノールで処理して酵素を失活させた後、その上清をLC-MSで分析したところフラビンモノヌクレオチド（FMN）が検出され、上記の推測が裏付けられた。また、同様の分析により、GodHがアセチルCoAと共精製されたことも明らかになり、アセチル基転移酵素と

しての機能を有することが支持された。

FIT-GSシステムの構築

初めに、GodDを用いたGodA*へのアゾリンの導入修飾を試みた。反応後、MALDI-TOF-MSを用いて分析したところ、 m/z 5,448, 5,430, 5,412, 5,394を示すシグナルが観測された（Fig.2B）。これらはそれぞれ2, 3, 4, 5か所にアゾリンが導入された分子量と一致している。この反応系にGodEを添加して同時に反応を行ったところ、 m/z 5,364を示すシグナルがただ一つ主要な生成物として観測された（Fig.2C）。これは、GodA*に6つのアゾールが導入されたものと一致するシグナルであり、GodDとGodEによってGodA*が期待通りの修飾を受けたことが示唆された。

次にデヒドロアラニンの導入を試みた。著者らはこれまでにデヒドロアラニン残基がGodFによって触媒されるセリン残基のO-グルタミル化とGodGによるグルタミン酸の脱離によって導入されることを、著者らによる遺伝子破壊実験およびナイシン生合成酵素NisBについてOrtegaら（2015）が報告した知見を基に提唱している（Ozaki *et al.*, 2016）。GodFをGodD, GodEとともにGodA*と反応させたところ、 m/z 5493を示すシグナルが新たに観測された（Fig.2D）。これはGodA*に6個のアゾールと1個のグルタミル基が導入された分子量と一致する。FITシステムには大腸菌由来のtRNA^{Glu}とGluRSが含まれているため、これらがGodFの補基質として利用されたと考えられる。一方で、GodFのみをGodA*と反応させてもグルタミル化活性は検出されなかった。このことから、GodD, GodEによるアゾールの導入がGodFによる基質認識に必須であることが示唆された。

さらに、LazFをGodD, GodE, GodFとともにGodA*と反応させると、 m/z 5,328を示すシグナルが観測された（Fig.2E）。これは6つのアゾールと2つのデヒドロアラニンが導入されたGodA*と一致する値であり、期待通りの修飾がすべて行われたことが示唆された。このことから、GodA*のLPとラクタゾール前駆体ペプチドのLPの配列は大きく異なるものの、その違いはLazFによるグルタミン酸の脱離反応には影響がないことが示唆された。

最後に、上記の修飾反応を行った後、反応溶液にGluCおよびGodHを順次添加して、LPの消化、およびアセチル化反応を行った。反応産物をLC-MSで分析したところ、標品のGSと溶出時間、MS³における開裂様式が一致するシグナルが検出された（Fig.2FGH）。以上の結果から、試験管内反応によってGSが合成されたことが示された。

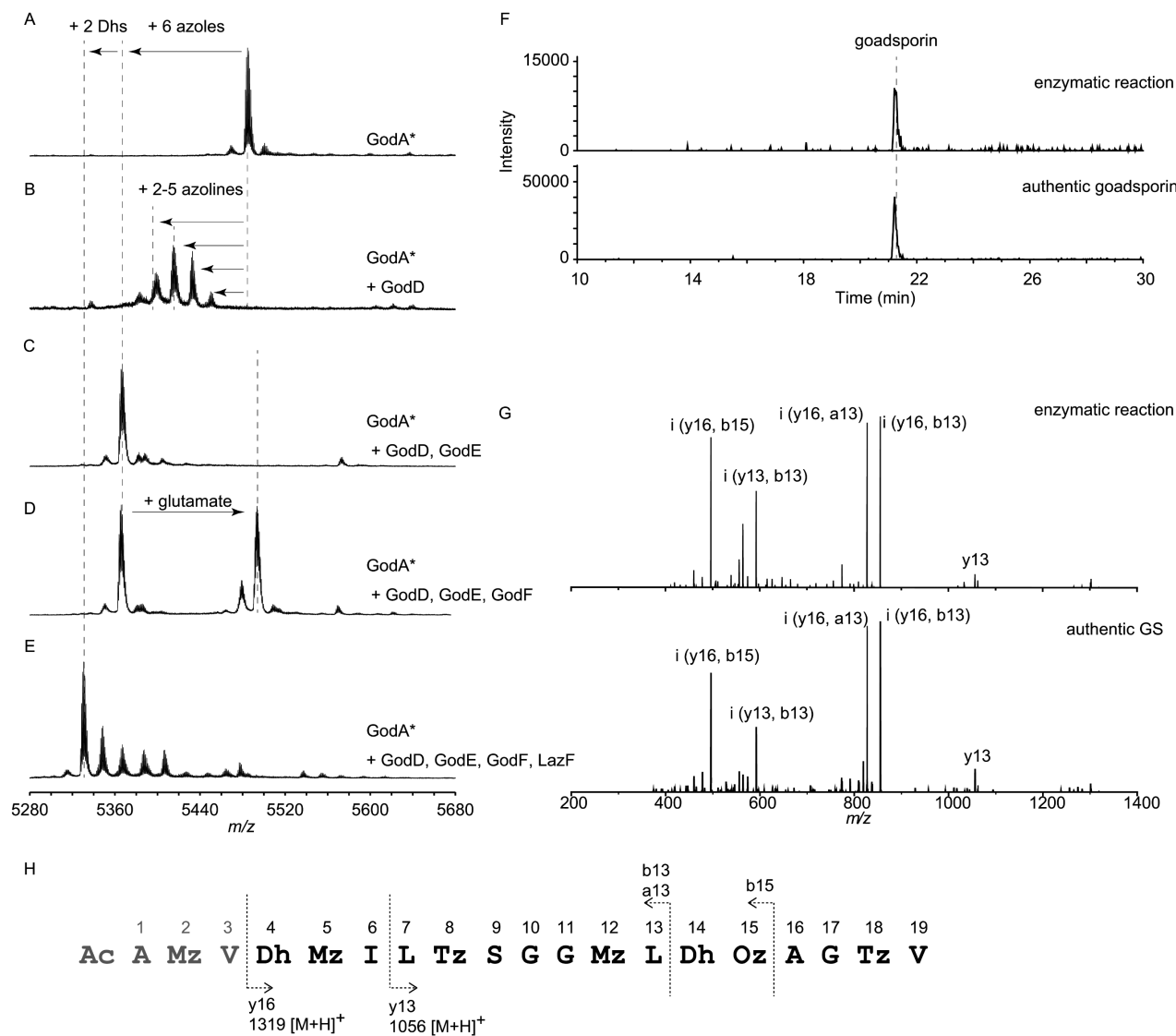


Fig. 2 MALDI-TOF-MS and LC-MS spectra of GS and GS intermediate. A-E. MALDI-TOF-MS spectra of GodA* (A), reaction products of GodD reaction (B), GodDE reaction (C), GodDEF reaction (D), and GodDEF and LazF reaction (E). F. Chromatograms showing total ion current (TIC) of LC-MS³ analysis of enzymatically synthesized GS and authentic one. G. MS³ spectra of enzymatically synthesized GS and authentic one. H. Observed MS³ fragmentation of GS.

GodA への変異導入によるアゾール形成反応の解析

鋳型 DNA の調製に用いるオリゴ DNA の配列を変えることで, *godA** の塩基配列へ迅速に変異を導入することができる. この点を利用して, アゾール形成酵素群 GodD, GodE の基質受容能を検証した. 初めに, CP 領域を部分的に欠損させた GodA*1-9, GodA*1-6, GodA*1-3, GodA*1-2, GodA*2-3 を調製した (Fig. 3A, entry 2-6). これらに GodD, GodE を作用させたところ, 期待通り GodA*1-9, GodA*1-6, GodA*1-3 にそれぞれ 3, 2, 1 つのアゾールが導入された. 一方で, GodA*1-2, GodA*2-3

は修飾されなかった. このことは, これら 2 種のペプチドには基質認識に重要な因子が欠けていることを示唆している. GodA*1-9 と GodA*1-6 の配列には本来のアゾール形成部位である T2, T5, C8 以外に, S4, S9 も修飾個所の候補として存在した. そのため, GodA*1-9-T2A/T5A/C8A および GodA*1-6-T2A/T5A を調製し, 同様に GodD, GodE によるアゾールの導入を試みた. 反応溶液を分析したところ, アゾール形成は確認されず, 基質ペプチドのシグナルが観測された. 同様に GodA*1-3-T2A も修飾を受けなかった (Fig. 3A, entry 7-9). これらから,

In vitro 再構成系を用いたゴードスポリン生合成酵素の解析と合理的な類縁体設計

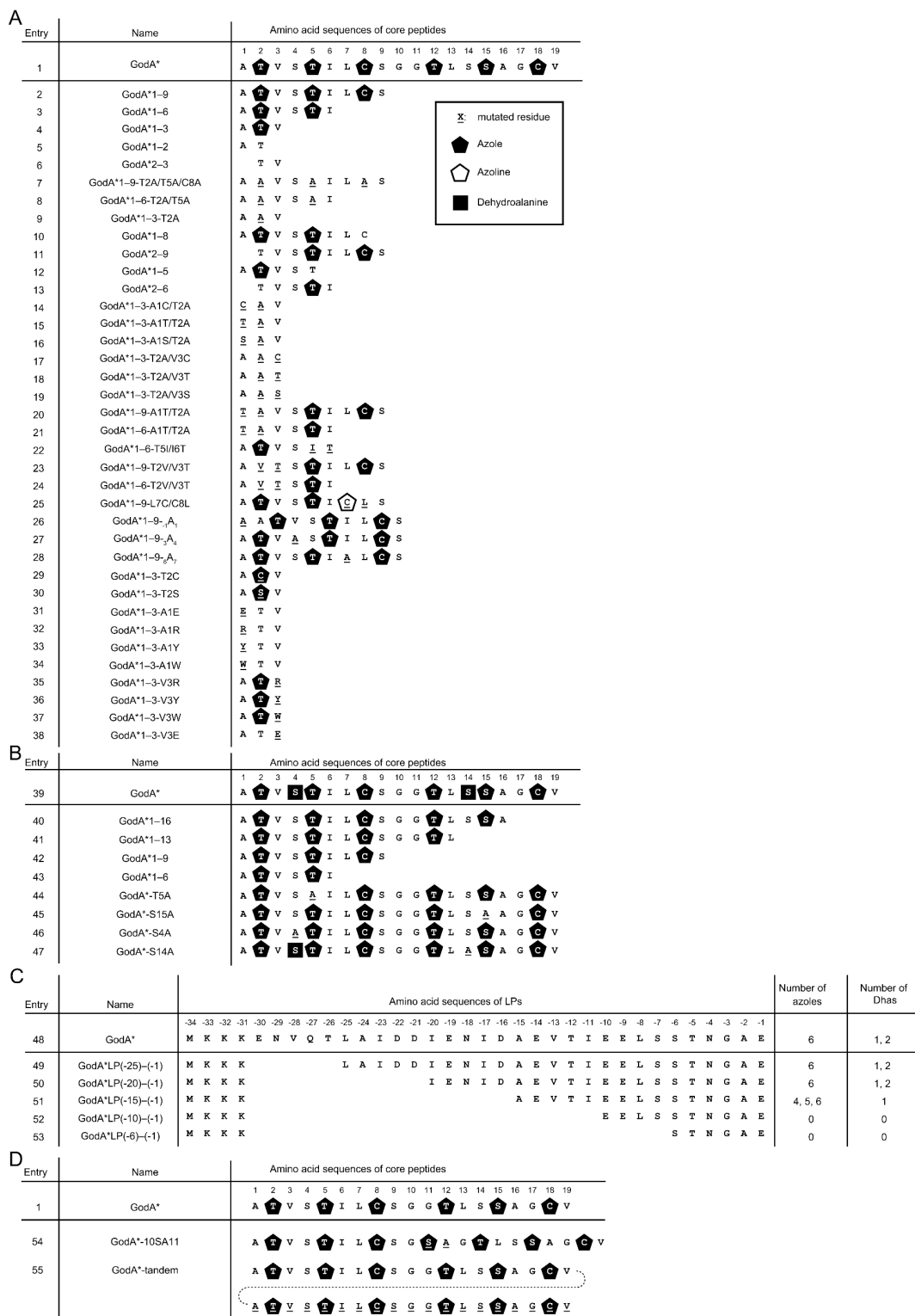


Fig. 3 GS analogs constructed by FIT-GS system. **A.** Summary of azole formation catalyzed by GodD and GodE. The amino acid sequences of core peptides of synthesized GodA* derivatives are shown. **B.** Summary of dehydroalanine formation by GodF and LazF. GodD and GodE are also included in the reaction mixture. The amino acid sequences of core peptides of synthesized GodA* derivatives are shown. **C.** Summary of the LP truncation analyses in the reaction with GodD, GodE, GodF, and LazF. **D.** Summary of azole installation into the designer GodA* derivatives by GodD and GodE.

上記の変異体においても従来の位置 (T2, T5, C8) にアゾールが導入されていると結論した。

次に、アゾールに隣接する残基が修飾に影響するか調べるために、GodA*1-8およびGodA*2-9を調製し、試験した。これらの変異体にはGodA*1-9と同様に3か所のアゾール形成部位が存在するが、2個のアゾールしか形成されなかった。同様にGodA*1-6に欠損変異を導入したGodA*1-5およびGodA*1-6には1つのアゾールしか導入されなかった (Fig. 3A, entry 10-13)。既に述べたようにGodA*1-2とGodA*2-3が修飾を受けないことも合わせて考えると、X1-(S/T/C)-X2という3残基のモチーフがアゾールの形成に必要であるという仮説を導くことができた。

この仮説を検証するために、GodA*1-3に2か所の変異を導入した6種の変異体を調製した (Fig. 3A, entry 14-19)。これらの変異体においてはアゾール導入されるS/T/Cの位置が入れ替わって(S/T/C)-X1-X2、あるいはX1-X2-(S/T/C)となっている。予想通りこれらの変異体はGodD, GodEによる修飾を受けなかった。同様の変異をGodA*1-9とGodA*1-6に導入したところ、それらの変異体においても、変異箇所のアゾールが形成されないことが分かった (Fig. 3A, entry 20-25)。ただし、例外的にGodA*1-9-L7C/C8Lについてはアゾリン形成まで反応が進行した。

次に、GodD, GodEが修飾を受けるS/T/Cの位置を厳密に認識している可能性を検証した。GodA*1-9にAla挿入変異を導入した3種の変異体を調製したが、これらの変異体には3つのアゾールが導入された (Fig. 3A, entry 26-28)。この結果から、X1-(S/T/C)-X2が基質認識を決定するモチーフであると結論した。

次に、X₁-(S/T/C)-X₂に対して変異を導入し、GodD, GodEの基質受容能を調査した。この際、最小単位であるGodA*1-3を基本骨格として変異を導入した。T2をCおよびSに置換したところ、どちらも修飾を受けた。次にA1をE, R, Y, Wに置換したところ、いずれの変異体も修飾を受けなかった。一方、V3にも同様の変異を導入したところ、V3E以外の変異体はいずれも修飾された (Fig. 3A, entry 29-38)。以上のことから、X₁残基の変異は許容されず、X₂残基は酸性アミノ酸以外には置換できることが示唆された。

GodAへの変異導入によるデヒドロアラニン形成反応の解析

アゾール形成反応と同様に、GodF, LazFによるデヒドロアラニン形成反応を検証した。初めに、4種の欠損変異体GodA*1-16, GodA*1-13, GodA*1-9, GodA*1-6を調製した。驚くべきことに、いずれの変異体にもデヒ

ドロアラニンは形成されなかった (Fig. 3B, entry 40-43)。このことは、CP全長がGodFとLazFの反応に必要であることを示唆している。そこで、次に2種の変異体GodA*T5AとGodA*S15Aを調製した。T5とT15はデヒドロアラニンに隣接したアゾール形成部位であり、これらのアゾールがデヒドロアラニンの形成に重要か検証することができる。欠損変異体の結果と同様、どちらの変異体もGodF, LazFによる修飾を受けなかった (Fig. 3B, entry 44, 45)。このことから、これらのアゾールの形成がデヒドロアラニンの形成に必須であると結論した。

次に、デヒドロアラニンの形成残基をアラニンに置換したGodA*S4AとGodA*S14Aを調製した。上流側のS4を置換した場合、S14はデヒドロアラニンへと変換されなかった。一方で、下流側のS14を置換した場合、S4がデヒドロアラニンへと変換されることが分かった (Fig. 3B, entry 46, 47)。これらの結果を考慮すると、GodF, LazFによるデヒドロアラニン形成においてはT5とT15位のアゾール形成の認識が必要であり、更に両酵素はS4を先にデヒドロアラニンへと変換することが明らかになった。

LP領域の欠損

RiPPsの生合成において前駆体ペプチドのN末端領域に存在するLPが、翻訳後修飾酵素の基質認識に重要であることが、一般的に知られている。そのため、GSの生合成においてもGodAのLPが同様の機能を有することが期待される。しかしながら、LP全長が必要となるかどうかはこれまでに明らかにされていない。

そこで、LP領域をN末端側から欠損させた5種の変異体を調製した (Fig. 3C, entry 49-53)。GodA*LP(-25)-(-1)およびGodA*LP(-20)-(-1)は、GodD, GodE, GodF, LazFによってすべての修飾を受けることが分かった。一方で、GodA*LP(-15)-(-1)の場合は、アゾールが5つ導入されたペプチドを主生成物として、いくつかの修飾産物が検出された。さらにLPを切り縮めたGodA*LP(-10)-(-1)やGodA*LP(-6)-(-1)は全く修飾されないことが明らかになった。これらの結果から、LP領域のうちC末端側の20残基が修飾酵素の認識に重要であることが示唆された。鎖長のより短いペプチドのほうが扱いが容易であるため、これらの知見はさらなる類縁体創製を容易にすることが期待される。

論理的に設計したGSアナログの試験管内生合成

以上の知見に基づいて、新たな前駆体ペプチドGodA*10SA11を設計した。この変異体は、CPのG10とC11の間にセリンとアラニンが挿入された配列を有してい

る。これにより、CP中央に新たなX₁-(S/T/C)-X₂モチーフ(GSA)ができるため、この部位にアゾールが導入されることを期待した。この前駆体をGodD, GodEによる反応に供したところ、期待通り7つのアゾールが導入されたことが明らかになった(Fig.3D, entry 54)。

次に、更に鎖長の長いペプチドにアゾールを導入することができるか検証するために、GodA*-tandemを調製した。この変異体は、GodAのCP配列が2回繰り返した38残基のCPを有している。同様にGodD, GodE反応に供したところ、12個のアゾールが導入された。以上のことから、一連の変異体の解析から得られた知見が新たなGS誘導体の創製に応用可能であることが示された(Fig.3D, entry 55)。

*In vivo*でのGS類縁体の生産

著者らはこれまでにGS生産菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 $\Delta godA$ を宿主として *godA* 変異体を発現することで、GS類縁体の生産が可能であることを示してきた(Onaka *et al.*, 2005)。また、生合成遺伝子クラスター中に存在する転写活性化因子 *godR*の過剰発現によって、生産量が増加することも見出している(Haginaka *et al.*, 2014)。再構成無細胞翻訳系の利用により、修飾酵素群の基質受容能を迅速に評価することが可能になったが、それらの試験管内反応では基質と同等あるいは過剰な量

の酵素が用いられており、得られた結果の解釈には注意を払わなくてはならない。*In vitro*で得られた知見が*in vivo*での物質生産にも応用可能であるか精査するために、GodA類縁体の生産を*in vivo*で検証することとした。

初めに、*in vitro*での結果からアゾールの形成を受けないと予測される部位へ変異を導入した10種の類縁体(A1S, V3S, I6S, L7S, G10S, G11S, L13S, A16S, G17S, V19S)を発現した(Fig.4, entry 2-12)。生産されたGS類縁体をLC-MSにより分析した。主生成物のMSフラグメンテーションのパターンを解析したところ、本来修飾されるべき位置にはアゾールが導入されている一方で、変異により新たに導入したセリン残基は変換されていないことが分かった。例外的に、L7S変異体の場合には、この部位がデヒドロアラニンへと変換された化合物がわずかに生産された。以上のように新たに導入したセリン残基がアゾールへと変換されなかったことから、*in vivo*においてもX₁-(S/T/C)-X₂がアゾールの形成に必要なことが示唆された。

次に、*in vitro*ではX₁-(S/T/C)-X₂のうち、X₂は変異が許容されたことから、I6YとV19Yの2種類の変異体産生を試みた(Fig.4, entry 13, 14)。変異 *godA*を宿主へ導入し、形質転換体を培養したところ、どちらの類縁体も生産されることが分かった。本実験から、これらの類縁体がGSでみられるすべての修飾を受けていたこと

Entry	Name	Structures of the products																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
1	Goadsporin	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
2	A1S	Ac-	S	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
3	V3S	Ac-	A	T	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V			
4	I6S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
5	L7S (major product)	Ac-	A	T	V	S	T	I	S	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
6	L7S (minor product)	Ac-	A	T	V	S	T	I	S	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
7	G10S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	S	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
8	G11S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	S	T	L	S	S	A	G	C	V		
9	L13S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	S	S	A	G	C	V			
10	A16S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	S	G	C	V		
11	G17S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	S	C	V		
12	V19S	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	S		
13	I6Y	Ac-	A	T	V	S	T	Y	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
14	V19Y	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	Y		
15	GS-10SA11	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	S	A	G	T	L	S	S	A	G	C	V
16	GS-tandem	Ac-	A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		
			A	T	V	S	T	I	L	C	S	G	G	T	L	S	S	A	G	C	V		

Ac-:N-acetyl group X: mutated residue ◐ Azole ◑ Dehydroalanine

Fig. 4 Summary of GS analogues produced by *in vivo* expression of GodA derivatives.

が示され, X_1 -(S/T/C)- X_2 のうち X_2 について *in vitro* で試験したものと同様の変異を *in vivo* でも導入可能であることが強く示唆された。

さらに, GodA-10SA11についても, *in vivo* で発現を試みた (Fig. 4, entry 15; Fig. 5 ABCD). 形質転換体を培養した結果, 7箇所のアゾールと2残基のデヒドロアラニン, N末端のアセチル基が導入されたGS-10SA11が確かに生産された. 得られた化合物の構造は, 1次元および2次元のNMR, MSフラグメンテーション, 高分解能質量分析によって行った. GodA-tandemについても同様に12個のアゾール, 4残基のデヒドロアラニン, N末端のアセチル基が導入された化合物の生産が確認された (Fig. 4, entry 16; Fig. 5 EFGH). 本生産物に関しては, MSフラグメンテーションと高分解能質量分析によって構造解析を行った.

考 察

再構成無細胞翻訳系FITシステムと生合成酵素群を組み合わせることで, 鋳型DNAを開始基質としてGSを酵素を用いて人工的に合成することに成功した. この試験管内合成系は, あたかも生体内におけるRiPPs生合成を連想させるものであり, 鋳型DNAの転写と翻訳, 6つの修飾酵素によるアゾールとデヒドロアラニンの形成, LPの消化, アセチル化により, 基質や中間体を精製することなく, ワンポットでGSを合成できる. コストを考えると, この *in vitro* 合成系はあくまで小スケールでの定性的な解析に適したものであり, 定量的な解析には向いていない. しかしながら, 本反応系を確立したことで, 望みの配列を有する鋳型DNAを調製するのみで, 広範な基質アナログを *in vitro* で検証, さらには設計することが可能となった. これによって, 化学合成や *in vivo* での前駆体ペプチドの調製に掛かる労力を大幅に低減することができる.

本研究では50を超える変異GodAを調製することで, アゾールやデヒドロアラニンの形成, LPの認識配列について知見を得ることができた. 反応を完全に進行させるために比較的高濃度の酵素を反応に用いていることから, *in vitro* で得られた知見が *in vivo* へ適用可能であるか, という点は懸念された. そのため, 著者らが過去に構築した発現系を利用して *in vivo* でも15種のGS類縁体の生産を試みた. *in vitro* と *in vivo* で一貫した結果が得られたことから, 以下の方法論が有効であることが確認された. すなわち, *in vitro* 合成系がGS修飾酵素の基質許容性の検証に有効なシステムであり, それによって *in vivo* で生産が可能な新規類縁体のデザインが容易になる, といえる.

本研究によって, アゾール形成酵素群GodD, GodEの基質認識に X_1 -(S/T/C)- X_2 モチーフが重要であることを見出した. これによって3残基から38残基までのアゾール含有ペプチドが本生合成系によって合成可能であることを示した. 著者らの知る限りでは, 3残基のように短いペプチドは, アゾールを含有するRiPPsでは知られていない. しかしながら, *in vitro* での調製に成功したことから, *in vivo* での生産の可能性が示されただけでなく, 得られる産物の生物活性の検証も可能になると期待される. さらに, *in vitro*, *in vivo* どちらにおいても X_1 -(S/T/C)- X_2 モチーフのうち X_2 に変異を導入した類縁体の生産に成功した. さらに新たにアゾール形成部位を創出することにも成功した. これらのことから, GS生合成系は基質受容能が高く, 類縁体生産へ応用可能であるといえる.

GodD, GodEにより触媒される X_1 -(S/T/C)- X_2 モチーフへのアゾール導入は, 既知のアゾール・アゾリン導入酵素とは異なるユニークなものである. 例えば, パテラミドの生合成においては, PatD, PatGによって2残基ごとにアゾール・アゾリンが導入される. 近年, *in vitro* においてはPatDが連続したS/T/C残基に対してもアゾリンを導入可能であることも示された (Goto *et al.*, 2014). 連続した残基へのアゾール導入は, 天然の生合成系においても知られており, プラントゾリシン生合成酵素BamB, BamC, BamDやチオムラシン生合成におけるTbtE, TbtF, TbtGなどが例として挙げられる. そのため, GodD, GodEによる X_1 -(S/T/C)- X_2 モチーフへのアゾールの導入は, ユニークなモチーフ認識によるアゾール導入酵素例である. しかしながら, 将来同様の酵素は天然からさらに発見され得ると考えられる.

今回構築した試験管内反応系では, デヒドロアラニン形成に必要な二つの要素を, 生産菌内での本来の生合成系とは異なるものに置き換えている. 一つ目はGodGの代わりに用いたLazFである. LazFのN末端領域とGodGの相同性はわずか23%と低いものの, 驚くべきことにLazFはGodGの機能を代替してグルタミン酸の脱離を触媒することができた. このことから, LazFはLPとの相互作用を必要とせず, O-グルタミル化されたセリン・スレオニンからグルタミン酸の脱離を触媒し, デヒドロアラニンを形成するために広く応用可能であることが示唆された. 2つ目の要素は, 大腸菌由来のGlu-tRNA^{Glu}である. GodFはグルタミル化ドメインから構成される酵素であるが, 同様の大腸菌由来のGlu-tRNA^{Glu}への許容性はグルタミル化と脱離の両方を触媒する乳酸菌由来の二機能性酵素NisBにおいても知られている (Ortega *et al.*, 2015). 一方で, 放線菌由来の相同酵素TbtB (Hudson *et al.*, 2015) やMibB (Ortega

In vitro 再構成系を用いたゴドスポリン生合成酵素の解析と合理的な類縁体設計

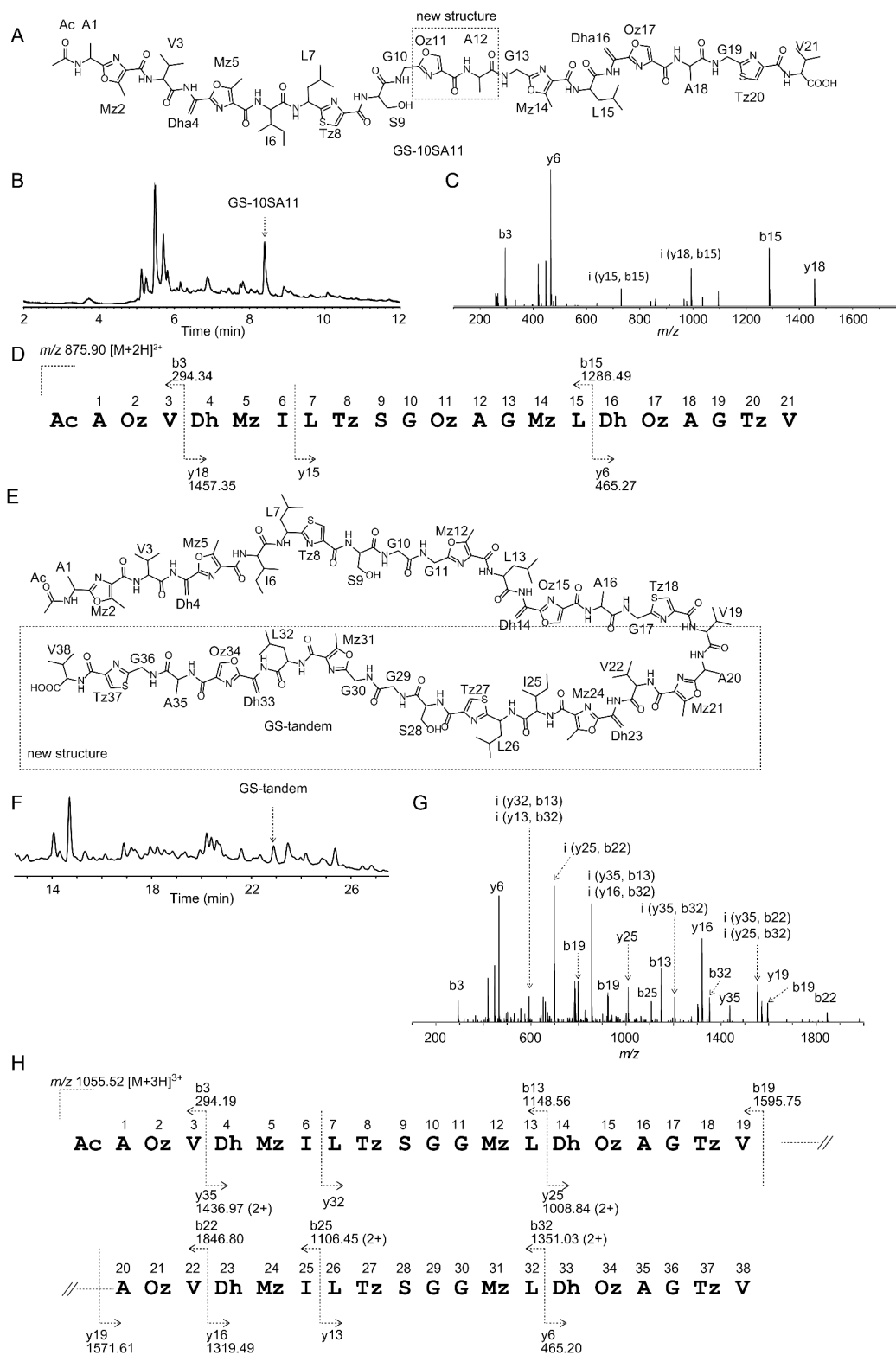


Fig. 5 *In vivo* production of designer GS analogues, GS-10SA11 and GS-tandem. **A.** Structure of GS-10SA11. **B.** Chromatogram extracted at 254 nm shows the production of GS-10SA11. **C.** MS² spectrum of GS-10SA11. **D.** Fragmentation pattern of GS-10SA11. **E.** Structure of GS-tandem. **F.** Chromatogram extracted at 254 nm shows the production of GS-tandem. **G.** MS² spectrum of GS-tandem. **H.** Fragmentation pattern of GS-tandem.

et al., 2016) は、放線菌由来の Glu-tRNA^{Glu}のみを利用し、大腸菌由来の Glu-tRNA^{Glu} は利用できないことが知られている。さらなる解析によって、本酵素ファミリーの Glu-tRNA^{Glu} の許容性が明らかになると期待される。

本研究で確立した試験管内 GS 合成系 (FIT-GS システム) によって、GS 生合成における修飾酵素の認識モチーフに関する知見が容易に得られるようになった。また、*in vitro* で得られた知見は *in vivo* で検証可能であり、GS 類縁体を *in vitro*, *in vivo* どちらでも合成することができる。そのため、GS は擬天然物の創出のための魅力的な骨格であるといえる (Asai et al., 2015; Maini et al., 2016.)。最も重要な点は、FIT システムと翻訳後修飾酵素の組み合わせは、他の RiPPs 生合成系にも適用可能であるということである。それによって、天然物そのものだけでなく自在に設計した分子の生産も容易になることが期待できる。

要 約

ゴードスポリン (GS) は遺伝子の転写と翻訳による前駆体ペプチドの合成と、生合成酵素群による翻訳後修飾反応により生合成される天然ペプチド RiPPs の一種である。RiPPs の生合成酵素には寛容な基質特異性を示すものが多く、また前駆体遺伝子への変異導入によって生合成経路に基質アナログを容易に供給できることから、生合成経路の改変による物質生産に適している。RiPPs の中でも、GS は特徴的な生物活性と、既存の薬剤には知られていない新たな作用機序を有していることから、魅力的な研究対象であるといえる。本研究では、再構成無細胞翻訳系を用いて基質ペプチドを合成し、それを組換えタンパク質を用いた酵素反応に供することで、試験管内で GS 合成することに成功した。さらに、再構成無細胞翻訳系を用いて基質ペプチド類縁体を簡便かつ迅速に合成できる点を生かして、50 種以上の基質アナログを調製し、修飾酵素群の基質受容能を解析し、アゾール形成に必要な配列モチーフ、デヒドロアラニンの形成順序、基質認識に重要な LP 領域等を明らかにした。さらに、アゾール形成に関して得られた知見が、過去に構築した *in vivo* 発現系にも応用可能であることを示し、放線菌を宿主として非天然型 GS を生産することにも成功した。同様の方法論は GS のみならず、他の RiPPs 生合成系にも応用可能であり、本成果を応用して今後様々な生物活性ペプチドを自在に創製することが可能になると期待される。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 岡本悠志, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2015. goadsporn 生合成機構を利用した goadsporn 倍加ペプチドの生産. 日本農芸化学会2015年度大会. 3月27日, 岡山.
- 山下湖奈, 尾崎太郎, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 2015. *Streptomyces* sp. TP-A0584 株由来ゴードスポリン生合成の *in vitro* 再構成. 日本農芸化学会2015年度大会. 3月27日, 岡山.
- 山下湖奈, 尾崎太郎, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 2015. ゴードスポリン生合成の *in vitro* 再構成. 第11回生合成勉強会 (生合成マシナリー第7回若手シンポジウム). 6月20日, 東京.
- 山下湖奈, 尾崎太郎, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 2015. ゴードスポリン生合成の試験管内再構成. 第6回醗酵学フォーラム. 9月6日, 富山.
- 山下湖奈, 尾崎太郎, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 2015. *Streptomyces* sp. TP-A0584 由来ゴードスポリン生合成の試験管内再構成系の確立. 第30回日本放線菌学会. 9月7-8日, 富山.
- Onaka, H. 2015. *In vitro* reconstitution of goadsporn biosynthesis. 18th Japanese-German Workshop Enzyme Technology. 13-15 September, Kyoto, Japan.
- 山下湖奈, 尾崎太郎, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 2016. ゴードスポリンの酵素的全合成. 日本農芸化学会2016年度大会. 3月28日, 札幌.
- Ozaki, T., Yamashita, K., Hayashi, S., Goto, Y., Suga, H., Asamizu, S. & Onaka, H. 2016. *In vivo* and *In vitro* reconstitution of dehydroalanine biosynthesis in goadsporn, a linear azole containing RiPP. SIMB Annual Meeting. 24-28 July, New Orleans, U.S.A.
- 尾崎太郎, 山下湖奈, 下村杜人, 後藤佑樹, 菅井佳宣, 浅水俊平, 菅裕明, 尾仲宏康. 2016. 無細胞翻訳系を利用したゴードスポリン生合成経路の再構成と新規アナログの創製. 第31回日本放線菌学会. 9月8日, 東京.
- 尾仲宏康. 2016. 多段階酵素反応によるリボゾーム翻訳系抗生物質の完全合成. 第18回生体触媒化学シンポジウム in 東京 (日野). 12月21日, 東京.
- 尾仲宏康, 尾崎太郎, 山下湖奈, 後藤佑樹, 下村杜人, 林昌平, 浅水俊平, 菅井佳宣, 菅裕明. 2017. 試験管内完全合成系によるゴードスポリン生合成経路の解析とデザインアナログ創製. 日本農芸化学会2017年度大会. 3月18日, 京都.
- Onaka, H. 2017. Dissection of goadsporn biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogs expressed *in vivo*. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes Workshop 1-1: A3 Foresight Network on Natural Product. 24 May, Korea.
- Onaka, H. 2017. *In vitro* reconstitution of RiPPs biosynthesis by translational-coupled post-translational modification. 9th US-JAPAN Seminar on the Biosynthesis of Natural Products. 30 May, U.S.A.
- 尾仲宏康 (菅井佳宣代理発表). 2017. 多段階連続酵素反応によるペプチド系抗生物質の試験管内完全合成と翻訳後修飾酵素群の基質認識の解明. 第18回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞講演. 6月2日, 愛知.

- 15) 尾仲宏康. 2017. 天然ペプチド生合成系を利用した新規ペプチド薬剤の開発. 低・中分子創薬推進プラットフォーム特別講演. 6月22日. 東京.
- 16) Onaka, H. 2017. *In vitro* reconstitution of RiPPs biosynthesis by translational-coupled post-translational modification. ASP meeting. 31 June, Portland, U.S.A.

原著論文

- 1) Ozaki, T., Kurokawa, Y., Hayashi, S., Oku, N., Asamizu, S., Igarashi, Y. & Onaka, H. 2015. Insights into the biosynthesis of dehydroalanines in goadsporin. *ChemBioChem* **17**: 218-223.
- 2) Ozaki, T., Yamashita, K., Goto, Y., Shimomura, M., Hayashi, S., Asamizu, S., Sugai, Y., Ikeda, H., Suga, H. & Onaka, H. 2017. Dissection of goadsporin biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogues expressed *in vivo*. *Nat. Commun.* **8**: 14207.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって開設された微生物潜在機能探索寄付講座においてなされたものである。本助成を賜った発酵研究所に対して、ここに厚く御礼申し上げます。

再構成無細胞翻訳系を用いた実験については、東京大学大学院理学系研究科菅裕明教授、同後藤佑樹准教授との共同研究により行われたものである。ここに記し、両先生に深く感謝いたします。放線菌生産物の質量分析にご協力いただいた北里大学北里生命科学研究所池田治生教授に感謝の意を表します。

文 献

- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Göransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Müller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süßmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M. & van der Donk, W.A. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 108-160.
- Asai, T., Tsukada, K., Ise, S., Shirata, N., Hashimoto, M., Fujii, I., Gomi, K., Nakagawara, K., Kodama, E.N. & Oshima, Y. 2015. Use of a biosynthetic intermediate to explore the chemical diversity of pseudo-natural fungal polyketides. *Nat. Chem.* **7**: 646-651.
- Deane, C.D., Melby, J.O., Molohon, K.J., Susarrey, A.R. & Mitchell, D.A. 2013. Engineering unnatural variants of plantazolicin through codon reprogramming. *ACS Chem. Biol.* **20**: 1998-2008.
- Dunbar, K.L., Melby, J.O. & Mitchell, D.A. 2012. YcaO domains use ATP to activate amide backbones during peptide cyclodehydrations. *Nat. Chem. Biol.* **8**: 569-575.
- Dunbar, K.L., Chekan, J.R., Cox, C.L., Burkhart, B.J., Nair, S.K. & Mitchell, D.A. 2014. Discovery of a new ATP-binding motif involved in peptidic azoline biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **10**: 823-829.
- Garg, N., Salazar-Ocampo, L. M., & van der Donk, W. A. 2013. *In vitro* activity of the nisin dehydratase NisB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 7258-7263.
- Goto, Y., Ito, Y., Kato, Y., Tsunoda, S. & Suga, H. 2014. One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase. *Chem. Biol.* **21**: 766-774.
- Goto, Y., Katoh, T. & Suga, H. 2011. Flexizymes for genetic code reprogramming. *Nat. Protoc.* **6**: 779-790.
- Haginaka, K., Asamizu, S., Ozaki, T., Igarashi, Y., Furumai, T. & Onaka, H. 2014. Genetic approaches to generate hyper-producing strains of goadsporin: the relationships between productivity and gene duplication in secondary metabolite biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**: 394-399.
- Hayashi, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Ikeda, H., Omura, S., Oku, N., Igarashi, Y., Tomoda & Onaka, H. 2014. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.* **21**: 679-688.
- Hudson, G.A., Zhang, Z., Tietz, J.I., Mitchell, D.A. & van der Donk, W.A. 2015. *In vitro* biosynthesis of the core scaffold of the thiopeptide Thiomuracin. *J. Am. Chem. Soc.* **137**: 16012-16015.
- Koehnke, J., Bent, A.F., Zollman, D., Smith, K., Houssen, W.E., Zhu, X., Mann, G., Leb, T., Scharff, R., Shirran, S., Botting, C.H., Jaspars, M., Schwarz-Linek, U. & Naismith, J.H. 2013. The cyanobactin heterocyclase enzyme: a processive adenylation that operates with a defined order of reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**: 13991-13996.
- Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1045-1053.
- Li, Y.M., Milne, J.C., Madison, L.L., Kolter, R. & Walsh, C.T. 1996. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* **274**: 1188-1193.
- Maini, R., Umemoto, S. & Suga, H. 2016. Ribosome-mediated synthesis of natural product-like peptides via cell-free translation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **34**: 44-52.
- Melby, J.O., Li, X. & Mitchell, D.A. 2014. Orchestration of enzymatic processing by thiazole/oxazole-modified microcin dehydrogenases. *Biochemistry* **53**: 413-422.
- Milne, J.C., Roy, R.S., Eliot, A.C., Kelleher, N.L., Wokhlu, A.,

- Nickels, B. & Walsh, C.T. 1999. Cofactor requirements and reconstitution of microcin B17 synthetase: a multienzyme complex that catalyzes the formation of oxazoles and thiazoles in the antibiotic microcin B17. *Biochemistry* **38**: 4768-4781.
- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**: 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Ortega, M.A., Hao, Y., Walker, M.C., Donadio, S., Sosio, M., Nair, S.K. & van der Donk, W.A. 2016. Structure and tRNA specificity of MibB, a lantibiotic dehydratase from actinobacteria involved in NAI-107 biosynthesis. *Cell Chem. Biol.* **23**: 370-380.
- Ortega, M.A., Hao, Y., Zhang, Q., Walker, M.C., van der Donk, W.A., Nair, S.K. 2015. Structure and mechanism of the tRNA-dependent lantibiotic dehydratase NisB. *Nature* **517**: 509-512.
- Ozaki, T., Kurokawa, Y., Hayashi, S., Oku, N., Asamizu, S., Igarashi, Y. & Onaka, H. 2015. Insights into the biosynthesis of dehydroalanines in goadsporin. *ChemBioChem*. **17**: 218-223.
- Ozaki, T., Yamashita, K., Goto, Y., Shimomura, M., Hayashi, S., Asamizu, S., Sugai, Y., Ikeda, H., Suga, H. & Onaka, H. 2017. Dissection of goadsporin biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogues expressed *in vivo*. *Nat. Commun.* **8**: 14207.
- Reyna-González, E., Schmid, B., Petras, D., Süßmuth, R.D. & Dittmann, E. 2016. Leader peptide-*in vitro* reconstitution of microviridin biosynthesis enables design of synthetic protease-targeted libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**: 9398-9401.
- Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G. & Ravel, J. 2005. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 7315-7320.
- Tianero M.D., Donia, M.S., Young, T.S., Schultz, P.G. & Schmidt, E.W. 2012. Ribosomal route to small-molecule diversity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**: 418-425.
- Vetting, M.W., S. de Carvalho, P.S., Yu, M., Hegde, S.S., Magne, S., Roderick, S.L. & Blanchard, J.S. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**: 212-216.
- Zhang, F. & Kelly, W.L. 2012. *In vivo* production of thiopeptide variants. *Methods Enzymol.* **516**: 3-24.
- Zhang, Q. & Liu, W. 2013. Biosynthesis of thiopeptide antibiotics and their pathway engineering. *Nat. Prod. Rep.* **30**: 218-226.

ゲノム探索による 32 員環新規チオペプチドラクタゾールの発見

林 昌平¹⁾, 尾崎 太郎²⁾, 浅水 俊平, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles.

Shohei Hayashi¹⁾, Taro Ozaki²⁾, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka

Laboratory of Microbial Metabolic Potential,

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Although more than 100 thiopeptides have been discovered, the number of characterized gene clusters involved in their biosynthesis is lagging. We use genome mining approach to discover a silent thiopeptide biosynthetic gene cluster responsible for biosynthesis of lactazoles. Lactazoles are structurally unique thiopeptides with a 32-membered macrocycle and a 2-oxazolyl-6-thiazolyl pyridine core. We demonstrate that lactazoles originate from the simplest cluster, containing only six unidirectional genes (*lazA* to *lazF*). By gene disruption experiment, we show that *lazC* is involved in the macrocyclization process, leading to central pyridine moiety formation. Substitution of the endogenous promoter with a strong promoter results in an approximately 30-fold increase in lactazole A production and mutagenesis of *lazA* precursor gene in production of two analogs. Lactazoles do not exhibit antimicrobial activity but may modulate signaling cascades triggered by bone morphogenetic protein. Our report demonstrates that genome mining is a powerful strategy that can be applied to uncover biosynthetic pathways for natural drug products.

Key words: biosynthesis, RiPPs, *Streptomyces*, heterologous expression, macrocyclization

緒 言

チオペプチドは主に放線菌によって生産される含窒素六員環（ピリジンもしくはピペリジン）を要したマクロ環と硫黄を多く含む高度に修飾されたRiPPs（Ribosomally-synthesized and Post-translationally modified Peptides）の一種である。生合成の過程でゴードスポリン（GS, goadsporin）と同様に前駆体ペプチドが修飾反応を受けてデヒドロアラニン（dehydroalanines,

Dha)/デヒドロブチリン（dehydrobutyrines, Dhb）やアゾール・アゾリンが形成される。その後、2つのDhaが[4+2]環化付加反応により含窒素六員環が形成されると予想されている（Bycroft & Gowland, 1978）。多くのチオペプチドはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌を含むグラム陽性細菌の生育を阻害するため、医薬のリード化合物として期待されている。

これまでに100種類以上のチオペプチド化合物が報告されており、いくつかの生合成遺伝子クラスターも同定されている（Bagley *et al.*, 2005; Li & Kelly, 2010）。近年ゲノム解析技術が向上し、ゲノム解読株が増えるに従い、幅広い微生物の中で休眠状態下にあるチオペプチド生合成遺伝子クラスターが数多く同定されている（Li *et al.*, 2012; Wieland Brown *et al.*, 2009）。また、*Streptomyces* 属放線菌が生産するRiPPsの報告は多く、我々も *Streptomyces* sp. TP-A0584 からGS生合成遺伝子クラスターをクローニングしている（Onaka *et al.*, 2005）。*Streptomyces* 属放線菌を用いた異種発現の宿主ベクター系の開発が進み、休眠遺

¹⁾現 島根大学生物資源科学研究科

²⁾現 北海道大学理学研究院

E-mail: 林 昌平: shohaya@life.shimane-u.ac.jp

尾仲宏康: aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者: 大村 智 (北里大学・北里生命科学研究所),

供田 洋 (北里大学・薬学研究科),

池田 治生 (北里大学・北里生命科学研究所),

奥 直也 (富山県立大学工学部),

五十嵐康弘 (富山県立大学工学部)

伝子クラスターの異種発現による代謝産物の同定が可能になってきている。しかしながら、休眠遺伝子クラスターによって生産されるチオペプチドはこれまで報告されていない。

本研究では、ゲノム情報からチオペプチド生合成遺伝子クラスターを探索し、ラクタシスチン生産菌である *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519 ゲノム中に存在する、休眠状態にあるチオペプチド生合成遺伝子クラスターを同定し、*Streptomyces lividans* TK23 を用いた異種発現によりラクタゾール A, B, C を同定した。

実験方法

ゲノムマイニングと *laz* クラスターのクローニング

S. lactacystinaeus OM-6519 のドラフトゲノムは Illumina GA-II (Illumina, CA, USA) を用いて解析した。チオペプチド遺伝子クラスターは *godF*, *godD*, *godG* の配列をクエリーに BLAST 検索を行うことで探索した。FramePlot 4.0 beta (<http://nocardia.nih.gov/fp4/>) を用いて ORF の推定を行い、それらを BLAST 検索し既知のタンパク質と比較することで機能を推定した。

S. lactacystinaeus OM-6519 のコスミドライブラリーを構築するために、ゲノム DNA を Sau3AI で消化し pKU465cos の BamHI サイトにライゲーションした (Komatsu *et al.*, 2010)。 λ -packaging mixutre を用いてパッケージングと大腸菌 DH5 α への形質転換を行なった。*laz* クラスターを含むコスミド pKU465-ltc18-6C は 2 種類のプライマーを用いた PCR によりスクリーニングした。pKU465-ltc18-6C を *S. lividans* TK23 に形質転換することで *S. lividans* ltc18-6C 株を取得した。

HPLC 分析用サンプル調製

各株を 10mL の V-22 培地に植菌し 30°C, 2 日間振盪培養することで前培養を行なった。その後 100mL の A-3M 培地もしくは GS 培地に 3mL の前培養液を添加し、30°C, 5 日間振盪培養した (Onaka *et al.*, 2001)。4mL の培養液を 5mL の *n*-ブタノールで抽出し、溶媒を留去した後ジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解した。HPLC 分析は HP1100 (Hewlett-Packard, CA, USA) システムと C18 Rainin Microsorb カラム (3 μ m, 4.6 \times 100, Rainin Instrument, MA, USA) を用いた。移動相には アセトニトリルと 0.15% KH₂PO₄ (pH3.5) を用い、1.2mL/min の流速で 22 分間かけてアセトニトリル濃度を 15% から 85% に直線的に上げることで溶出させた。ラクタゾールは保持時間と 254nm の UV 吸収を指標に検出した。質量分析はイオントラップ型質量分析計 amaZon (Bruker Daltonics, MA, USA) を用いた。

ラクタゾールと Δ *lazC* 株代謝産物の精製

3L の培養液を 8,000rpm で 10min 遠心し、沈殿した菌体を 3L のメタノールで 3 回抽出した。回収したメタノール画分の溶媒を留去し、水で再溶解後、60% メタノール-ジクロロメタンで分配した。60% メタノール画分を回収し *n*-ブタノールで再抽出し、溶媒を留去後、1.6g の粗抽出物を取得した。DMSO で再溶解し Sephadex LH-20 ゲルろ過カラムで分画後、目的化合物が含まれる画分を HPLC で確認した。目的化合物が含まれる画分を回収し、逆相 ODS カラム (75 μ m, Cosmosil 75 C₁₈-PREP, ナカライテスク; Japan) を用いて精製を行なった。目的化合物を回収後、1200 シリーズ (Agilent, CA, USA) の HPLC と Cosmosil 5PE-MS (5 μ m, 10 \times 250mm, ナカライテスク) を用いて分取を行なった。その結果、ラクタゾール A, ラクタゾール B, ラクタゾール C, Δ *lazC* 株代謝産物をそれぞれ 6.7mg, 2.7mg, 0.7mg, 2.5mg 取得した。

ラクタゾールの構造解析

NMR スペクトルは DMSO-*d*₆ 溶媒中で Bruker AVANCE 500 (Bruker) もしくは JEOL ECA-600 (JEOL, Japan) を用いて取得した。精密質量は Time-of-Flight MS (Xevo G2-S; Waters, UK) を用いてポジティブ ESI モードで測定した。

laz 遺伝子の破壊実験

各 *laz* 遺伝子の破壊は二重交差破壊で行なった。大腸菌-放線菌シャトルベクターである pTYM19 の ϕ C31int 領域を削除して作製した pTYM19Xint をベースに各遺伝子 (*lazA*, *lazB*, *lazC*, *lazD*, *lazE*, *lazF*, *ltc74*, *ltc66*) 破壊用プラスミドを作製した (Onaka *et al.*, 2003)。各遺伝子の上流, 下流 2.0kb を PCR でクローニングし、pTYM19Xint のマルチクローニングサイトに導入した。*S. lividans* ltc18-6C に対してこれら遺伝子破壊用プラスミドを形質転換し、各遺伝子破壊株を取得した。

ラクタゾールの生理活性試験

ラクタゾールの抗菌活性は 8 種の指示菌 (*Staphylococcus aureus* FDA209P JC-1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptomyces lividans* TK23, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Saccharomyces cerevisiae* S100, *Candida albicans* A9540, *Penicillium chrysogenum* NBRC 6223) を用いて評価した。5mm 径のペーパーディスクに 0.04mg のラクタゾールを染み込ませ、Luria broth glucose 寒天培地上で 30°C, 3 日間培養した。

造骨細胞 C2C12 (R206H) のアルカリホスファターゼ阻害活性は造骨細胞の分化阻害活性にて評価した (Fukuda *et al.*, 2012)。

ラクタゾール高生産株の作製

高発現プロモーターである *godA* プロモーターを利用するために、 ϕ K38-1 インテグラーゼ、アブラマイシン耐性遺伝子、*godA* プロモーター領域を持つ放線菌-大腸菌シャトルベクター pTYM3ga を作製した。3 断片に分割した *laz* クラスターと pTYM3ga ベクターをそれぞれ PCR で増幅し、ギブソンアセンブリー法により pTYM3ga-*lazAF* を調製した (Gibson *et al.*, 2009)。これを *S. lividans* TK23 に形質転換することで *godA* プロモーターによって *laz* クラスターが高発現する変異株を作製した。

ラクタゾールアナログの生産

lazA の配列を置換するために、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA) を用いて pTYM1ga-*lazA* 上の *lazA* 遺伝子に塩基置換を導入した。これにより 2 番目の Trp を Ser に置換した pTYM1ga-*lazA* W2S と 11 番目の Ser を Cys に置換した pTYM1ga-*lazA* S11C を作製した。また、*godA* プロモーター下流に *lazB* から *lazF* の領域を結合させた異種発現用プラスミド pTYM19 gt-*lazBF* を作製し、*S. lividans* TK23 に形質転換した。この *S. lividans* *lazBF* 株に変異 *lazA* 遺伝子を含むプラスミドを導入し、*S. lividans* W2S と *S. lividans* S11C を作製した。

結 果

休眠状態にあるチオペプチド遺伝子クラスターのゲノムマイニングと異種発現

チオペプチドの構造中に見られる Dha/Dhb はランチペプチドの生合成過程においても生成することから、生合成酵素は類似していることが予想された。そこで GS 生合成に関与する class I ランチペプチド脱水酵素遺伝子 *godF* の配列をクエリーに *S. lactacystinaeus* OM-6519 のドラフトゲノムを探索したところ、チオペプチド生合成に関与すると予想される遺伝子クラスターを見出した。このクラスター内にはアゾール環の形成に関与すると予想される cyclodehydratase, nitroreductase, SpaB ホモログを含んでおり、さらに前駆体ペプチドと予想される構造遺伝子も見出された (Fig. 1)。FlamePlot 解析から、このクラスターは 6 つの ORF からなる事が示され、それぞれ *lazA*, *lazB*, *lazC*, *lazD*, *lazE*, *lazF* と名付けた。

S. lactacystinaeus OM-6519 の代謝産物からチオペプチド系化合物は見出されていなかったため、この *laz* クラスターを *S. lividans* TK23 株に導入し異種発現を試みた。まず *S. lactacystinaeus* OM-6519 のゲノムからコスミドライブラリーを構築し、そこから *laz* クラスターを含む pKU465-ltc18-6C を単離した。このコスミドを導入した

S. lividans ltc 18-6C の代謝産物を解析したところ、コントロールでは見られない代謝産物が確認された (Fig. 2a)。

ラクタゾールの単離同定

上記代謝産物を同定するために、異種発現株を大量培養し、抽出物から単離精製を行なった。3L 培養から回収した菌体をメタノールで抽出し、各種クロマトグラフィーにより代謝産物を単離し、最終的にラクタゾール A (6.7mg)、ラクタゾール B (2.7mg)、ラクタゾール C (0.7mg) をそれぞれ取得した。

高分解能質量分析計、各種一次元、二次元 NMR 測定によりラクタゾール類の構造を決定した (Fig. 3a)。生産量が最も多かったラクタゾール A は高分解能質量分析において m/z 1401.3975 [M+H]⁺ を示し、その化学式は C₆₁H₆₄N₁₈O₁₆S₃ と予想された。一次元 NMR 解析から、ペプチド化合物であることが示唆され、各種二次元 NMR 解析から構成するアミノ酸残基やアミノ酸どうしのつながりが観察された。特に、メチン由来シグナル (δ 8.34-8.71) から 4 級炭素 (δ 139.72-173.24) への HMBC 相関から 4 つのアゾール環の存在が示された。さらに、2 つのメチン由来シグナル (δ 8.11, 7.37) から 4 級炭素 (δ 131.80-167.31) とカルボニル炭素 (δ 166.74) への HMBC 相関から 3 置換ピリジン環が示され、そのうちの 1 つは Trp 残基であることが示された。NMR 解析から示されたラクタゾール A の構造と前駆体ペプチドの C 末端の配列が一致したことからも、構造解析結果が支持された (Fig. 4)。以上の結果から、ラクタゾール A は 11 残基のアミノ酸からなるマクロ環、一つのオキサゾール環と 3 つのチアゾール環、2 つの Dha、2, 3, 6 位が置換されたピリジン環を持つペプチドであることが示された。ピリジン環の 2, 3, 6 位にはそれぞれオキサゾール、トリプトファン、チアゾールが結合している。質量分析計による MS/MS フラグメントパターンも構造解析結果と一致していた。

マイナー生産物として精製したラクタゾール B、ラクタゾール C についても解析を行なった。これら化合物は UV スペクトルが類似しており、構造類縁体と予想された。高分解能質量分析結果から、ラクタゾール B はラクタゾール A の C 末端に Gln 残基が付加したもので、ラクタゾール C はラクタゾール A の C 末端の Gln と Pro 残基が欠除したものであることが示された。ラクタゾール A, B, C はいずれも Chemical Abstracts Service データベースに登録されておらず、新規化合物だった。

ラクタゾール生合成遺伝子クラスターの同定

ラクタゾール生合成に必須の遺伝子セットを同定するためにサブクローニングと遺伝子破壊実験を行った。*laz* クラスターの上流、下流に隣接する遺伝子 *ltc74* と

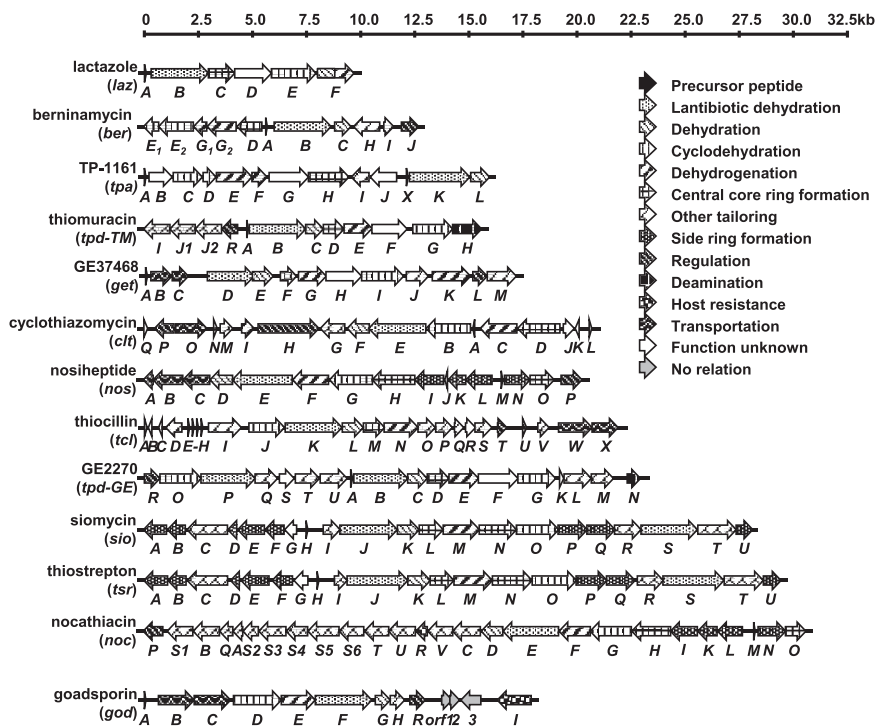


Fig. 1 Gene organizations of the *laz* cluster and other thiopeptide biosynthetic gene clusters

Lactazole (*laz*), TP-1161 (*tpa*) (*Nocardiopsis* sp. TFS65-07), GE37468 (*get*) (*Streptomyces* sp. ATCC 55365), GE2270A (*tpd_GE*) (*Planobispora rosea*), thiostrepton (*tsr*) (*Streptomyces laurentii* ATCC 31255), cyclothiazomycin (*clt*) (*Streptomyces hygroscopicus* 10-22), thiomuracins (*tpd_TM*) (*Nonomuraea* species), thiocillin (*tcl*) (*Bacillus cereus* ATCC 14579), siomycin (*sio*) (*Streptomyces sioyaensis* ATCC 13989), berninamycin (*ber*) (*Streptomyces bernensis* UC 5144), nosiheptide (*nos*) (*Streptomyces actuosus* ATCC 25421), nocathiacin (*noc*) (*Nocardia* sp. ATCC202099), and goadsporin (*god*) (*Streptomyces* sp. TP-A0584). The deduced functions are labeled in pattern.

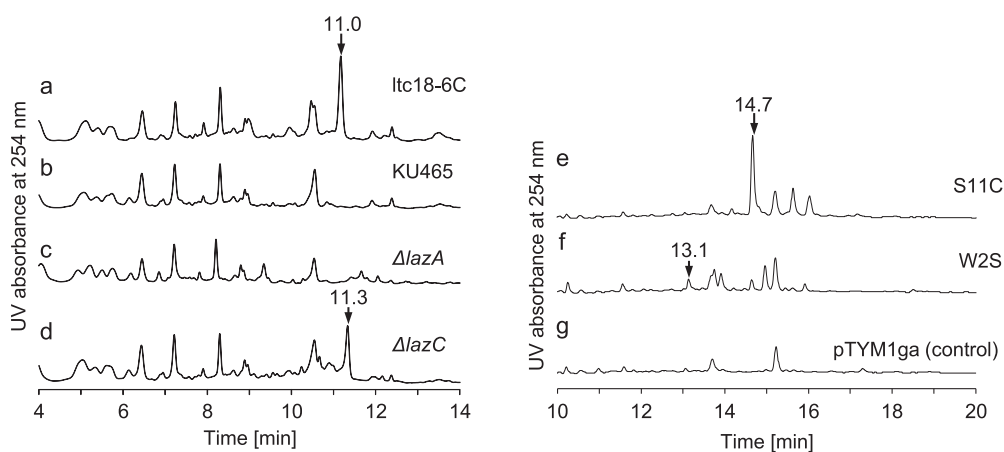


Fig. 2 HPLC analysis of lactazoles and the expression of related compounds in heterologous hosts

- S. lividans* ltc18-6C containing whole *laz* cluster. The arrow indicate the lactazole A (11.0 min).
- S. lividans* KU465 harboring pKU465 as a negative control.
- S. lividans* $\Delta lazA$ (the *lazA* disruptant).
- S. lividans* $\Delta lazC$ (the *lazC* disruptant). The arrow indicate a compound accumulated in $\Delta lazC$ (11.3 min).
- S. lividans* S11C produces the Ser11Cys analog (14.7 min).
- S. lividans* W2S produces the Trp2Ser analog (13.1 min).
- S. lividans* pTYM1ga containing pTYM1ga as a negative control.

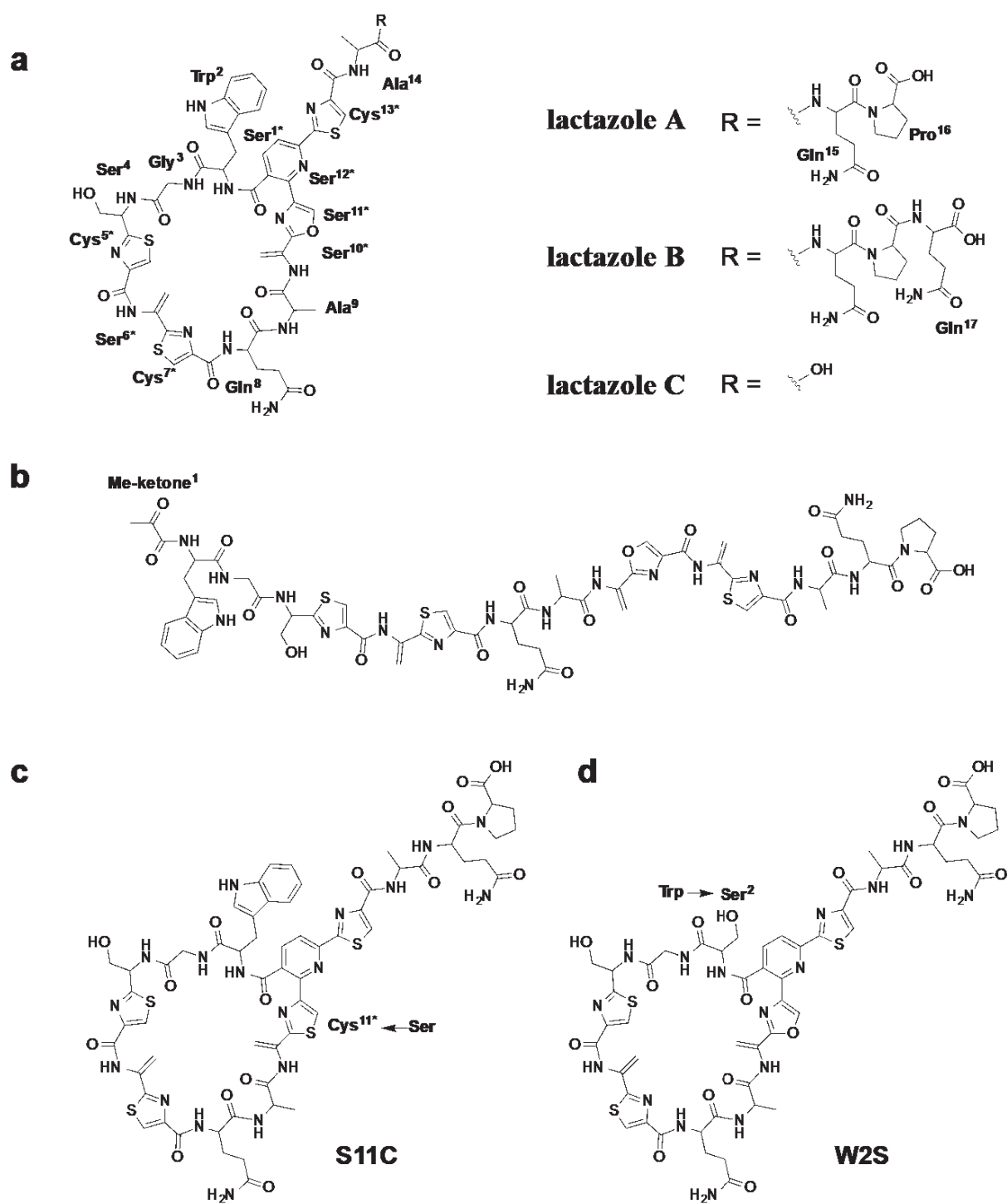


Fig. 3 Chemical structures of the lactazoles and the related compounds
 (a) Lactazole A, B, and C.
 (b) A compound that accumulates in the *ΔlazC* strain.
 (c) Lactazole analog S11C. Cys11 is posttranslationally modified.
 (d) Lactazole analog W2S.

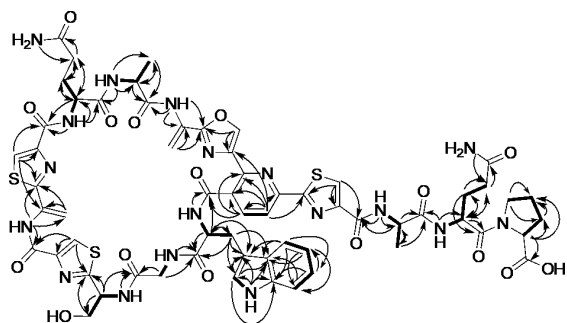


Fig. 4 DQF-COSY and HMBC correlations for a compound accumulated in $\Delta lazC$ mutant.

ltc66 をそれぞれ破壊した異種発現株においてもラクタゾールの生産が確認されたことから、これら遺伝子はラクタゾール生合成に必須ではないことが示された。必須な遺伝子を同定するために *lazA-lazF* の領域を PCR によりクローニングし、*S. lividans* で発現させた。その結果、ラクタゾールの生産が確認されたことから、生合成にはこれら 6 つの遺伝子で十分であることが示された。

lazA がコードする 57 アミノ酸残基からなる前駆体ペプチドはこれまでに報告されているチオペプチド前駆体ペプチドとは相同性を示さなかった (Fig.5)。LazB は GS の生合成に関与しランチペプチドの脱水反応を触媒

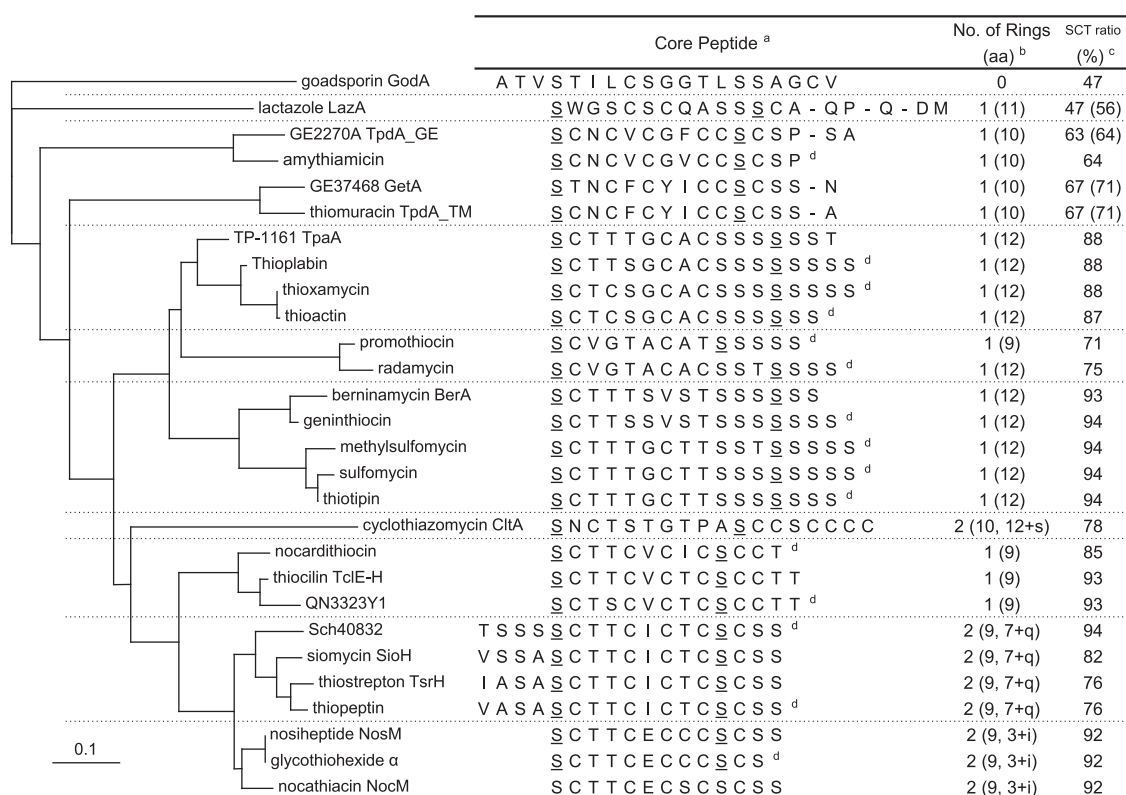


Fig. 5 Phylogenetic analysis of the core peptide amino acid sequences and comparison with other thiopeptides and goadsporin.

^aAlignment of the core peptide amino acid sequences is shown. Amino acid residues that participate in the formation of the main ring containing the central N-containing heterocyclic domain are underlined. The C-terminal cleavage sites in lactazole, GE37468, thiomuracin, and GE2270A are indicated by hyphens. The core peptides in goadsporin (GodA) (*Streptomyces* sp. TP-A0584) and in thiopeptide precursors, lactazole (LazA), GE2270A (TpdA_GE) (*P. rosea*), GE37468 (GetA) (*Streptomyces* sp. ATCC 55365), thiomuracins (TpdA_TM) (*Nonomuraea* species), TP-1161 (TpaA) (*Nocardioopsis* sp. TFS65-07), berninamycin (BerA) (*S. bernensis* UC 5144), cyclothiazomycin (CltA) (*S. hygroscopicus* 10-22), thiocillin (TcE-H) (*B. cereus* ATCC 14579), siomycin (SioH) (*S. siomyaensis* ATCC 13989), thiostrepton (TsrH) (*S. laurentii* ATCC 31255), nosiheptide (NosM) (*S. actuosus* ATCC 25421), and nocathiacin (NocM) (*Nocardia* sp. ATCC202099), are shown.

^bThe number of macrocycles in thiopeptides is shown, with the number of amino acid residues that form the macrocycle given in parentheses (submacrocycles bridged by sulfide, quinaldic acid, and indole are indicated by s, q, and i, respectively).

^cSer, Thr, and Cys (SCT) ratios in the core peptides are shown. The ratios except for C-terminal cleavage amino acids in lactazole A, GE37468, thiomuracin, and GE2270A are given in parentheses.

^dPutative precursor sequences proposed from the chemical structures

する GodF と相同性を示した (identity 23.5%). LazE は GodD と 22.1% の identity を示し, アゾリン形成に関与する YcaO ドメインの C 末端を含んでいた. LazF は N 末端側のランチビオティック酵素ドメインと C 末端のフラビン依存脱水素酵素ドメインからなるタンパク質で, N 末端側は GodG と, C 末端側は GodE とそれぞれ相同性を示した. これらの配列情報から, LazF は Dha 形成と azoline の脱水素反応を触媒する二機能性酵素であることが予想された. LazC と LazD は相同性検索からは機能を推定することができなかった. マクロ環化反応以外の翻訳後修飾酵素は LazB, E, F と予想できることから, LazC と LazD はマクロ環化反応に関与してい

ると予想された (Table 1).

これら生合成酵素の機能を解析するために各生合成遺伝子を破壊し, その代謝産物を解析したが, *lazA*, *lazB*, *lazD*, *lazE*, *lazF* の破壊株培養液からは lactazole 関連化合物は見出されなかった (Fig. 2c). 対象的に *lazC* 破壊株 (*S. lividans* $\Delta lazC$) の培養抽出物中からは新たなピークが観察された. 質量分析の結果, m/z 1,437.4150 [M+H]⁺ のピークが観察され (Fig. 2d), 化学式が C₆₁H₆₈N₁₈O₁₈S₃ (理論値 1,437.4199 [M+H]⁺) であることが予想された.

lazC 破壊株代謝産物の構造解析

S. lividans $\Delta lazC$ 培養抽出物中に観察された化合物の

Table 1 Deduced genes and their proposed functions in *laz* cluster and the surrounding region

Gene	a.a.	Putative function	Pfam prediction	Homologous gene (Origin)	Identity (%)	Accession No.
<i>lzc74</i>	857	-	n. d.	serine/threonine protein kinase (<i>S. griseus</i> XylebKG-1)	50	ZP_08233747
<i>lazA</i>	57	precursor peptide	-	-	-	-
<i>lazB</i>	880	Dha formation	Lantibiotic dehydratase, N-terminus	<i>godF</i> (<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0584)	20	BAE46921
			Lantibiotic dehydratase, C-terminus	<i>tsrJ</i> (<i>Streptomyces laurentii</i> ATCC 31255)	25	ACN80672
<i>lazC</i>	406	[4+2] cycloaddition	-	<i>tclM</i> (<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579)	12	AE016877
<i>lazD</i>	565	Unknown	-	-	-	-
<i>lazE</i>	688	azoline formation	YcaO-like family	<i>godD</i> (<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0584)	21	BAE46919
				<i>sioO</i> (<i>Streptomyces sioyaensis</i> ATCC 13989)	28	ACN80652
<i>lazF</i>	557	Dha formation (11-288)	SpaB C-terminal domain	<i>godG</i> (<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0584)	19	BAE46922
		azole formation (362-547)	Nitroreductase family	<i>godE</i> (<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0584)	26	BAE46920
<i>lzc66</i>	117	-	n. d.	peptidase S24/S26A/S26B, conserved region (<i>Niastella koreensis</i> GR20-10)	33	AEW02165
<i>lzc65</i>	275	-	n. d.	creatininase (<i>Polymorphum gilvum</i> SL003B-26A1)	46	YP_004304855

構造を決定するために精製を行なった。2.4Lの培養液から回収した菌体をメタノールで抽出した後、ラクタゾール類と同様の精製行程を経て、2.5mgの精製品を得た。NMRと質量分析結果から、この化合物はラクタゾールAと同じ15残基のアミノ酸からなり、マクロ環化以外の修飾反応を完全に受けた直鎖状の化合物であることが示された (Fig.3b)。

この化合物はピリジン環に由来する2つのプロトンシグナル (δ 8.11, 7.37) が消失していたことから、マクロ環化反応を受けず直鎖状態を維持していたと考えられた。325nmのUV吸収が消失していたこともこの推測を裏付けていた。同様の結果がチオペプチドの一種であるチオシリン合成研究でも観察されている (Bowers *et al.*, 2010)。本化合物はピリジン環に由来するシグナルが消失した一方で、ピリジン環形成の土台となるDha残基に由来するシグナルが¹H-NMRから観察された (δ 6.24, 5.75 : Dha6, δ 5.90, 5.85 : Dha10, δ 6.18, 5.75 : Dha12)。HMQCとHMBCスペクトルからもDhaの存在が確認された。

Dhaのシグナルに加えて特徴的なメチルプロトンのシグナルがシングレットで観察された (δ 2.20)。このシグナルがカルボニル炭素と相関していたことから、N末端にメチルケトン構造が存在することが示唆された。これはN末端のDha残基が互変異性と加水分解を受けて形成されたと予想された。そのため、*lazC*破壊株で蓄積した化合物はSer1, Ser6, Ser10, Ser12がDhaへと変換されたことが示唆された。

ラクタゾールの生理活性

ラクタゾールは試験した菌 (*S. aureus* FDA209P JC-1, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. lividans* TK23, *M. luteus* ATCC 9341, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. cerevisiae* S100, *C. albicans* A9540, *P. chrysogenum* NBRC 6223) に対して抗菌活性を示さなかった。しかしながら進行性骨化性線維異形成症に対するスクリーニングにおいて、ラクタゾールが造骨細胞C2C12 (R206H) のアルカリホスファターゼ活性を阻害することを発見した。その50%阻害濃度はラクタゾールA, B, Cでそれぞれ101, 116, 93.5 μ Mであり、200 μ g/mL以下の濃度では細胞毒性は観察されなかった。このことから、ラクタゾールは骨誘導因子によって誘起されるシグナルカスケードを分子標的としていることが示唆された。

遺伝子工学によるラクタゾール高生産化

laz クラスターは9.8kbからなり、全ての遺伝子がギャップなく同じ向きで並んでいる (Fig.1)。このことから、*laz* クラスターは*lazA* プロモーターによって発

現制御されていることが示唆された。このクラスターによって生産されるラクタゾールの生産性は12.9mg/Lだが、*godA* プロモーターの制御により生産されるGSの生産量は342.7mg/Lであると報告されている (Haginaka *et al.*, 2014)。そのため、*lazA* プロモーターを*godA* プロモーターに置換することでラクタゾール生産性が向上すると予想した。プロモーターを置換した異種発現株は予想通りラクタゾールを高生産し、その生産量はGS培地を使用した際に最大で383.8mg/Lに達した (Fig.6)。

アミノ酸置換によるラクタゾールAアナログの創製

翻訳後修飾酵素がアナログ基質に対しても認識することができるかどうかを評価するために*lazA* に対して部位特異的変異を導入した。アナログを生産するために、前駆体ペプチド (*lazA*) 過剰発現用プラスミド pTYM1gp + *lazA* と翻訳後修飾酵素 (*lazB* から *lazF* までのオペロン) 過剰発現用プラスミド pTYM19gp + *lazBF* を構築した。両プラスミドを *S. lividans* の染色体に導入し、*godA* プロモーターにより発現されるようにした。また、*lazA* に対して部位特異的変異導入を行い2つのアナログ (Ser11Cys, Trp2Ser) が発現される株をそれぞれ作製した (Fig.2e, f)。Ser11Cysを発現させた *S. lividans* の培養液から m/z 1417.3788 [M+H]⁺ を示す化合物が検出された。この化合物はラクタゾールAよりも16.0Da大きかったことから、酸素原子が硫黄原子に置き換わったことが示された。MS/MS解析から、ピリジンの2位に結合している残基がオキサゾールからチアゾールへと変化していたことが確かめられた (Fig.3c)。Trp2Serを発現させた株からは m/z 1302.3478 [M+H]⁺ を示す化合

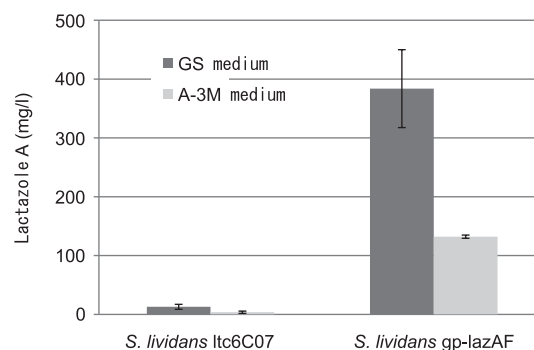


Fig. 6 Lactazole production by promoter substitution of *laz* cluster in GS and A-3M Media

S. lividans ltc6C07: *laz* cluster expressed under original promoter. *S. lividans gp-lazAF*: *laz* cluster expressed under *godA* promoter. Seven day culture broth was analyzed. Each value shows the mean \pm SD of triplicate values from a representative experiment.

物が検出された。MS/MS フラグメント解析から、大きく性質の異なるアミノ酸の置換にも関わらず Trp2Ser アナログもマクロ環化反応を受けたことが示唆された (Fig. 3d)。

考 察

本研究ではゲノムマイニング手法を用いて *S. lactacystinaeus* OM-6519 から休眠状態にあるチオペプチド生合成遺伝子クラスターを同定した。LazA の系統樹解析をしたところ、LazA が既知のチオペプチド前駆体ペプチドのクレードに属さなかったことから、*lazA* が他の既知のチオペプチド前駆体遺伝子とは独立して進化してきたことが示唆された (Fig. 5)。実際に翻訳後修飾を受ける LazA の Ser, Thr, Cys 残基の割合は 56% と既知のチオペプチドファミリーの中で最も低い。さらに LazA コアペプチドには Trp と Gln 残基が含まれるが、他のチオペプチド前駆体にはこれら残基は含まれていない。このようなユニークな特徴に着目し解析に取り組んだが、実際にこのクラスターを異種発現し代謝産物を解析したところ、非常にユニークなチオペプチドの生産に関与していた。

既知のチオペプチドは 9, 10 もしくは 12 残基のアミノ酸からなるマクロ環を有しているが、予想外なことにラクタゾールは 11 残基からなるマクロ環を有していた。したがって、ラクタゾールのマクロ環は天然に存在するマクロ環骨格に新たな多様性を付加するものと考えられる。また、これまでに 2,3,6-trithiazolylpyridine を持つチオペプチドは報告されていたが、3 位が高高い Trp に置換されている 2-oxazolyl-6-thiazolylpyridine 骨格はラクタゾールの構造中で特徴的である。さらに C 末端のアミノ酸残基が異なるラクタゾール B, C も発見した。このような C 末端のバリエーションは他のチオペプチドでは報告されておらず、これは異種宿主に存在するペプチダーゼの働きによって生じたものと予想している。

多くのチオペプチドはグラム陽性細菌に対する生育抑制活性を持っているが (Bagley *et al.*, 2005)、ラクタゾールは今回試験した菌に対してそのような活性は示さなかった。しかしながら造骨細胞 C2C12 (R206H) のアルカリホスファターゼ活性を阻害することを発見した。今後、ラクタゾールの分子標的を同定することができれば、この新規チオペプチドファミリーの抗生物質としての潜在能力が注目されると考えられる。

ラクタゾール生合成クラスターは全長 9.8kb と非常に小さいため遺伝学的改変に向いていると考えられる。事実、わずか 1 回の PCR 操作でクラスター全体を増幅可能であった。6 つの遺伝子のうち、*lazB*, *lazC*, *lazD*,

lazE はオペロンを形成しており、*lazA-lazB* と *lazE-lazF* の遺伝子間領域はそれぞれ 221, 80bp である。*lazA* プロモーターを、高発現であることが確認されている *godA* プロモーターに置換することでラクタゾールの高生産化を試みたところ、異種発現株において置換前と比較して 29.8 倍の生産性の向上が確認された。

プロモーターの置換による高生産化に加えて、アナログの生産も試みた。修飾酵素の基質寛容性を検証するために、ピリジン環周辺のアミノ酸残基の置換を行なった。その結果、S11C と W2S アナログの生産に成功した。S11C の生産物を解析したところアミノ酸の置換に伴い Ser に由来するオキサゾールが Cys に由来するチアゾールに変化したことが確認され、修飾反応を受けたことが示された。一方で、W2S アナログではオキサゾールへの変換は観察されなかった。このことから、アゾール環形成反応は部位特異的であることが示唆された。

チオペプチド生合成経路におけるマクロ環化反応を生化学的に再現することは難しく、付随する反応も未解明である。*lazC* を破壊したところ直鎖状の化合物を生産したことから、ピリジン環形成に必須であることが示された。同様の直鎖状ペプチドはチオペプチドの一種チオシリンの生合成遺伝子クラスターを破壊した際に観察されている。ピリジン環形成機構に関する考察はチオシリル生合成遺伝子 *tclM* の破壊実験から得られている (Bowers *et al.*, 2010)。TclM は Diels-Alderase と予想されており、マクロ環を持つチオペプチドの遺伝子クラスターで保存されている一方で、直鎖状ペプチドである GS の遺伝子クラスターには存在しない。*tclM* の破壊により直鎖状のペプチドが蓄積することから、TclM が [4+2] 環化付加反応を触媒すると予想されている。*LazC* は TclM と低い類似性しか示さないが、破壊によって蓄積する直鎖状ペプチドは類似している。同様の直鎖状ペプチドは *Planobispora rosea* から GE2270 の生合成中間体誘導体として報告されている (Tocchetti *et al.*, 2013)。この報告で筆者らは C 末端側の修飾反応が完全に進まなかったためにマクロ環化反応が完了しなかったと結論しているが、*lazC* 破壊実験ではマクロ環化反応以外の修飾反応が完全に進行した化合物が蓄積していた。この結果から、我々は *LazC* がラクタゾール生合成経路の最後に TclM と同様 Diels-Alder 縮合を触媒すると結論づけた。

チオペプチド生合成に関する先行論文 (Ding *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2009) と同様に、*laz* 遺伝子の破壊によりラクタゾール生産は完全に消失した。バイオインフォマティクス解析から、*LazB*, *LazE*, *LazF* は Dha とチアゾール/オキサゾールの形成に関与することが予想された。一方で既知の酵素との相同性を示さなかった *LazD* は機能を推定することができなかった (Table 1)。

ラクタゾールの化学構造と遺伝子のアノテーション, そして遺伝子破壊実験からラクタゾール生合成経路を推定した (Fig.7). まず初めに *lazA* が転写され, リボソームにより前駆体ペプチドが翻訳される. 次の Dha とアゾールの形成の順序は不明だが, LazB の触媒する脱水反応により Ser1, Ser6, Ser10, Ser12 が Dha へと変換され, LazE (環化脱水酵素) と LazF (脱水素酵素) により Cys5, Cys7, Cys13 がチアゾールへ, Ser11 がオキサゾールへとそれぞれ変換される. その後 LazC によって触媒される hetero-Diels-Alder 縮合により Dha1 と Dha12 間でピリジン環が形成され, マクロ環が生じると予想される.

本研究で単離したラクタゾールは特徴的な構造を有している. 1948 年の最初の発見以来 100 種類以上のチオペプチドが発見されているが, それらのマクロ環のサイズは全て 26, 29 もしくは 35 員環だった. 一方でラクタゾールはこれまで報告が無かった 32 員環のマクロ環を持っていた. さらにピリジン環の 3 位がアミド結合で

Trp と結合したチオペプチドも初めての発見だった. 本研究からゲノムマイニング手法は天然由来新規薬剤候補化合物の生合成経路発見のための強力な戦略であることが示された. 現在ラクタゾールのコンパクトな遺伝子クラスターのエンジニアリングによるチオペプチド化合物のアナログを創製することで天然物ベースの医薬探索に先鞭を着けることができると期待し, 研究を進めている.

要 約

放線菌は多様な抗生物質を生産することが知られているため, 新規医薬品の礎となる新しい化学構造を有する化合物の探索源となっている. 本研究ではゲノム探索と異種発現手法を用いて, これまでに知られていたものとは化学構造が大きく異なる RiPPs 化合物を発見した. ラクタゾールと命名した本化合物は, 環構造やアミノ酸組成などの点において, これまでに知られているチオペプチドと類似性が低いことが明らかになった. さらに生合

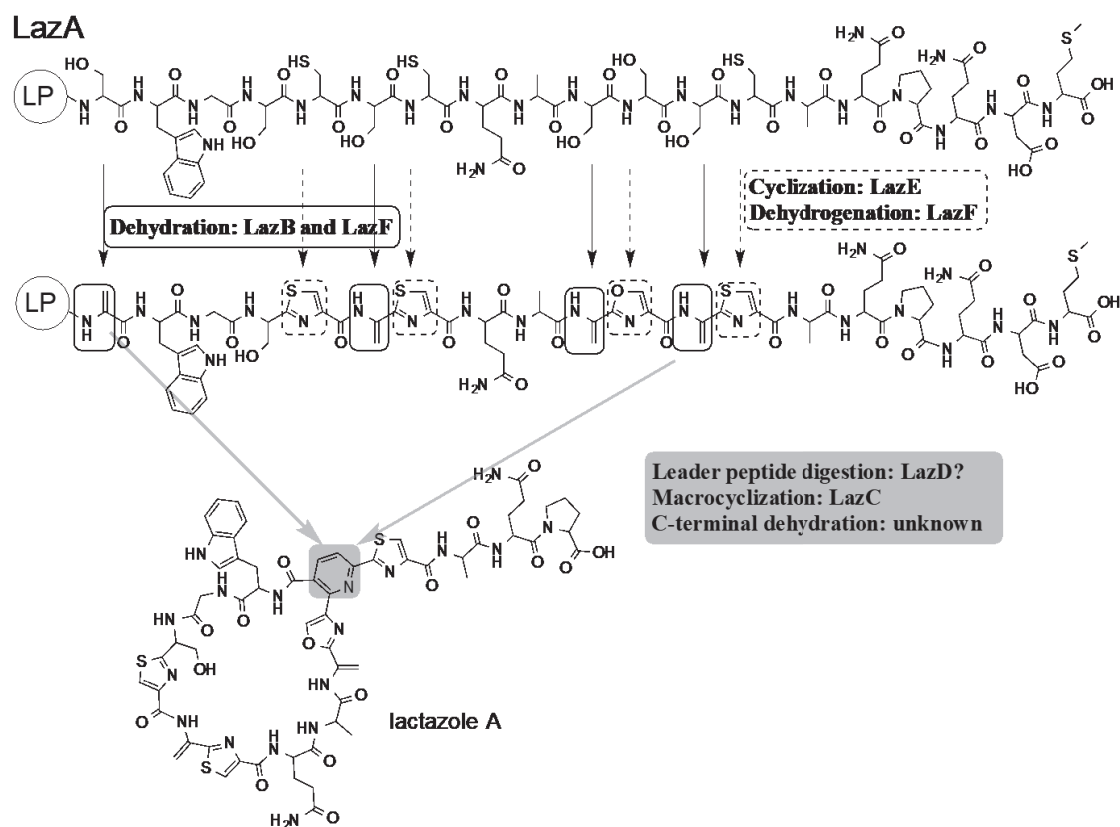


Fig. 7 Proposed lactazole biosynthetic pathway

Line indicates the biosynthesis steps of azole ring formation (solid line), dehydroalanine production (dashed line), and pyridine formation (bold gray). LP, leader peptide.

成に関与する遺伝子がわずか6個で、チオペプチド生合成遺伝子クラスターとして最小だった。また、この化合物は抗菌活性は示さなかったが、骨形成に関与する遺伝子の発現を阻害する活性が認められた。RiPPsは比較的容易に類縁化合物が作製できることに加え、ラクタゾール生合成遺伝子は数が少なく遺伝子の改変が容易であることから、今回の研究成果を基盤としラクタゾールを基にした新規抗生物質の開発を進めている。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 林昌平, 池田治生, 大村智, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康. 2012. *Streptomyces lactacystinaeus* OM-6519のリボソーム合成型新規チオペプチドlactazole Aの生合成遺伝子の解析. 日本農芸化学会中部支部第166回例会. 11月2日, 福井.
- 2) 林昌平, 池田治生, 大村智, 奥直也, 五十嵐康弘, 尾仲宏康. 2013. 異種発現, プロモーター置換, 複合培養によるLactazole A生産の増加. 2013年度日本農芸化学会大会. 3月24-27日, 仙台.
- 3) 林昌平, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2014. ゲノム探索が明らかにした新規32員環チオペプチド, ラクタゾールの構造と生合成. 第56回天然有機化合物討論会. 10月15日, 高知.
- 4) Shohei Hayashi, Taro Ozaki, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka. 2015. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of lactazoles, novel 32-membered macrocyclic thiopeptides. *Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era*. Jan. 11-14, SanDiego.
- 5) 尾仲宏康. 2015. 新規RiPPs抗生物質生合成系のゲノム探索と生合成マシナリー解析. 「生合成マシナリー」成果報告シンポジウム. 6月21日, 東京.

原著論文

- 1) Hayashi, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Ikeda, H., Ōmura, S., Oku, N., Igarashi, Y., Tomoda, H., Onaka, H. 2014. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. *Chem. Biol.* **21**, 679-688.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって開設された微生物潜在機能探索寄付講座においてなされたものである。本助成を賜った発酵研究所に対して、ここに厚く御礼申し上げます。本寄付講座世話人である東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・大西康夫教授のご支援とご協力に感謝の意を表します。S. *lactacystinaeus* OM-6519の供与、バイオアッセイ及びLC-MS分析は北里大学・北里生命科学研究科で行

われたものである。同大村智特別栄誉教授、供田洋教授に厚く御礼申し上げます。化合物の構造解析は富山県立大学工学部・微生物工学講座で行われたものである。同五十嵐康弘教授、奥直也講師に厚く御礼申し上げます。生合成研究でご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・勝山陽平准教授に感謝の意を表します。

引用文献

- Bagley, M.C., Dale, J.W., Merritt, E.A. & Xiong, X. 2005. Thiopeptide antibiotics. *Chem. Rev.* **105**: 685-714.
- Bowers, A.A., Acker, M.G., Koglin, A. & Walsh, C.T. 2010. Manipulation of thiocillin variants by prepeptide gene replacement: structure, conformation, and activity of heterocycle substitution mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 7519-7527.
- Bycroft, B.W. & Gowland, M.S. 1978. The structures of the highly modified peptide antibiotics micrococin P1 and P2. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **6**: 256-258.
- Ding, Y., Yu, Y., Pan, H., Guo, H., Li, Y. & Liu, W. 2010. Moving posttranslational modifications forward to biosynthesize the glycosylated thiopeptide nocathiacin I in *Nocardia* sp. *ATCC 202099. Mol. Biosyst.* **6**: 1180-1185.
- Fukuda, T., Uchida, R., Ohte, S., Inoue, H., Yamazaki, H., Matsuda, D., Nonaka, K., Masuma, R., Katagiri, T. & Tomoda, H. 2012. Trichocyalides A and B, new inhibitors of alkaline phosphatase activity in bone morphogenetic protein-stimulated myoblasts, produced by *Trichoderma* sp. FKI-5513. *J. Antibiot. (Tokyo)* **65**: 565-569.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A. & Smith, H.O. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**: 343-345.
- Haginaka, K., Asamizu, S., Ozaki, T., Igarashi, Y., Furumai, T. & Onaka, H. 2014. Genetic approaches to generate hyper-producing strains of goadsporin: the relationships between productivity and gene duplication in secondary metabolite biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**: 394-399.
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. & Ikeda, H. 2010. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2646-2651.
- Li, C. & Kelly, W.L. 2010. Recent advances in thiopeptide antibiotic biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 153-164.
- Li, J., Qu, X., He, X., Duan, L., Wu, G., Bi, D., Deng, Z., Liu, W. & Ou, H.Y. 2012. ThioFinder: a web-based tool for the identification of thiopeptide gene clusters in DNA sequences. *PLoS One* **7**: e45878.
- Liao, R., Duan, L., Lei, C., Pan, H., Ding, Y., Zhang, Q., Chen, D., Shen, B., Yu, Y. & Liu, W. 2009. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chem. Biol.* **16**: 141-147.
- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**:

- 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2003. pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J. Antibiot. (Tokyo)* **56**: 950-956.
- Tocchetti, A., Maffioli, S., Iorio, M., Alt, S., Mazzei, E., Brunati, C., Sosio, M. & Donadio, S. 2013. Capturing linear intermediates and C-terminal variants during maturation of the thiopeptide GE2270. *Chem. Biol.* **20**: 1067-1077.
- Wieland Brown, L.C., Acker, M.G., Clardy, J., Walsh, C.T. & Fischbach, M.A. 2009. Thirteen posttranslational modifications convert a 14-residue peptide into the antibiotic thiocillin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 2549-2553.

新規ラビオネン構造の形成に關与するランチペプチド合成酵素の解析

菅井 佳宣¹⁾, 尾崎 太郎²⁾, 浅水 俊平, 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

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Analysis of lanthipeptide biosynthetic enzymes responsible for formation of novel goadionin structure.

Yoshinori Sugai¹⁾, Taro Ozaki²⁾, Shumpein Asamizu, Hiroyasu Onaka

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo.

Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Lanthipeptides are an important class of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. In *Streptomyces* sp. TP-A0584 genome, we found a gene cluster containing both a class III lanthipeptide synthetase (GopKC) and a flavin-dependent Cys decarboxylase (GopD). Heterologous expression of the cluster led to discovery and characterization of new class III lanthipeptide named as goadpeptin which has a unique structure consisting of a central quarternary carbon atom with a thioether bridge and a methylene bridge. This moiety shares structural feature with labionin, but the C-terminal amino acid residue is processed by oxidative decarboxylation. To uncover the biosynthetic mechanisms of the unique structure, we reconstituted the biosynthetic pathway of goadpeptin *in vitro*. Although single GopKC reaction afforded lanthionin ring, tandem reaction of GopD and GopKC accomplished the formation of the labionin-like structure. This is the first report that the ring formation reaction catalyzed by class III lanthipeptide synthetase was switched from lanthionin mode to labionin mode by preceding modification reaction. Our results provide additional insights into determinants of lanthipeptide ring topology produced by lanthipeptide synthetases.

Key words: biosynthesis, RiPPs, *Streptomyces*, *in vitro* reconstitution, enzymes

緒 言

リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) はその構造多様性とユニークな生理活性から医薬の探索源として注目されている (Arnison *et al.*, 2013; Ortega & van der Donk, 2016). この構造の多様性は翻訳後修飾酵素 (PTMs) によって生み出されている. PTMsでは前駆体ペプチドのN末端に存在するリーダーペプチドを認識してC末端側のコアペプチド領域のアミノ酸残基を修飾することが知られている (Arnison *et al.*, 2013). また, RiPPsの前駆体ペプチドが構造遺伝子にコードされているため, コアペプチド領域に変異を入れやすい. これら

の性質から RiPPs は遺伝子操作によってエンジニアリングしやすい化合物とされている. また, PTMによって導入される構造が生成物の安定性や生理活性発現に重要であるため, 新規 PTM の発見は創薬につながることで期待される.

ランチペプチドはチオエーテル架橋でつながった2アミノ酸からなるランチオニン (lanthionine, Lan) と呼ばれる構造を持つ RiPPs の一種であり, 最も盛んに研究されている化合物群である (Repka *et al.*, 2017). ランチペプチドの中にはナイシンに代表される抗バクテリア活性を持つものが多く含まれるが, 他にも抗真菌, 抗ウイルス, 抗侵害受容活性など様々な生理活性を示す化合物が多く含まれている (Arnison *et al.*, 2013). それらは合成酵素 (ランチペプチド合成酵素) の種類からクラス I-IV の4つに分けられている. これらは反応機構は異なるが, Ser もしくは Thr 側鎖を脱水し, デヒドロアラニン (dehydroalanine, Dha) もしくはデヒドロブチリン

¹⁾現 京都大学学術研究支援室

²⁾現 北海道大学理学研究院

E-mail: 尾仲宏康 : aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者: 菅 裕明 (東京大学大学院理学研究科),

後藤佑樹 (東京大学大学院理学研究科)

(dehydrobutyrine, Dhb) を形成後, Cys 残基のチオールから Dha/Dhb のメチレンへのマイケル付加反応を触媒することが共通している. 多くのランチペプチド合成酵素は, その際生じたエノラートアニオンをプロトン化することで Lan 構造を形成する. 一方でクラス III ランチペプチド合成酵素の中にはエノラートアニオンからさらなるマイケル付加反応を触媒することで二環性のラビオニン構造 (labionine, Lab) (Fig.1) を形成させるものがある. また, クラス III ランチペプチド合成酵素は *kinase* ドメインと *cyclase* ドメインからなることから LanKC と呼ばれている.

このような Lan/Lab 構造に加え, さらに修飾された構造をもつランチペプチドも報告されている. 例えば, エピデルミンは Lan 構造の C 末端側 Cys のカルボキシル基が酸化, 脱炭酸された S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cysteine (AviCys) (Fig.1) と呼ばれる構造を有している. C 末端のカルボキシル基が消失しているため, エピデルミンはカルボキシペプチダーゼによる消化を受けず, 細胞内で安定に存在できることが示唆されている (Maffioli *et al.*, 2015). AviCys 構造の生合成における Cys の酸化, 脱炭酸を触媒するフラビン依存酵素は LanD と総称されている (Kupke *et al.*, 1992; Sit *et al.*, 2011).

ゴードスポリン (Goadsporin, GS) 生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノムを探索したところ (Igarashi *et al.*, 2001; Onaka *et al.*, 2001), GS 生合成遺伝子クラスター (*god* クラスター) とは別の RiPPs 生合成遺伝子クラスター (*gop* クラスター) が見出された. 本研究では *gop* クラスターの異種発現により代謝産物を同定し, 新規化合物ゴードペプチン (goadpeptin) を見

出した. さらに GS 生合成研究で利用した flexible *in vitro* translation (FIT) システムを利用し (Ozaki *et al.*, 2017), この遺伝子クラスターにコードされている 2 種類の PTMs の機能解析を行なった.

実験方法

目的遺伝子クラスターを含むコスミドの単離

Streptomyces sp. TP-A0584 のコスミドライブラリーは既に構築したものを使用した (Onaka *et al.*, 2005). クラス IV ランチペプチド合成酵素の一種 *venL* の配列をクエリーに *Streptomyces* sp. TP-A0584 のドラフトゲノムを検索した (Goto *et al.*, 2010), 見出された *lanKC* ホモログの配列をもとにプライマーセットを設計し, PCR によりコスミドライブラリーから目的遺伝子クラスターを持つコスミド (pTOYAMAcos/15-8D) を単離した. 制限酵素処理と末端塩基配列の解析によりゲノム上の位置を同定した.

gop クラスターの異種発現

pTOYAMAcos/15-8D を大腸菌 S17-1 株を経由して *Streptomyces albus* J1074 に接合伝達により導入し, *S. albus* 15-8D を取得した. この株を 10mL の YMP 培地 (0.2% 酵母エキス, 0.2% 麦芽エキス, 0.4% ペプトン, 0.5% 塩化ナトリウム, 0.2% 硫酸マグネシウム, 1% グルコース, pH7.2) に植菌し, 30°C で 1 日振盪培養した. 新しい 100mL の YMP 培地に前培養液を 1mL 添加し, さらに 30°C で 3 日間振盪培養した. 培養後, 400 μ L の培養液を 400 μ L の *n*-ブタノールで抽出した. *n*-ブタノール層を回収し溶媒を留去した後, 40 μ L のジメチルスル

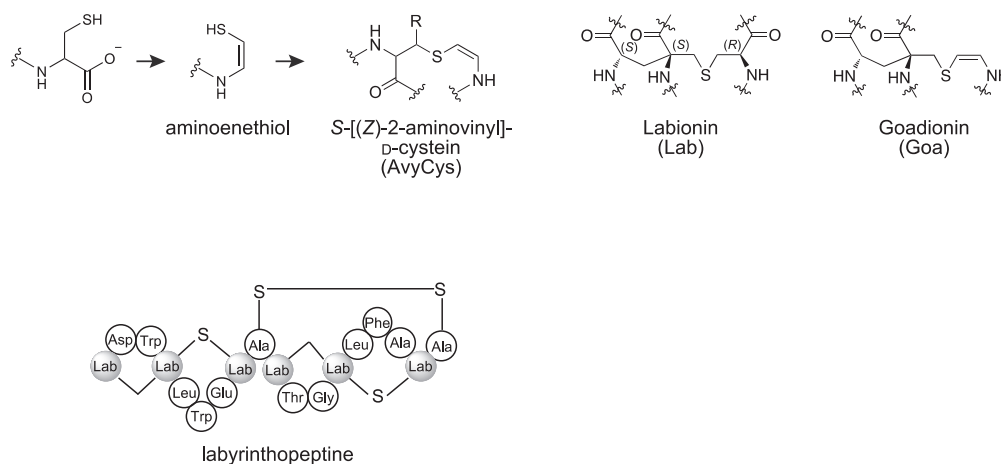


Fig. 1 Chemical structures of labionin, aminovinyl-D-cysteine, and goadionin.

Aminovinyl-D-cysteine is biosynthesized from cysteine via aminoenethiol intermediate that is generated by oxidative decarboxylation of cysteine. Labyrinthopeptin is one of the representative compounds of labionin containing compound.

ホキシドで再溶解し、LC-MS解析に供した。LC-MS解析には1200 series ultra-performance liquid chromatography (UPLC) システム (Agilent Technology, Japan) を組合せた四重極 time-of-flight (TOF) 6550 (Agilent Technology) を用いた。分析にはAQUITY UPLC BEH C18 カラム (1.7 μ m, 2.1 \times 100mm; Waters) を使用した。

Goadpeptin の大量生産と単離精製

3L の YMP 培地で *S. albus* 15-8D を 3 日間培養後、培養液に 60g の XAD 樹脂 (Sigma-Aldrich, MO, USA) を添加し 1 時間インキュベートすることで化合物を吸着させた。不織布を用いて回収した XAD 樹脂をカラムに充填し、水-メタノール (20, 40, 60, 80%) を用いて段階的に溶出させた。各フラクションを LC-MS により分析し、ゴードペプチンが含まれたフラクションを回収した。溶媒を留去後ジメチルスルホキシドで溶解し、LH20 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供した。50% メタノールを移動相として使用し、分画した各フラクション LC-MS で分析した。ゴードペプチンを含むフラクションを回収後、再度ジメチルスルホキシドに溶解し、逆相 ODS (48 \times 200mm, Cosmosil 75C₁₈-PREP; Nacalai Tesque, Japan) による精製を行なった。サンプルはアセトニトリル-0.1%ギ酸 (8:2) で溶出した。回収したサンプルは 5C18-AR-II カラム (Nacalai Tesque) を用いた分取 HPLC により精製した。精製したゴードペプチンは LC-MS 解析により精製度を確認した。

ゴードペプチンの構造解析

ゴードペプチンのアミノ酸解析は精製した 20 μ g のゴードペプチン B を用いて行なった。500 μ L の 6M 塩酸に溶解した後、100 $^{\circ}$ C で 1h インキュベートした。溶媒を減圧濃縮した後、20 μ L の水で溶かし、10 μ L ずつ分注した。4 μ L の 1M 炭酸水素ナトリウムを各サンプルに添加後、0.1% アセトンに溶かした L-もしくは D-FDLA を 20 μ L 添加し、40 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。1M 塩酸を 4 μ L 添加することで誘導体化反応を停止し、162 μ L のアセトニトリルで希釈後、LC-MS 解析に供した。

一次元、二次元 NMR スペクトルはジメチルスルホキシド-*d*₆ に溶かしたゴードペプチン B を用いて解析し、溶媒シグナルを化学シフト値の基準とした。ECA-600 (JEOL, Japan) を用いて 600MHz (¹H) と 150MHz (¹³C) のスペクトルを取得した。

遺伝子のクローニング

gopD, *gopKC* 遺伝子は pTOYAMAcos/15-8D をテンプレートとして PCR により増幅した。増幅した遺伝子は制限酵素 (*gopD*: NdeI と BamHI, *gopKC*: NdeI と HindIII)

で消化し、それぞれ pColdII (Takara Bio, Japan) と pET26b (Novagen, WI, USA) のマルチクローニングサイトに挿入した。得られた pColdII-*gopD* と pET26b-*gopKC* はシーケンス解析により配列を確認した。

組換えタンパク質の調製

GopD タンパク質は pColdII-*gopD* を、*GopKC* タンパク質は pET26b-*gopKC* と pGro7 (Takara Bio) を形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を用いて調製した。発現誘導した大腸菌株を遠心分離により回収し、Lys Buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0), 300mM NaCl, 10mM imidazole) で洗浄した。その後、超音波破碎したサンプルを 10,300 \times g で 30min 遠心し、上清を可溶性画分として回収した。Profinia (BioRad, CA, USA) を用いて可溶性画分から目的タンパク質を Ni アフィニティー精製し、ゲルろ過カラムを用いてバッファーを交換した (20mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl)。

ゴードペプチン生合成経路の *in vitro* 再構成

DNA テンプレートの調製と前駆体ペプチドの転写、翻訳反応はペプチドのアミノ酸配列以外は GS 生合成研究と同様に行なった。翻訳したペプチドと、5 μ M *GopD*, 2 μ M *GopKC*, 10mM 塩化マグネシウム, 5mM ATP, 50mM トリス-塩酸 (pH8.0) を混合し 45 μ L スケールで反応を行なった。30 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベート後、1 μ g の GluC (Roche Diagnostics, Switzerland) を添加し 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。その後、サンプルを凍結乾燥させ 50 μ L のジメチルスルホキシドで再溶解したものを LC-MS で解析した。環化状態を解析する際は β -メルカプトエタノールを 100mM になるよう添加し、50 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。酵素反応産物は MALDI-TOF-MS (ultrafleXtreme, Bruker Daltonics, MA, USA) のネガティブイオンモードで解析した。

結 果

Streptomyces sp. TP-A0584 の RiPPs 生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング

GS 生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノムデータベース上で RiPPs 生合成遺伝子クラスターを探索したところ、クラス IV ランチペプチド合成酵素遺伝子 *venL* と相同性を示す遺伝子 (*gopKC*) が見出された (Fig. 2a)。しかしながら *gopKC* の配列を精査したところクラス IV ランチペプチド合成酵素の特徴である亜鉛結合ドメインが無いことから、ほぼ同一のドメイン構成を持つクラス III ランチペプチド合成酵素に属することが判明した。また、その近傍には LanD グループに属す

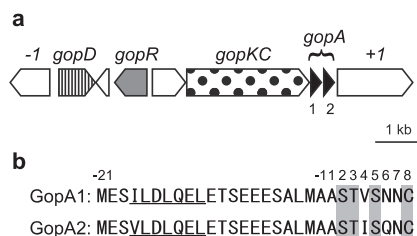


Fig. 2 Biosynthetic gene cluster of goadpeptin.

The gene organization of *gop* cluster (a). The amino acid sequences of the precursor peptides. Recognition motif required for post-translational modification were underlined. Residues undergoing post-translational modifications were highlighted in gray (b).

る酵素をコードする遺伝子 (*gopD*) も見出された。また、クラスター内に2コピー存在した構造遺伝子 (*gopA1*, *gopA2*) にコードされる前駆体ペプチドの配列にはこれから修飾酵素の反応を受けると予想される Ser, Ser, Cys モチーフが存在した (Fig. 2b) (Müller *et al.*, 2010)。これまでに LanKC と LanD が協働して生合成されるランチペプチドの報告例は無く、このクラスターによって生合成されるペプチドに興味を持たれた。

gop クラスターのクローニングと異種発現

gopKC の配列情報を基に設計したプライマーセットを用いて *Streptomyces* sp. TP-A0584 のコスミドライブラリーから PCR によりスクリーニングを行なった。得られたコスミド (pTOYAMAcas/15-8D) のシーケンス解析から *gop* クラスターを全て含んでいることが確認された。このコスミドを異種放線菌である *Streptomyces albus* に形質転換し、その代謝産物を LC-MS で解析したところ、ネガティブコントロールでは見られないピークが観察された (Fig. 3a)。高分解能質量分析から、化合物 1 の分子式が $C_{28}H_{42}N_{10}O_9S$ (測定値: 695.2918 [M+H]⁺, 理論値: 695.2930 [M+H]⁺)、化合物 2 の分子式が $C_{30}H_{46}N_{10}O_9S$ (測定値: 723.3246 [M+H]⁺, 理論値: 723.3243 [M+H]⁺) であることが示された。これら化合物の分子量の差は2コピー存在する前駆体ペプチド (GopA1, GopA2) の分子量の差と一致することから、化合物 1, 2 がそれぞれ GopA1, GopA2 に由来する化合物であることが強く示唆された。

化合物 2 の構造解析

gop クラスターによって生合成される化合物の構造を決定するために、2 に注目し精製、単離を行なった。XAD 樹脂による固相抽出後、LH-20 を用いたゲルろ過精製、オープン ODS カラムによる逆相クロマトグラフィー、

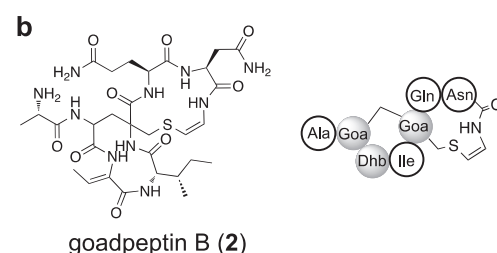
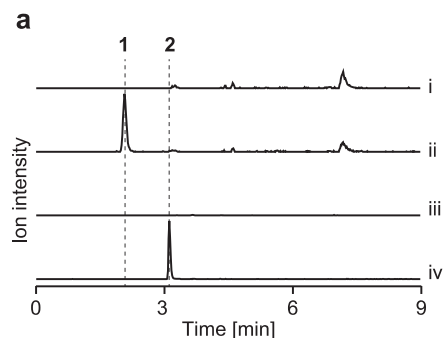


Fig. 3 Heterologous expression of *gop* cluster.

(a) LC-MS analysis of metabolites extracted from *S. albus* harboring empty vector (i and iii) and pTOYAMAcas/15-8D (ii and iv). The chromatograms show extracted ion chromatograms at m/z 695.3 (i and ii) and at m/z 723.3 (iii and iv). (b) The elucidated structure of goadpeptin B (left). Simplified structure is drawn to the right. Amino acid residues that were underwent posttranslational modification are highlighted in gray.

分取 HPLC による精製を経て 2 を単離した。アミノ酸分析から L-Ala, L-Ile, L-Glx, L-Asx が検出され、GopA2 のコアペプチドアミノ酸配列 (Ala-Ser-Thr-Ile-Ser-Gln-Asn-Cys) と一致していた。検出されなかった Ser, Thr, Cys は翻訳後修飾酵素の反応を受けたことが示唆された。また、NMR 解析を行なったところ、HMBC スペクトルから 4 級炭素 (δ 64.1) を中心とした相関が観察され、2 つの環状構造が Ser5 に由来する残基を中心に構築されていることが示された (Iorio *et al.*, 2014)。さらにビニル基に由来するプロトン (δ 5.38, 7.15) が観察され、C-末端の Cys が酸化、脱炭酸され S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystein (AviCys) 構造へと変換されていることが示された。また、二次元 NMR の相関から上記 2 環性の構造中に Cys に由来するビニル基が存在することから、LanKC と LanD が協働してこの構造を構築していることが示唆された。本部分構造はこれまでに生合成研究の報告が無く新規な構造であったことから (Aszodi *et al.*, 2017)、ゴディオニン (goadionin, Goa) と命名し、化合物 2 をゴードペプチン B (goadpeptin B) と命名した (Fig. 3b)。

ゴードペプチンB生合成経路の再構成

ゴードペプチンの生合成経路を解明するために、試験管内で生合成経路の再構成を行なった (Fig.4). GopKC と GopD は大腸菌を用いた組換え酵素として発現させ、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーで精製したものを使用した. GopKC はシャペロンタンパク質の GroEL と GroES との共発現により可溶性タンパク質として調製可能だった. また、精製した GopD を含む溶液が黄色を呈色し、LC-MS で解析したところ FAD が検出されたことから、FAD と結合した状態で調製されたことが示された.

RiPPs の N 末端に存在するリーダーペプチドの消化には特異的なプロテアーゼが関与することが知られているが、*gop* クラスター内にはプロテアーゼと相同性を示す酵素遺伝子は存在しなかったことから、*gop* クラスター外にコードされるプロテアーゼによって切断されると予想された (Kodani *et al.*, 2004; Krawczyk *et al.*, 2012; Meindl *et al.*, 2010). そこでコアペプチド領域の N 末端上流 (-1) にグルタミン酸残基を挿入し、市販のプロテアーゼ GluC によって切断できるようにした前駆体ペプチド (GopA2*) を設計した. 無細胞翻訳系 (Fit システム) を用いて GopA2* を調製したところ、理論値と一致する化合物 (m/z 3,313 [M-H]⁻) の生産が MALDI-TOF-MS 解析により確認された (Fig.5a). これに GopD を

加え 3 時間反応させることで酸化的な脱炭酸反応が進行するか確かめた. その結果、MALDI-TOF-MS 解析において、水素分子と二酸化炭素の脱離と一致する 46Da の

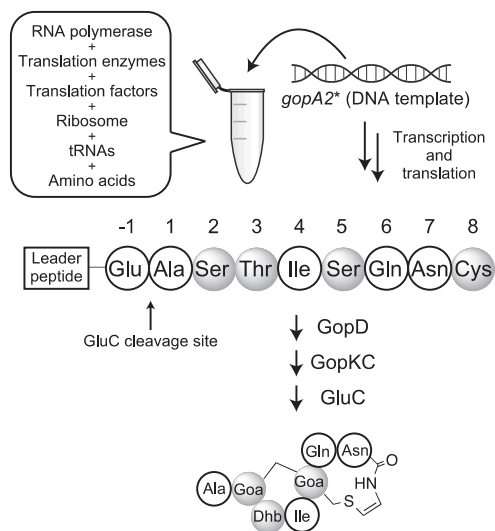


Fig.4 The overview of an *in vitro* reconstitution of goadpeptin biosynthetic pathway by the FIT-Gop system.

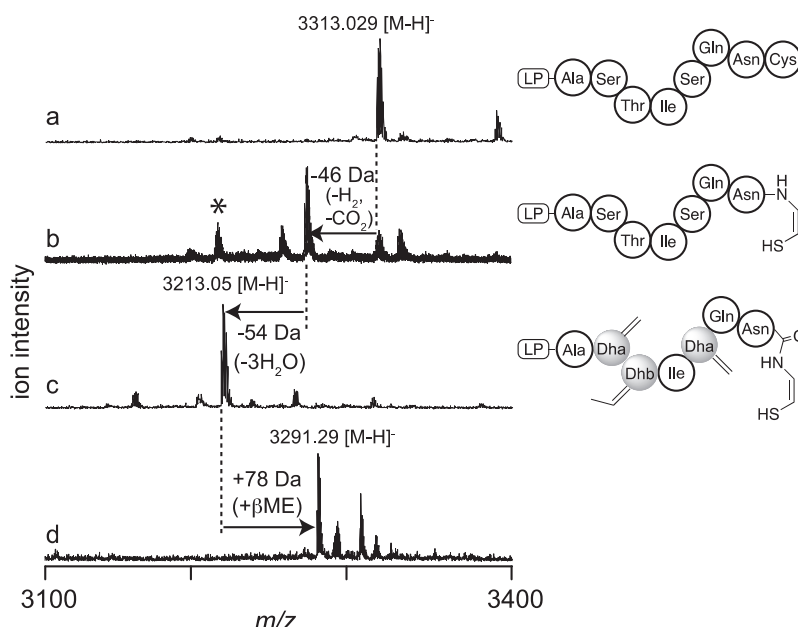


Fig.5 MS analysis of the enzymatic reactions.

MALDI TOF-MS spectra of GopA2* expressed in the FIT system (a), FIT-GopD system (b), and FIT-GopD/KC system (c) are shown. Byproduct (m/z 3210.15, 103 Da less than GopA2*) indicated by asterisk was supposed to be the peptide GopA-(Met²¹-Asn⁷) (missing the last Cys residue; -103 Da) or the peptide GopA-(Met²¹-Asn⁷)-amide (-104 Da). When the product of FIT-Gop/KC system was derivatized by β -mercaptoethanol, addition of only one molecule of β -mercaptoethanol was observed (d).

分子量の減少が観察され (m/z 3,267 [M-H]⁻), アミノエンチオールが形成されたことが強く示唆された (Fig. 5b). 次に, ここに GopKC を加え反応を行なった. 3時間のインキュベーション後に MALDI-TOF-MS で解析したところ, 3箇所の脱水反応と一致する分子量の変化が観察され, コアペプチド中の3つの残基 (Ser2, Thr3, Ser5) が脱水されたことが示唆された (Fig. 5c). C末端のアミノエンチオールから脱水により形成された二重結合へマイケル付加反応がおき, 環化していることが期待されたが, この反応には分子量の変化が伴わないため MALDI-TOF-MS では観察することができなかった. そこで脱水によって形成された二重結合に対して β -メルカプトエタノールを反応させ, 誘導体化することで, 環化されずに残った二重結合の数を測定した. その結果, 一分子の β -メルカプトエタノールの付加 (+78Da) が観察され, 2つの Ser もしくは Thr 残基が環化し二環性の構造に変換されていることが示された (Fig. 5d). 最後に GluC を添加することでリーダーペプチドの切断を行い, ゴードペプチン B の合成を行なった. 生成物を LC-MS で解析したところ, 標品のゴードペプチン B と保持時間と精密質量が完全に一致したことから (Fig. 6), 試験管内でゴードペプチン B の生合成経路を再構成することに成功した.

酵素反応の詳細な解析

これまで報告されているクラス III ランチペプチド合成酵素は Cys 残基側鎖のチオールを用いてマイケル付加反応を行っているが (Jungmann *et al.*, 2016; Krawczyk *et*

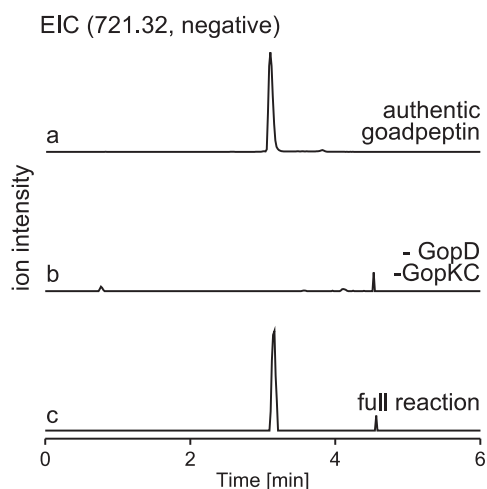


Fig. 6 LC-MS analysis of the reaction product of the FIT-GopD/KC and the authentic goadpeptin B. Goadpeptin B was detected at 3.2min. Authentic sample (a) and Full reaction (c). Goadpeptin B was not detected from the reaction sample without GopKC and GopD (b).

al., 2012; Völler *et al.*, 2012; Wang & van der Donk, 2012). GopKC はアミノエンチオールを基質としている. GopKC が他の class III ランチペプチド合成酵素と同様, チオールを基質として認識できるかを再構成系を用いて検証した. 環化反応の進行は β -メルカプトエタノールによる誘導体化により観察した. 誘導体化の際, Ser 由来の Dha より Thr 由来の Dhb の反応性が低いことから, 前駆体ペプチドの Thr3 を Ser に置換した GopA2_T3S を設計し, 誘導体化の検出感度を高めた変異前駆体ペプチド GopA2_T3S を設計して, 実験に用いた. 無細胞翻訳系を用いて調製した GopA2_T3S を基質に GopKC を反応させたところ, 予想通り 3 分子の水分子の脱離が観察された (Fig. 7ab). 興味深いことに, その後の誘導体化反応では, 2ヶ所に β -メルカプトエタノールが付加したことから, 2ヶ所が二重結合であることが確認された (Fig. 7b). すなわち, GopKC によって, 1ヶ所の Dha 残基のみ環化した一環性の構造 (ランチオン) へと変換されたことが示された (Lan モード). 一方, GopD と GopKC をステップワイズに反応させると二重結合は 1ヶ所しか観察されず (Fig. 7c), 二環性のラビオン様構造が形成されることから (Lab モード), GopKC が触媒する環化反応は基質の C 末端の構造に依存することが示された. このような C 末端の構造の違いにより環化様式が変化する例はこれまで報告されておらず, GopKC が初めてである.

環化機構に関してさらなる知見を得るために GopKC

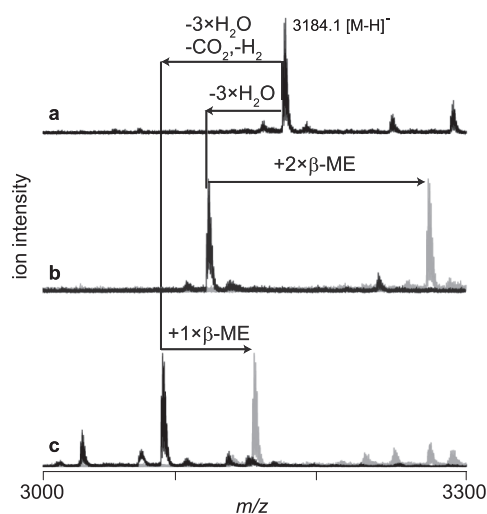


Fig. 7 Analysis of ring topology produced by GopKC. MALDI-TOF-MS spectra of GopA2_T3S expressed in the FIT system (a), reaction products of FIT-GopKC system (b, black), and FIT-GopD/KC system (c, black) are shown. Spectra obtained from the derivatized samples by β -ME are shown in gray (b and c).

によって形成される化合物の環構造を詳細に解析した。まずランチオニン構造を形成すると予想された Ser 残基を Ala に置換した変異前駆体ペプチドを調製し、GopKC と反応させた。その結果、二番目の Ser (S2A) もしくは 5 番目の Ser を Ala に置換した前駆体ペプチド (S5A) はいずれも脱水、環化されたことが質量分析により示された。このことから、GopKC は大小 2 種類のランチオニ

ン構造 (Dha2-Cys8 と Dha5-Cys8) を形成できることが示された。次に、Ser を置換していない前駆体ペプチドを基質とした際に GopKC は大小どちらの環構造を形成するかを確かめた。2 種類の環構造を区別できる UPLC の測定条件を最適化し、GopKC 生成物を分析した。その結果、UPLC 解析から生成物は 1 種類であることが示され (Fig. 8a), さらに MS/MS フラグメンテー

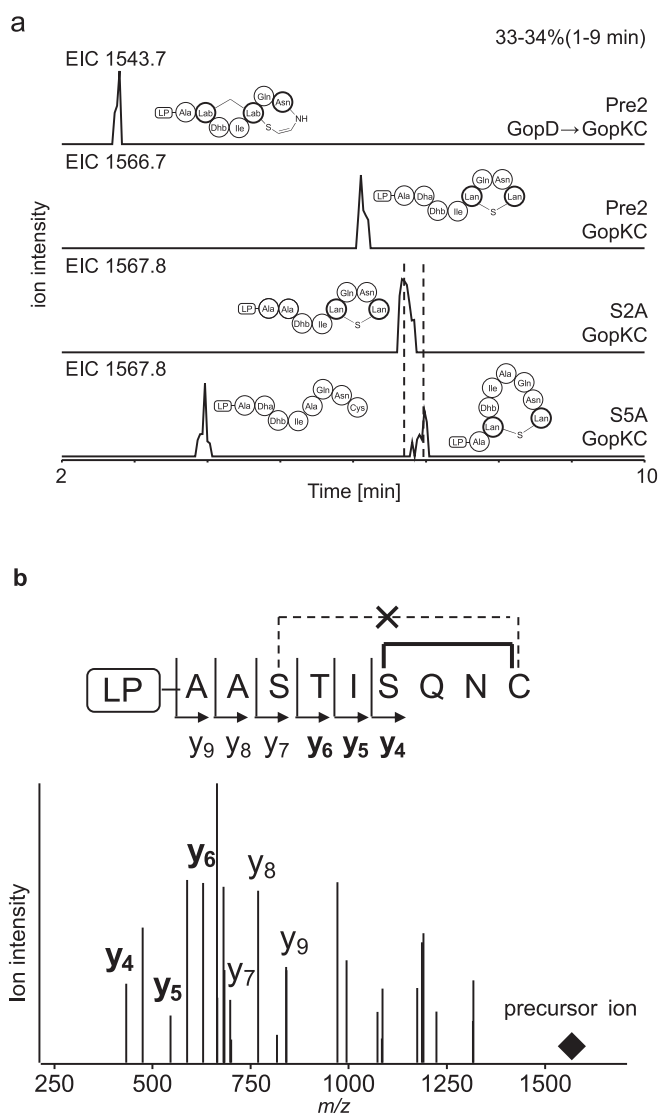


Fig. 8 LC-MS/MS analysis of reaction product synthesized by FIT-GopD/KC and FIT-GopKC systems.

Extracted ion chromatograms of each reaction product are shown (a). FIT-GopD/KC product from Pre2 was detected at 2.8 min ($1543.686 [M+2H]^{2+}$). FIT-GopKC product from Pre2 was detected at 6.1 min ($1566.687 [M+2H]^{2+}$). FIT-GopKC product from Pre2_S2A was detected at 6.7 min ($1567.693 [M+2H]^{2+}$). FIT-GopKC products from Pre2_S5A was detected at 3.9 min ($1567.685 [M+2H]^{2+}$) and at 6.9 min ($1567.694 [M+2H]^{2+}$). The analytical conditions were as follows: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 $1.7 \mu\text{m}$ column ($2.1 \times 100 \text{mm}$; Waters); column temperature, 40°C ; a linear gradient program (from 33% to 34% acetonitrile, in the presence of 10mM formic acid) over 8min with a flow rate of 0.3mL/min. Different retention times between S2A and S5A suggested that this analytical condition could distinguish the processed peptides containing different ring size. MS/MS spectrum of the precursor ion representing m/z 1566.687 $[M+2H]^{2+}$ (b). Fragment ions y_4 - y_6 indicate that the compound has small lanthionine ring.

ションパターンから小さい環構造 (Dha5-Cys8) を持つ分子であることが示された (Fig.8b). この結果から, GopKCは2種類の環構造を生成する能力を持っているが, 野生型の前駆体ペプチドからは小さい環を持つランチオニンのみを生成することが示された.

GopD, GopKCの基質認識に関する解析

これまでに報告されている RiPPs 生合成酵素の多くは前駆体ペプチドのN末端に存在するリーダーペプチドを認識し酵素反応を触媒している. GopDとGopKCも同様にこの領域を認識しているかを検証するために, リーダーペプチド領域を削除した前駆体ペプチドを設計し, 再構成系を用いて酵素反応を行なった. その結果, 酸化的脱炭酸反応も脱水反応も観察されず, GopDとGopKCがリーダーペプチド領域を認識していることが示された (Fig.9ab). また, これまでに知られている

ラビオニン環を持つ化合物は分子内にタンデムに並んだラビオニン環形成モチーフ (Ser-Ser-Cys) を持っているが (Fig.1), GopAは一つしかモチーフを持っていない (Ser2-Ser5-Cys8). そこでGopA2の8残基のコアペプチド配列をC末端に追加し, モチーフが2つ並ぶ変異前駆体ペプチド (GopA2_tandem) を設計した. 再構築系を用いてGopDとGopKCの酵素反応を行なったところ, GopDによる修飾反応は進行しなかった (Fig.9d) 一方で, GopKCを反応させたところ3分子の水の脱離が観察された. 6分子の水の脱離は観察されなかったことから, GopKCはGopA2_tandemを基質として認識することは出来るが, 完全に反応をさせることはできないことが示された (Fig.9e). 以上の結果から, GopDとGopKCは前駆体ペプチドのリーダーペプチド領域を認識し, 一つのラビオニンモチーフを修飾する酵素であることが明らかとなった.

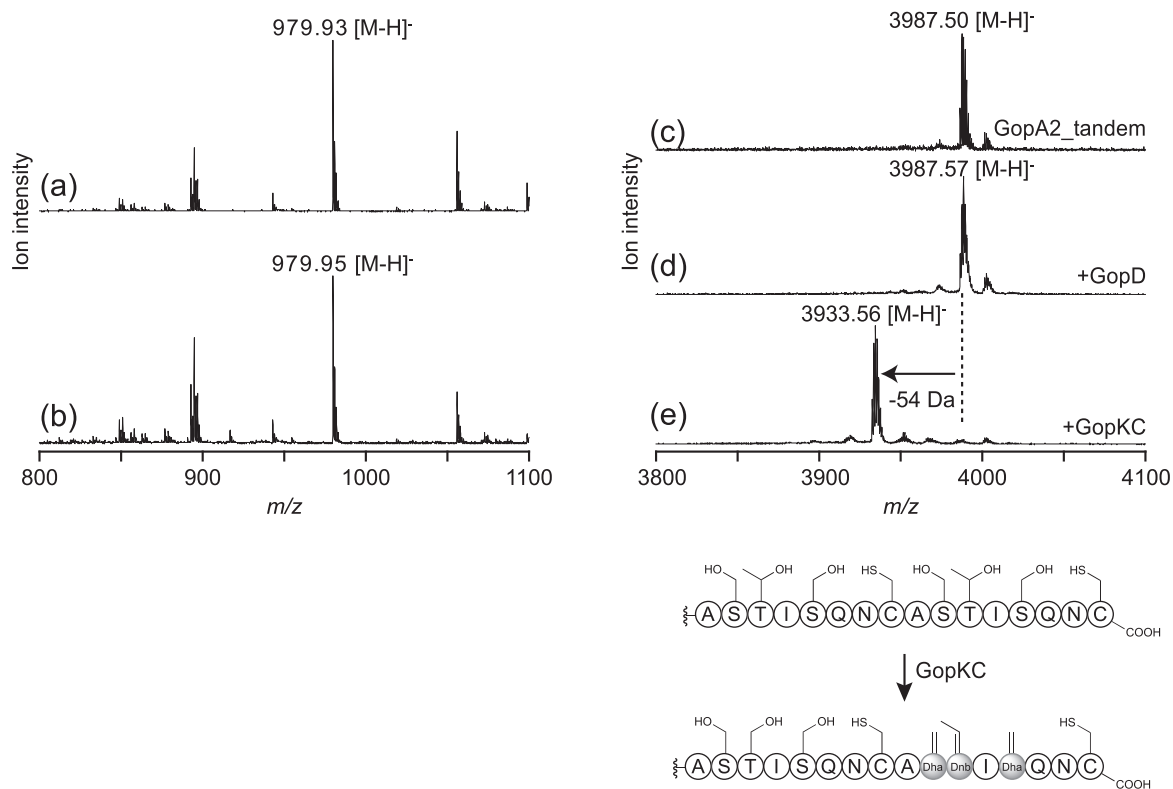


Fig. 9 MALDI-TOF-MS analysis of reaction mixture using leader-less precursor peptide and GopA2_tandem as substrate.

Reaction mixtures containing no enzymes (a) and GopD and GopKC (b) were analyzed by MALDI-TOF-MS. No obvious conversion of precursor peptide (980 [M-H]⁺) were observed. Reaction mixtures containing no enzymes (c), GopD (d), and GopKC (e) were analyzed by MALDI-TOF-MS. No obvious conversion of precursor peptide (m/z 3987.5 [M-H]⁺) were observed when the precursor peptide was incubated with GopD (d). Three times dehydration (-54 Da, m/z 3933.5 [M-H]⁺) was observed when the precursor peptide was incubated with GopKC (e).

考 察

ランチペプチド合成酵素の系統樹解析から、生成物の環構造は合成酵素の機能によって一義的に決まるわけではなく、前駆体ペプチドのアミノ酸配列も影響を与えていることが示唆されており、特にクラス III ランチペプチド合成酵素のうちランチオニンを形成する酵素とラビオニンを形成する酵素は系統樹解析から区別することはできないことが示されている (Zhang *et al.*, 2012). クラス III ランチペプチド合成酵素の中にはランチオニンとラビオニンの両方を合成する酵素が知られている (Völler *et al.*, 2012). これは環形成反応において基質ペプチドが二環性のラビオニンを形成するための適切な位置取りをすることができず、一環性のランチオニンが形成されたと推測している. *GopKC* においては *GopD* により前駆体ペプチドの C 末端 Cys 残基が修飾されアミノエンチオールが形成されたときのみラビオニンが形成されることから、この修飾により基質ペプチドが *GopKC* の基質ポケット内でラビオニンを形成するために適した構造をとることが出来るようになると考えられる. また、チオールよりもアミノエンチオールのほうが共役系による電子の非局在化のため反応性が高くなることから、この反応性の高さがラビオニン形成に寄与している可能性もある (Kupke & Götz, 1997). データベースを探索すると *GopKC* ホモログと *GopD* ホモログが同一の遺伝子クラスターにコードされている生物が複数見出される (Fig. 10). このことから、*GopD* と *GopKC* の協働による *goadionin* 形成機構はバクテリアに分布している機構と考えられる.

今回、放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 株が持つ RiPPs 生合成遺伝子を見出し、異種発現株からその生成物を同定しゴードペプチン B と命名した. 構造解析から、ゴ-

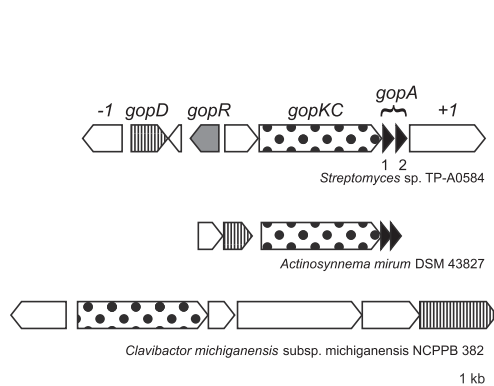


Fig. 10 Gene organizations of the *gop* cluster and other gene clusters containing *gopD* and *gopKC* homologs.

The deduced functions are labeled in pattern.

ドペプチン B はラビオニン構造の C 末端が脱炭酸された新規な *goadionin* 構造を持つことが示された. 無細胞翻訳系と組換え翻訳後修飾酵素を組み合わせた再構築系を構築し、修飾酵素の機能を解析したところ、上記新規構造は *GopD* と *GopKC* の協働により形成されることが示された (Fig. 11). *GopD* と *GopKC* はリーダーペプチドを認識して修飾反応を触媒し、コアペプチド配列を厳密に認識していないことから、本研究において示した *goadionin* 形成反応はコアペプチドを変化させた変異 RiPPs の創製に利用でき、将来的には新規薬剤の開発へ活用されることが期待される.

要 旨

ランチペプチドは強力な抗菌活性やユニークな生理活性から医薬の探索源として注目されている. 本研究では放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノムから見出されたランチペプチドの生合成酵素遺伝子クラスターを解析し、異種発現によりラビオニンと *AvyCys* が融合した新規構造を有する *goadpeptin* を発見した. さらに無細胞翻訳系と組換え酵素を組み合わせた生合成経路の再構成により、*goadpeptin* の試験管内合成に成功した. この再構成系を用いて生合成酵素の詳細な機能を解析したところ、生合成前駆体が酸化的脱炭酸酵素 *GopD* による修飾反応を受けることで、続くクラス III ランチペプチド合成酵素 *GopKC* の環化反応生成物が単環性から二環性へと変化することが見出された. これら修飾酵素の基質特異性を解明し、類縁体を創製することでランチペプチドのケミカルライブラリーを拡張すると共に新規薬剤の開発につながることを期待される.

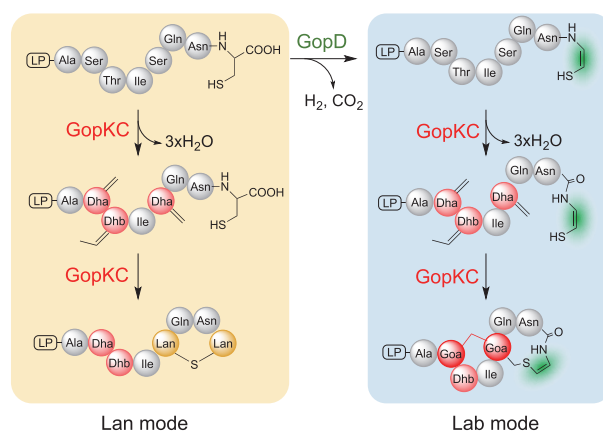


Fig. 11 Ring formation reaction switched from lanthionin mode to labionin mode by preceding modification reaction

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 菅井佳宣, 小野拓人, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2016. 新規ポリケタイド-RiPPs ハイブリッド化合物の生合成研究. 第31回日本放線菌学会大会. 9月8日, 東京
- 2) 菅井佳宣, 浅水俊平, 尾仲宏康. 2017. 新規RiPPs-ポリケタイドハイブリッド化合物の生合成経路解析. 日本農芸化学会2017年度大会. 3月18日, 京都
- 3) Yoshinori Sugai, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka. 2017. Biosynthetic studies on the class III lanthipeptide synthetase found in the goadsporin producing strain *Streptomyces* sp. TP-A0584. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. May 24, Jeju, Korea
- 4) 菅井佳宣, 千田美紀, 小野拓人, 浅水俊平, 千田俊哉, 尾仲宏康. RiPP-polyketideハイブリッド化合物の生合成に関与するGNAT型アシル転移酵素の解析. 第32回日本放線菌学会大会. 9月7日, 長野
- 5) 菅井佳宣, 江畑一真, 浅水俊平, 後藤佑樹, 菅裕明, 尾仲宏康. 新規decarboxydehydrolabionin構造の形成に関与するlanthipeptide合成酵素の解析. 2018年度日本農芸化学会大会. 3月15-18日, 名古屋

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の寄付講座助成によって開設された微生物潜在機能探索寄付講座においてなされたものである。本助成を賜った発酵研究所に対して、ここに厚く御礼申し上げます。本寄付講座世話人である東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・大西康夫教授のご支援とご協力に感謝の意を表します。無細胞翻訳系を用いた実験は東京大学大学院理学研究科化学専攻・生物有機化学研究室で行われたものである。菅裕明教授ならびに後藤佑樹准教授に厚く御礼申し上げます。生合成研究でご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・勝山陽平准教授に感謝の意を表します。

文 献

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Göransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Müller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T.,

Süssmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M. & van der Donk, W.A. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**: 108-160.

Aszodi, J., Carniato, D., Le Beller, D., Lesquame, G. & Quernin, M. 2017. New bicyclic lipopeptide, preparation and use as antimicrobial agent. European patent application EP3111948A3111941.

Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M.J. & van der Donk, W.A. 2010. Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol.* **8**: e1000339.

Igarashi, Y., Kan, Y., Fujii, K., Fujita, T., Harada, K., Naoki, H., Tabata, H., Onaka, H. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1045-1053.

Iorio, M., Sasso, O., Maffioli, S.I., Bertorelli, R., Monciardini, P., Sosio, M., Bonezzi, F., Summa, M., Brunati, C., Bordonni, R., Corti, G., Tarozzo, G., Piomelli, D., Reggiani, A. & Donadio, S. 2014. A glycosylated, labionin-containing lanthipeptide with marked antinociceptive activity. *ACS Chem. Biol.* **9**: 398-404.

Jungmann, N.A., van Herwerden, E.F., Hügelland, M. & Süssmuth, R.D. 2016. The supersized class III lanthipeptide stackeoptin displays motif multiplication in the core peptide. *ACS Chem. Biol.* **11**: 69-76.

Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R. & Willey, J.M. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**: 11448-11453.

Krawczyk, B., Völler, G.H., Völler, J., Ensle, P. & Süssmuth, R.D. 2012. Curvopeptin: a new lanthionine-containing class III lantibiotic and its co-substrate promiscuous synthetase. *Chembiochem* **13**: 2065-2071.

Kupke, T. & Götz, F. 1997. The enethiolate anion reaction products of EpiD. pK_a value of the enethiol side chain is lower than that of the thiol side chain of peptides. *J. Biol. Chem.* **272**: 4759-4762.

Kupke, T., Stevanović, S., Sahl, H.G. & Götz, F. 1992. Purification and characterization of EpiD, a flavoprotein involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin. *J. Bacteriol.* **174**: 5354-5361.

Maffioli, S.I., Monciardini, P., Catacchio, B., Mazzetti, C., Münch, D., Brunati, C., Sahl, H.G. & Donadio, S. 2015. Family of class I lantibiotics from actinomycetes and improvement of their anti-bacterial activities. *ACS Chem. Biol.* **10**: 1034-1042.

Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértessy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, G.M. & Süssmuth, R.D. 2010. Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**: 1151-1154.

Müller, W.M., Schmiederer, T., Ensle, P. & Süssmuth, R.D. 2010. *In vitro* biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**: 2436-2440.

- Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2005. Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **151**: 3923-3933.
- Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y. & Furumai, T. 2001. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**: 1036-1044.
- Ortega, M.A. & van der Donk, W.A. 2016. New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chem. Biol.* **23**: 31-44.
- Ozaki, T., Yamashita, K., Goto, Y., Shimomura, M., Hayashi, S., Asamizu, S., Sugai, Y., Ikeda, H., Suga, H. & Onaka, H. 2017. Dissection of goadsporin biosynthesis by *in vitro* reconstitution leading to designer analogues expressed *in vivo*. *Nat. Commun.* **8**: 14207.
- Repka, L.M., Chekan, J.R., Nair, S.K. & van der Donk, W.A. 2017. Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chem. Rev.* **117**: 5457-5520.
- Sit, C.S., Yoganathan, S. & Vederas, J.C. 2011. Biosynthesis of aminovinyl-cysteine-containing peptides and its application in the production of potential drug candidates. *Acc. Chem. Res.* **44**: 261-268.
- Völler, G.H., Krawczyk, J.M., Pesic, A., Krawczyk, B., Nachtigall, J. & Süßmuth, R.D. 2012. Characterization of new class III lantibiotics—erythreapeptin, avermipeptin and griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* demonstrates stepwise N-terminal leader processing. *Chembiochem* **13**: 1174-1183.
- Wang, H. & van der Donk, W.A. 2012. Biosynthesis of the class III lantipeptide catenulipeptin. *ACS Chem. Biol.* **7**: 1529-1535.
- Zhang, Q., Yu, Y., Vélasquez, J.E. & van der Donk, W.A. 2012. Evolution of lanthipeptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**: 18361-18366.

略号集

ACT	アクチノロージン	HOK021	<i>Streptomyces nigrescens</i> HOK021
A-factor	Autoregulatory factor, nM オーダーで作用する微生物ホルモン	ID-CAMHB	鉄欠乏培地
5aTHQ	5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin	Lanthipeptide	リボソームで合成され翻訳後に修飾を受けるペプチド
BCG	Biosynthetic Gene Cluster	LP	リーダーペプチド
CDI	Contact-Dependent growth Inhibition	MACB	Mycolic Acid Containing Bacteria ミコール酸を細胞表層に有する微生物
CDS	Coding Sequence	MIC	Minimum Inhibitory Concentration
CFU	コロニーフォーミングユニット	MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Combined-culture	複合培養	NRP	非リボソームペプチド
CP	Core Peptide	PTM	FabF 阻害剤 Platensimycin
DET	脱水 ENT 二量体	PTMs	翻訳後修飾酵素
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	RED	ウンデシルプロディギオシン
Dha	dehydroalanines デヒドロアラニン	RiPPs	Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide
Dhb	dehydrobutyrines デヒドロブチリン	ROS	活性酸素種
ENT	エンテロバクチン	ROSEY	Rotating frame overhauser effect spectroscopy
Ffh	Fifty four homologue	SEM	走査型電子顕微鏡
FIT	Flexible In vitro Translation	SM	二次代謝産物
GNPS	Global Natural Products Social	SRP	Signal Recognition Particle
GodA*	市販のエンドプロテアーゼ GluC で消化できるように CP の直前にグルタミン酸残基を挿入した改変 GodA	UPLC-ESI-QTOF-MS	超高性能液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化／四重極飛行時間／質量分析法
GS	goadsporin	VRE	vancomycin resistant enterococci
HDM	harundomycin		
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence		
HMQC	Heteronuclear multiple quantum conference		

平成 28 年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成 28 年 4 月～平成 30 年 3 月

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
mycoloop@gmail.com

目的：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、微細藻類に寄生している状態の菌体のDNAを解析する方法(Single Spore PCR法)により多様性を解明することを目的とした。

方法：千葉県印旛沼およびドイツのStechlin湖において、春から夏にかけて週2回から月2回の頻度で表層水を採取した。湖水を数mlチャンバーに取り、菌類を特異的に染色するCalcofluor Whiteを滴下し、蛍光顕微鏡下で観察した。菌類の付着した藻類(珪藻、緑藻、藍藻など)を見つけた折には、菌類が付着した状態で藻類を1細胞あるいは1コロニーピックアップした。藻類ごとDNAを抽出し、菌類に特異的プライマーを用いてSSU、ITS、LSU領域のrRNA遺伝子を増幅し、サンガー法により塩基配列を解析した。一部の試料については、別途、ユニバーサルプライマーを用いて、細菌類を含む全生物のSSU rRNA遺伝子を増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析した。同時に、宿主となる藻類を複数種もちいで寄生菌類の単離培養を試みた。

結果・考察：サンガー法で解析した結果、印旛沼やStechlin湖には多様な寄生性菌類が存在することが明らかとなった。検出された多くはツボカビであり、新規系統の種を含む多様な系統が見つかった。印旛沼の試料については、珪藻 *Aulacoseira* 2種からクリプト菌やAphelidaも検出された。Stechlin湖からはツボカビのみが検出されたが、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ロゼラ属(*Rozella*)に近縁であった。ロゼラ属(*Rozella*)には菌類に寄生する種類が含まれており、今回検出された菌類も藻類自体よりは藻類に寄生するツボカビに寄生していた可能性が高い。藻類を餌として菌類の単離培養を試みた結果、ツボカビについては複数種、単離培養が成功した。しかし、クリプト菌の培養はうまくいかなかった。クリプト菌が藻類ではなく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,
現 国立環境研究所・生態系環境センター
ishida.ta@gmail.com

目的：アーバスキュラー菌根(AM)菌はおよそ8割の陸上植物の根に感染し、植物から光合成産物をもらう代わりに、土壌の養水分を植物へと供給するという共生関係にある。AM菌は宿主植物なしに培養することが出来ないため、現在ではポット栽培での植物との共培養が行われている。しかし、ポット栽培ではクロスコンタミネーションの危険が高く、バクテリアや腐生菌の混入も不可避である。さらには、継代作業の手間、広い培養面積、植物育成のための光源など、菌株の維持・管理には多くの苦勞を抱えている。

近年発展した *in vitro* でのAM菌培養法は、毛状根を宿主に用いるため、ポット栽培の欠点を克服し、*in vitro* 培養の利点を備えている。本研究では、毛状根培養方法を発展させ、多種の菌株を維持管理出来るような培養方法・長期保存方法を開発すること、そして、カルチャーコレクションから分譲可能な国産株を整備することの2点を目的とした。

方法：国内17カ所から92の土壌を採取し、新しい胞子

の増殖を目的として室内でのソルガム/クローバーなどをポット栽培した後、このポット土壌からの胞子の採集を行った。また東京大学と千葉大学から、すでにポット栽培で分離されたAM菌株の栽培土壌からも胞子を採集した。AM菌の胞子は土壌懸濁液から顕微鏡下のピペット操作で採取したほか、懸濁液をLudoxとともに遠心分離することによっても回収した。また、野外からAM菌の胞子果を採取した。これらの胞子を表面殺菌した後培地で発芽させることにより *in vitro* 化を試みた。

結果・考察：ポット栽培した土壌の内、22試料から胞子の採取を試みた。そのうち6試料からは胞子が見つからなかった。発芽した胞子でもバクテリアや糸状菌のコンタミにより廃棄したものも多かったが、2株のAM菌は毛状根に感染したようであった。しかし、その後成長が非常に遅いかほとんど止ってしまった。ポット栽培分離株13株からは胞子数百粒を平板培地に静置したところ、少なくとも4株で発芽が見られたが、これらを毛状根に接種するなどして継代したところ、最終的に千葉大学の分離株S-20から *in vitro* の継代培養が可能な菌株を得た。野外から採取した胞子塊はピンセット等で胞子をばらした後に表面殺菌しても、コンタミネーションが非常に多く、分離源としては不向きだった。

土壌からの胞子の洗い出し自体は比較的簡便であるが、発芽に至る胞子はずかであり、発芽しても毛状根に感染させることも困難であった。また、ベルギーにあるGINCO (Glomeromycota In vitro Collection) から現在利用できる *in vitro* 株はすべて *Rhizophagus* 属であり、今回 *in vitro* 培養化できたS-20株も *Rhizophagus* 属であった。一部の土壌試料からは *Gigaspora* 属と思われる胞子がよく発芽したが、最終的には菌糸伸長が見られなくなったこともあり、毛状根培養が適用可能な分類群が狭い可能性が考えられた。

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
naktak@ttck.keio.ac.jp

目的：オオヒゲマワリ属 (*Volvox*) を含む群体性藻類の系統 (TGV 系統群) は、多細胞生物の起源を探る手がかりとして注目されている。群体性の進化的な起源を明らかにするためには、単細胞性姉妹群との比較研究も必要であるが、TGV 系統群に近縁な単細胞藻類の分類学的整理は進んでおらず、TGV 系統群の姉妹群も特定されていない。そこで本研究では複数遺伝子系統解析により群体性系統の単細胞性姉妹群を特定し、光学および透過型電子顕微鏡観察に基づき群体性に関わる形質進化の解明をめざした。

方法：TGV 系統群に近縁な *Chlamydomonas* 属および *Vitreochlamys* 属の既知株、および新たに分離した類似株について、光学顕微鏡観察および断片的な 18S rRNA 遺伝子情報から対象株を絞り込んだ。18S rRNA 遺伝子系統樹上で強く支持された単系統群について、それぞれの代表株を選択し、葉緑体5遺伝子 (*atpB*, *rbcL*, *psaA*, *psaB*, *psbC*) を加えた6遺伝子系統解析を行った。複数遺伝子系統解析に際しては、遺伝子ごと、コドン位置ごと、対象株ごとの塩基組成などの偏りを検討するため、任意の遺伝子、偏りが疑われるコドン位置・株をそれぞれ除いた系統解析も行った。これら複数遺伝子系統解析の結果に基づき、TGV 系統群に近縁な代表株6株について透過型電子顕微鏡観察を行った。

結果・考察：18S rRNA 遺伝子系統からはTGV 系統群に近縁な32の単細胞系統群 (単細胞系統群1~32, うち13系統は新規) が認められたため、そのうち培養株が入手できた29系統について複数遺伝子系統解析を行った。29系統群はさらに6系統群 (メタ系統群A~E, および単細胞系統群19) に整理され、*Chlamydomonas pila* を含むメタ系統群AがTGV 系統群の姉妹群であることが弱いながら示唆された。一部データを除外した解

析でも、大きく異なる結果は得られなかった。光学および透過型電子顕微鏡観察の結果からは、特殊化した細胞壁を持ち二分裂による無性生殖を行うメタ系統群Bを除き、形態学的に明瞭な識別形質は見いだされなかった。また遊走子嚢を形成する全ての系統群で遊走子嚢中の遊走子数に個体差（2体または4体）があった。

今回、未知の18S系統群を多数見いだすと共に、TGV系統群に近縁な単細胞性藻類の系統学的整理を大きく進めることに成功した。これまでは多数の単細胞系統から恣意的に選ばれた種が比較研究に用いられてきたが、今回の成果により系統学的に妥当な代表種（株）の選択が可能になった。またメタ系統群間の形態差が乏しかったことは、分類学的整理の困難さを浮き彫りにしつつ、系統分化が進化的に短期間に進んだ可能性も示唆している。特に単細胞藻類で遊走子嚢中の遊走子数が定まっていなかったことは、その制御が群体性進化の直前またはごく初期に生じたことを示唆している。

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
kmuraka@nih.go.jp

目的：人獣共通感染症原因菌 *Escherichia albertii*（エシエリキア・アルベルティイ）は、2003年、‘*Hafnia-like*’下痢原性株に提唱された新菌種である。鳩等の野鳥が保菌し、ヒトに下痢等の消化器症状を惹起する。国内では複数の集団感染事例が報告されていて、中には患者数100名を超す事例もある。本菌は、現在2つの生物型の存在が明らかとなっている。我々は、新たに第三の生物型を発見した。この第三の生物型は、通常の検査では大腸菌と誤同定されることが多発している。これは、この生物型3が、公知のものであるとは言えない状況だからである。本研究では、*Escherichia albertii*の生物型3を確立し、大腸菌との誤同定を減らすよう情報提供することを目的とする。それに加え、本菌全体の系統を明らか

にし、生物型3を含めた本菌全体の簡便な検出・同定方法を提唱し、細菌学、公衆衛生学の発展に寄与する。

方法：本菌417株を収集し、パルスフィールド・ゲル電気泳動による遺伝子型別にて独自のプロファイルを示す107菌株、さらに基準株（LMG 20976^T）、および標準株（ATCC 12032など計3株）（合計111株）を用いて菌株の生化学性状（計77性状）を確認した（試験管法、API 50CH、およびAPI XYMキット）。試験は2度繰り返して行ったが、必要に応じて3、4回繰り返し試験したものもある。そのほか病原性関連遺伝子保有の有無、Multilocus sequence typing（MLST）を実施した。更に、40菌株を選びnext-generation sequencing（NGS）を用いて型別を行った。

結果・考察：111菌株は、生化学性状により81の型に分類された。Biogroup 1に含まれる菌株は基準菌株と標準菌株（LMG 20972および20973）のみであった。同様にBiogroup 2に含まれる菌株は標準菌株（ATCC 12032）のみであった。他の野生株107株は全てBiogroup 1および2に属さない性状を示した（リジン脱炭酸試験陽性かつインドール陽性）（Biogroup 3とする）。MLSTの結果からもBiogroup 1、2および3におけるハウスキーピング遺伝子の大きな類似度の差異は認められなかった。NGSによる解析により過去の報告で*Escherichia albertii*は系統的にG1-G5の5つのグループに分けられているが、本研究で解析した株はG1-G4に含まれ、多くはG1のグループに分類された（35/40株）。以上の結果から、臨床および公衆衛生上の検査において混乱を避けるためにも、本菌におけるBiogroup 3（リジン脱炭酸陽性かつインドール陽性）という新たなグループの存在を提唱する。

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
fukiharu@chiba-muse.or.jp

目的：陸上に植物と菌類の共生系としての森林が誕生し、その後、陸生動物群も登場し森林の中で排泄・死亡するなかで、動物関連物質の分解に関与する菌類、すなわち糞生菌類（動物糞上に発生）やアンモニア菌類（動物死体や糞尿分解跡に発生）が誕生した。人類も含め動物の暮らしに深く関与し、森林生態系にとっても重要なこれらの菌類についての基本情報は少ない。今回は日本を中心に東アジアの該当菌類の種類相について調査した。

方法：糞生菌類：国内では千葉県、京都府、沖縄県で採集したニホンジカ、キョン、ニホンイノシシ、イリオモテヤマネコ、リュウキュウイノシシの糞、国外ではベトナムで採集した野生アジアゾウ糞を、湿室培養し、発生する糞生の菌類相（ヒトヨタケ類 [担子菌類：ハラタケ科、ナヨタケ科]、チャワಂತケ類 [子囊菌類：チャワಂತケ科]) を調査した。アンモニア菌類：北海道九州大学足寄演習林に発生区を設置し(カシワとミズナラ林、1×2m×4か所、2016年6月13日設置)、調査した(現地調査は5回：2016年7月14日、8月22日、9月下旬、10月上旬、10月17日)。

結果・考察：糞生菌類：従来日本産ヒトヨタケ類約40種のうち、糞生として11種が知られていたが、今回の調査で合計7種が分離され、うち1種 *Coprinellus pusillulus* は日本新産のヒトヨタケ類であった。またイリオモテヤマネコ・リュウキュウイノシシの糞から日本新産のチャワಂತケ類3種 *Ascobolus crenulatus*, *A. lineolatus*, *A. fushanus* が採集された。ベトナムからは28種のヒトヨタケ類が報告されており、うち6種が糞生として知られていた。今回の調査で“*Coprinopsis yokdonensis*” (現在記載中) を含む未記載の3種、ベトナム新産3種を含む、合計8種のヒトヨタケ類を分離することができた。アン

モニア菌類：ヒメシバフタケ属 (*Panaeolina*) 未記載種の発生が期待された北海道において、目的の菌種についての多数の標本と菌株及び分子系統の情報を得ることができ、新種“*Panaeolina jezoensis*”として記載をすすめている。今回得られた、新産・未記載の糞生菌類とアンモニア菌類について、現在、論文化をすすめており、収集した菌株についても可能なものはNBRCへの寄託を予定している。

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
mwatanabe@nihs.go.jp

目的：住宅室内の真菌数が異常増加した場合に、吸入曝露による喘息等アレルギー疾患が発生する可能性がある。一方で、医療機関では、商業ベースで実施される菌種特異的抗原を用いた血清学的検査で陽性判定が出た場合にも、示唆される病原菌種と臨床試験の結果が必ずしも一致しないケースや、患者宅から病原菌種が検出されない等により病因の特定に至らないケースがあることが問題となっている。これらが生じる原因のひとつとして、真菌アレルゲンタンパクの多様性についての知見が乏しいことが挙げられるが、これまで真菌アレルゲンについて行われた詳細な解析は少ない。そこで本研究では、真菌の中でもアレルゲン性の高い *Aspergillus* 属菌の複数菌種について、アレルゲン遺伝子の多様性に関する分子分類学的検討を行った。

方法：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中の真菌叢解析を行った。続いて、多様な真菌種においてアレルゲン遺伝子として発現していると考えられる *Alt_a_6* および *Asp_v_13* のアミノ酸配列について、公共DBからのダウンロードおよび本研究における分離株から実験的に配列決定することによって収集し、配列の相同領域の比較を行った。続いて、アミノ

酸配列ごとに既存のエピトープ (epitope) 配列との類似性と立体構造の予測を行い、各菌種のアレルゲン性の強さについて予測評価を行った。

結果・考察：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、築浅の住宅では *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、*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、最もアレルゲン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* 属菌が優占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 *Alt_a_6* および *Asp_v_13* のアミノ酸配列の比較解析を行った。その結果、*Alt_a_6* では配列共通性は高く、*A. fumigatus* 以外の多様な *Aspergillus* 属菌も高いアレルゲン性を有する可能性が示唆された。一方で、*Asp_v_13* では、*Alt_a_6* と比較するとアミノ酸配列の菌種間の変異が蓄積しており、アレルゲン性が菌種によって異なる可能性が考えられた。さらに、両遺伝子ともに特異的なアミノ酸変異が epitope 領域に存在することを確認した。これらのことから、*Aspergillus* 属菌の中でのアレルゲン性の違いに考慮し、真菌アレルギー患者の診断や治療方法について検討する必要があると考えられた。

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ルム形成に
関する生態学的研究

眞 島 いづみ

北海道医療大学歯学部
i.mashima106@gmail.com

目的： *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ルムであり、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んでい

なかった。

我々はこれまで、ヒト口腔内から多数の未同定株を分離後、その一部を新菌種 *V. tobetsuensis* として登録し、本菌がヒト口腔内で優勢であることを明らかにした。

本研究では上記未同定株の系統分類を進めると同時に、*V. tobetsuensis* が産生する細菌間情報伝達物質 (Autoinducer: AI) の口腔バイオフィルム初期形成過程における生態学的役割を明らかにすることを目的とした。方法：多数の未同定株の 16S rRNA, *rpoB*, *dnaK* 遺伝子の塩基配列を網羅的に解析し、そのデータから系統樹及び類似性解析を行い、小児口腔から分離された *Veillonella* sp. T11011-4 株を新菌種候補とした。近縁菌種との Average Nucleotide Identity (ANI) の算出、各種生化学的性状を解析し、GC-MS にて終末代謝産物の測定を行った。

一方、*V. tobetsuensis* の培養上清中の AI-2 活性を測定後、最大活性を示した培養上清から、Sep-Pak C18 カラム (Waters) を用いて AI-2 を部分精製した。次いで、口腔バイオフィルム形成開始菌である *Streptococcus gordonii* の、バイオフィルム形成に及ぼす AI-2 部分精製物の影響を解析した。

結果・考察：T11011-4 株は、既報の *Veillonella* 属細菌と同等の生化学的性状を示し、本属細菌に特徴的な、酢酸とプロピオン酸を終末代謝産物とする乳酸代謝が確認された。また、16S rRNA 遺伝子は既報菌種と 98.8% の高い類似性を示したが、*rpoB* 及び *dnaK* 遺伝子とはいずれも 95.9% 以下の低い類似性を示し、さらに ANI は全て 91.8% 以下であったことから、本株を *Veillonella infantium* と命名し (JCM 31738^T, TSD-88^T)、新菌種として確立した。

V. tobetsuensis 由来 AI-2 部分精製物は、経時的、濃度依存的に *S. gordonii* のバイオフィルム形成を抑制したが、その浮遊状態の細胞の増殖抑制は認められなかった。

本研究結果から、*V. tobetsuensis* 由来 AI-2 がう蝕や歯周病の新規的予防及び治療法の確立に応用できる可能性が示唆された。また、*Veillonella* 属細菌の系統分類が進み、今後口腔バイオフィルムの形成機序の解明に寄与することが期待される。

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
hamada-moriyuki@nite.go.jp

目的：ペプチドグリカンはグラム陽性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は、分子系統による分類と高い相関性を示すことから、グラム陽性細菌、特に放線菌における属レベルの指標として広く用いられている。現在多くの分類学者は新規分類群の提唱に際し、ペプチドグリカンの加水分解物を TLC や HPLC を用いて分析し、含まれるアミノ酸の種類や量比からペプチドグリカンタイプを推定しているが、新規もしくは複雑な構造になると、豊富な経験を持つ特定のグループしか構造決定できないのが現状である。本研究では、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) を用いることで、正確かつ客観的なデータに基づき、簡便で信頼性の高いペプチドグリカンアミノ酸構造決定法を開発することを目的とした。

方法：詳細なアミノ酸構造が既に決定されている放線菌 *Cellulomonas flavigena* NBRC 3775^T と *Oerskovia turbata* NBRC 15015^T を分析対象とした。定法により抽出・精製した細胞壁サンプル 1mg を 4N HCl で 100℃ 45 分間加水分解した後、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 (APDS) で誘導体化したものを、逆相系カラムを使用した LC-MS を用いて分離し、各アミノ酸およびペプチドの分子量から同定を行った。

結果・考察：まず、LC-MS によるアミノ酸の検出手法について検討を行った。市販の複数の誘導体化試薬を用いてアミノ酸の標準試料の分析を行ったところ、APDS による誘導体化法が高感度かつ安定的に検出可能だった。この方法で *C. flavigena* NBRC 3775^T と *O. turbata* NBRC 15015^T のペプチドグリカン完全加水分解物 (4N HCl 100℃ 16 時間) を分析したところ、報告されている全構成アミノ酸を検出可能なことが確認された。次にペプチドグリカン構造を推定する上で重要なジペプチドやト

リペプチドの状態でアミノ酸が多く残存する部分加水分解条件について検討を行った。様々な温度 (60 ~ 100℃) と時間 (30 分 ~ 3 時間) を組み合わせて加水分解を行って比較したところ、4N HCl で 100℃ 45 分間加水分解した際に最も良好な結果が得られることが明らかとなった。この加水分解条件と APDS 誘導体化法を組み合わせてペプチドグリカンを分析したところ、完全加水分解サンプルからは検出されなかったジペプチド (NBRC 3775^T: Asp-Ala, Ala-Glu, Glu-Orn, Orn-Asp; NBRC 15015^T: Ala-Glu, Thr-Asp, Lys-Thr) とトリペプチド (NBRC 3775^T: Orn-Asp-Ala; NBRC 15015^T: Lys-Thr-Asp, Glu-Lys-Thr) が検出された。今回得られた結果は、両株のペプチドグリカン構造が既報に一致することを強く示唆していた。以上のとおり、本研究で開発した手法は簡便かつ迅速に分析可能で、従来の定量分析および異性体分析の結果と組み合わせることで詳細なアミノ酸構造を推定もしくは決定することができるため、今後広く普及することが期待される。

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
masahiro.yuki@riken.jp

目的：シロアリ腸内には、十数種の原生生物と数百種の細菌が共生している。さらに原生生物の細胞内、細胞表面にも細菌が共生し、多重共生系を構築していることが分かっている。しかし、多くの共生細菌は難培養性であるため、分子生物学的解析が進んでおらず、共生系における役割が分かっていた。本研究では、シロアリ腸内の原生生物 *Pyrsonympha* の細胞表面に共生する 3 種の *Treponema* 属細菌 (Cluster I, Cluster IIA, IIB) のゲノム配列をシングルセルゲノム解析により解読し、共生系における各細菌の役割を解明することを目的とした。

方法：マイクロマニピュレーターを用いて、腸内微生物叢から *Pyrsonympha* を 20 細胞集め、破碎し、*Treponema*

属細胞表面共生細菌を含んだ溶液を調製した。この溶液から、セルソーターを用いて細菌を1細胞毎に分離した。分離した細菌を溶菌し、Phi29 DNAポリメラーゼにより全ゲノム増幅を行い、3種の *Treponema* 属細菌の全ゲノム増幅産物を取得した。得られた全ゲノム増幅産物からライブラリーを作製し、MiSeqでシーケンスを行った。さらに長鎖配列を得るため PacBio を用いたシーケンスも行った。SPAdesを用いて、アセンブルを行い、ドラフトゲノム配列を取得した。このドラフトゲノム配列からゲノム完全性を求め、ProkkaとRASTを用いてアノテーション解析を行った。ゲノム完全性が低かった Cluster IIB のドラフトゲノム配列に関しては、原生物1細胞をその共生細菌と一緒に丸ごとミニメタゲノム解析し、ビンニング (binning) 解析によりゲノム完全性が高い Cluster IIB 配列の取得を行った。

結果・考察：Cluster I 3.8Mb, Cluster IIA 2.6Mb, Cluster IIB 1.3Mb のシングルセルゲノム配列を得ることに成功し、ゲノム完全性はそれぞれ 92.8%, 85.6%, 42.4% であった。Cluster IIB に関しては、ミニメタゲノム解析から、ゲノム完全性が90%以上の配列を取得できた。アノテーション結果から、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、シロアリにエネルギー源として供給している可能性が示唆された。Cluster IIA は、多種多様な糖質加水分解酵素遺伝子を有していることから、原生物と協調した木材分解系を構築していることが示唆された。Cluster I, Cluster IIB は糖質加水分解酵素遺伝子が少ないことから、この木材分解系から生じた遊離糖を取り込んで利用している可能性が示された。これらの結果から、原生物 *Pyronympha* の細胞表面に共生している3種の *Treponema* 属細菌が、それぞれ異なった役割を担い共生していることが示唆された。

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
titoh_jcm@riken.jp

目的：近年、他のアーキアに寄生または共生していると思われるゲノムサイズの小さい微小アーキア（本研究ではナノアーキアと称する）が、温泉・鉱山排水・塩田・海底堆積物など様々な環境から発見されてきている。このうち *Nanoarchaeota* 門アーキアは、海底熱水孔や陸上温泉から頻りに検出されており、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。本研究では陸上温泉に存在する *Nanoarchaeota* を中心にその生態学的分布を解明し、またそれらの培養株の確立を目指すことを目的とした。

方法：秋田県及び栃木県の火山性酸性温泉から温泉水を採取し、その1リットルを孔径0.2 μ mメンブレンフィルターに通して細胞を捕集し、これよりDNA抽出を行った。さらに *Nanoarchaeota* を含めたアーキア及びバクテリアをカバーする16S rRNA 遺伝子プライマーを設計し、3温泉試料について次世代シーケンサーによる菌叢解析を行った。一方、これら温泉試料について温度 (85, 70, 45 $^{\circ}$ C), pH (2.5, 5.0), 気相 (air, 80% H_2 -20% CO_2), 添加物 (硫黄またはチオ硫酸) の有無を変えて様々な培養条件下で集積培養を行い、生育が認められた場合にはDNA抽出を行い、アーキアあるいは *Nanoarchaeota* 16S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いてそれぞれの検出を行った。必要に応じてその遺伝子配列を決定し系統学的解析を行った。

結果・考察：野外で採取した温泉水2試料（秋田県後生掛温泉及び蒸ノ湯温泉）には全リード中17~36%の、屋内浴槽中温泉水（栃木県奥塩原温泉）には1.4%の比率で *Nanoarchaeota* が検出できた。一方、集積培養物からの検出では、浴槽中温泉水試料において70 $^{\circ}$ C・pH2.5・好気条件下、硫黄添加または無添加の集積培養

物からは一次 PCR で *Nanoarchaeota* を検出することが可能であった。しかし、この培養物の継代培養を繰り返すと次第に一次 PCR による *Nanoarchaeota* 検出は困難となった。さらに、凍結保存してあった本温泉水試料を段階的に希釈・分配した多検体について同培養条件（硫黄存在下）で培養したところ、1,200 倍希釈した培養物は培養管 50 本中 12 本で生育が認められ、これらからはいずれもアーキア（系統解析によって 2 種の *Acidianus* spp. と同定）、*Nanoarchaeota* を検出することができた。しかしながら、*Nanoarchaeota* の PCR 増幅産物は収量が少なく、その存在量はきわめて低いものと思われた。

今後、*Nanoarchaeota* の存在量を定量化したうえでその消長をより詳細に調べていくことによって、培養株の確立を図っていききたい。

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
dairi@eng.hokudai.ac.jp

目的：自然界で見出されるペプチド化合物のアミド形成機構として最も良く知られているのが、タンパク質の合成と同様にリボソーム関与の機構である。リボソームが関与しないペプチドの生合成として、非リボソームペプチド合成の英語名 non-ribosomal peptide synthesis の頭文字を取って NRPS と総称される機構による生合成も知られている。さらに、アミノ酸を ATP を用いてリン酸化により活性化した後、もう 1 つのアミノ酸のアミノ基との間でアミド結合を形成する ATP-grasp-ligase が存在する。本酵素については、求核剤として使えるのはアミノ酸のみであり、ペプチドや求核性の化合物を利用できる酵素は知られていなかった。しかし筆者は放線菌が生産するペプチド系抗生物質フェガノマイシン (pheganomycin) の生合成研究を通して、ATP-grasp モチーフを持つ新規ペプチドリガーゼが、ATP を用いて多様な化合物のカルボン酸をリン酸化し、種々の配列や長さからなるペプ

チドを求核剤に用いてアミド形成することを見出した。本酵素の遺伝子の相同遺伝子（オーソログ）は放線菌を中心に多種多様な微生物に分布していることから網羅的機能解析を試みた。

方法： *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451, *Kitasatospora aureofaciens* NBRC 12843, *Streptomyces varsoviensis* NBRC 13093, *Streptomyces catenulae* NBRC 12848, *Actinokineospora inagensis* NBRC 15663, *Bradyrhizobium lablabi* NBRC 108826, *Pseudomonas syringae* MAFF 301538, *Catelliglobospora koreensis* NBRC 105861, *Nocardioopsis baichengensis* NBRC 104399 のゲノム配列に見出した ATP-grasp ligase 相同遺伝子を含む推定生合成遺伝子を PCR で増幅あるいはシャトルコスミドにクローニング後、異種宿主である *Streptomyces lividans* に導入し、特異的に生産される代謝産物の検出を試みた。

結果・考察：予想に反し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り、クラスター内に存在する転写因子の活性化などが必要であると考えられた。唯一、*N. baichengensis* NBRC 104399 由来のクラスターを発現させた場合、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
ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

目的：テルペノイドはイソプレヌユニットの倍数体を基本骨格とする天然化合物である。中でも 3 つのイソプレヌユニットからなるセスキテルペノイドは化学構造の多様性に富み、優れた生物活性を示す化合物も多く、創薬リード化合物の探索資源として期待される。その生合成

過程では、骨格化合物の産出を担うセスキテルペン合成酵素 (STS) と、骨格化合物への酸化修飾を施すシトクロム P450 (P450) が連鎖的に機能して構造多様性に富む化合物群が産生される。我々は、木材腐朽担子菌および麹菌に由来する 425 種の糸状菌 P450 を獲得し、酵母を用いた P450 異種発現技術を開発してきた。本研究では、担子菌に由来する様々な STS を 425 種の P450 と網羅的に共役させ、多種多様なセスキテルペノイドの産生を試みた。

方法：白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* および褐色腐朽菌 *Postia placenta* のゲノム配列を精査して STS 候補遺伝子を探索し、RT-PCR により cDNA を増幅した。得られた cDNA を *Saccharomyces cerevisiae* に形質転換して異種発現させた。形質転換酵母が産生する代謝物を GC-MS 分析に供することで STS の酵素機能を同定した。さらに、STS と P450 を共発現する酵母を作出し、代謝物を網羅的に分析してセスキテルペン骨格化合物を水酸化する糸状菌 P450 を同定した。

結果・考察：*P. chrysosporium* および *P. placenta* に 36 種の STS 候補遺伝子が見出され、このうち 26 種の STS を完全長 cDNA として獲得することに成功した。*S. cerevisiae* を宿主として担子菌 STS を異種発現させたところ、少なくとも 35 種の化合物が検出され、多様性に富むセスキテルペン骨格化合物を産出することが可能となった。中でも、ピサボレン合成酵素およびプロトイルデン合成酵素が産出する骨格化合物は、生物活性セスキテルペノイドの有望な前駆体として期待された。

つづいて、STS と 425 種の糸状菌 P450 を共発現させて多種多様なセスキテルペノイドの産生を試みた。一連の検討によりピサボレン変換活性を示す 5 種の P450 が同定され、少なくとも 7 種のピサボレン水酸化体を得ることに成功した。また、プロトイルデン合成酵素と P450 を共発現させたところ、3 種の糸状菌 P450 がプロトイルデンに対する水酸化活性を示し、5 種のプロトイルデン水酸化体を得ることに成功した。ピサボレンおよびプロトイルデン誘導体の生物活性は広く注目されており、本研究で得た様々な水酸化体の有用性について興味も

たれた。本研究の結果は、糸状菌 P450 を利用することでテルペノイドのコンビナトリアル合成を可能性にした例であり、本例を起爆剤として様々な有用天然物の高効率生産が進展すると期待している。

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
futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

目的：焼酎製造に用いられる白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) は、クエン酸を高分泌生産する能力をもち、醪の pH を下げて雑菌汚染を防ぐ重要な役割がある。本研究は、白麹菌のクエン酸高分泌生産機構の解明を目的として、比較ゲノムにより見出した推定ミトコンドリア局在型クエン酸輸送体 (CtpA と YhmA) を解析した。なお、*yhmA* 遺伝子は糸状菌のゲノムにおいてクエン酸合成酵素遺伝子 (*citA*) の下流に高度に保存されているため、クエン酸生産機構と密接に関連していることを予測して、解析対象とした。

方法：白麹菌から CtpA と YhmA を精製してリボソームに再構成し、 $[^{14}\text{C}]$ クエン酸を用いてクエン酸輸送活性を測定した。また、*ctpA* 遺伝子破壊株、*yhmA* 遺伝子破壊株、*yhmA* 遺伝子破壊株における *ctpA* 遺伝子のコンディショナル発現株、各相補株、GFP 融合タンパク質発現株を構築した。これらの株の表現型、有機酸生産、細胞内のアミノ酸濃度を解析した。

結果・考察：まず、CtpA と YhmA のクエン酸輸送活性を測定した結果、いずれも交換輸送体であることが示唆された。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、オキソグルタル酸、オキサロ酢酸、コハク酸といった幅広い対向基質でクエン酸輸送活性を示した。次に、*ctpA* と *yhmA* を単独破壊すると、クエン酸生産量が減少した。また、*yhmA* 破壊株におい

てTet-On システムによる *ctpA* のコンディショナル発現株を構築した。同株の観察により、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊が最少培地で合成致死となることが明らかになった。次に、CtpAとYhmAにGFPを付加して蛍光顕微鏡により観察した結果、CtpAとYhmAが少なくともミトコンドリアに局在することが示唆された。さらに、リアルタイム RT-PCRの結果から、クエン酸を高生産する培養条件で *ctpA* と *yhmA* の転写が誘導されることが明らかになった。また、*ctpA* と *yhmA* の二重破壊が合成致死となったことから、クエン酸輸送には重要な生理的意義があると考えて、有機酸を起点とするアミノ酸合成に着目した。各破壊株の細胞内のアミノ酸濃度を分析した結果、共通してリジンが減少していた。そこで、最少培地にリジンを添加すると *ctpA* と *yhmA* の二重破壊条件でも生育できることを見出した。

以上の結果から、CtpAとYhmAがクエン酸高分泌生産に必要な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はリジン合成にも関与することが明らかになった。白麹菌の細胞質では、クエン酸の一部が2-オキシグルタル酸へと変換され、 α -アミノアジピン酸経路によるリジン合成に使われていると考察し、現在その詳細を解析している。

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
aiba@ps.nagoya-u.ac.jp

目的：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は、現代生物学が取り組むべき挑戦的課題の一つであり、本助成研究では分裂酵母をモデルとしてこれに挑戦した。得られた知見は、ヒトの健康長寿社会の構築に資する創薬・食品開発等の基盤知識となることが期待される。具体的には、以下にまとめた2つの研究を遂行し、成果を得た。

方法：「分裂酵母の寿命延長変異株の解析」について

分裂酵母の野生株をSD液体培地に接種し、長期間培養を繰り返すことで生き残る細胞を濃縮した。この中から長寿命変異株をスクリーニングし、変異株のゲノム情報を解析した。

「高発現することで分裂酵母の細胞寿命を延ばす因子の解析」について

当研究室で取得した「長生き因子：Ecl1」は高発現することにより分裂酵母の経時寿命を延ばす。そこで、まずEcl1の発現時期、発現誘導シグナル、発現に関わる転写因子を同定し、その上で、発現誘導シグナルが細胞寿命に与える影響を解析した。

結果・考察：「分裂酵母の寿命延長変異株の解析」について

大規模に長寿命変異株をスクリーニングし、独立に98株の変異株を取得した。この中から先行して原因遺伝子の特定を行った結果、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。これによって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。この成果は、グルコースの取り込み異常に起因する疾病に関して基礎的知見を与えるものと考えている。今後、Nnk1キナーゼを制御するシグナル、ならびにリン酸化する基質の同定を進める予定である。

「高発現することで分裂酵母の細胞寿命を延ばす因子の解析」について

長生き因子Ecl1は、転写レベルで硫黄源の枯渇に応答して転写因子Zip1により発現誘導されることを発見した。硫黄の枯渇は、Ecl1とそのパラログ(Ecl2, Ecl3: 総称してEcl1ファミリー)に依存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。既知の寿命延長シグナルであるカロリー制限(酵母ではグルコース制限)と硫黄枯渇とに共通して生じる細胞内変化をRNA Sequence法により探索したところ、リボソームの低下が起こることを見出した。さらに、変異や薬剤処理によ

り人為的にリボソームを低下させると寿命が延びることを証明した。これらの結果から、リボソーム低下が寿命延長の鍵であると考え、これを「寿命制御におけるリボソーム仮説」として提唱した。今後は、この仮説について普遍性を確認し、それに基づく寿命制御法を開発することが課題である。これらの解析と並行して、Ecl1タンパク質の機能—構造相関についても解析を行い、Ecl1は亜鉛結合タンパク質であることを示した。

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
uskos@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的：タンパク質のリジン残基に起こるアシル化修飾は、細菌からヒトまで広く存在する翻訳後修飾として知られている。筆者は、グルタミン酸発酵生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* において、代表的なアシル化修飾であるアセチル化とスクシニル化がグルタミン酸生産誘導刺激によって顕著に変化することを見出した。グルタミン酸生産条件では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が、それを担う代謝酵素の発現量は上昇しておらず、翻訳後制御の存在が示唆される。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についてアシル化修飾の機能解析を行った。

方法：リジンアシル化の機能の推定には、グルタミン置換（アセチル化模倣）、グルタミン酸置換（スクシニル化模倣）、アルギニン置換（非アシル化模倣）変異を用いた。部位特異的なアセチルリジン導入には、*Methanosarcina mazei* 由来の改変ピロリジル tRNA 及び PyrRS による遺伝暗号を拡張した *in vitro* 翻訳系を用いた。アシル化の検出には、修飾特異的抗体を用いたウェスタンブロットまたは MS 解析により行った。

結果・考察：オキサロ酢酸供給の補充経路酵素であ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、アセチル化部位である 653 番目のリジン残基（K653）はグルタミン酸生産に必須であることを見出した。模倣変異を用いた解析から、K653 アセチル化は酵素活性およびグルタミン酸生産を阻害することが示唆された。653 部位特異的にアセチルリジンを導入した PEPC タンパク質を調製し、K653 アセチル化は PEPC 活性を阻害するのに必要十分であることを明らかにした。また、サーチェーンホモログである NCgl0616 は、K653 脱アセチル化活性を示した。NCgl0616 による PEPC-K653 脱アセチル化は、グルタミン酸生産に重要な PEPC フラックスの維持に関わることが示唆された。2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（ODH）の制御因子 OdhI は、リン酸化に依存して分子フォールディングが変化し、非リン酸化型 OdhI が ODH の E1 サブユニット（OdhA）に結合して ODH 活性を阻害する。OdhI の 132 番目のリジン残基（K132）のスクシニル化は、OdhA との相互作用を阻害することにより ODH 活性を維持し、グルタミン酸生産に負の効果をもたらすことを明らかにした。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重要な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、アシル化修飾を標的とした代謝改変の可能性が示唆された。

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
kanyamam@hosei.ac.jp

目的：Mn(II) を酸化して Mn(IV) 酸化物を合成する真菌や細菌が報告されている。Actinobacteria 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門を含む様々な細菌が Mn 酸化能をもつことが推測されている。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、Mn

酸化物を合成する *Pseudomonas putida* から逆遺伝学的に Mn 酸化物合成酵素遺伝子を単離同定することを行った。

方法： *P. putida* KT2440 株を、金属を含む M9 グリセロール寒天培地に 30℃ で画線培養し、コロニーの呈色を確認した。また、KT2440 株のシングルコロニーを、金属を含む M9 グリセロール液体培地に 30℃ で終夜培養し、培養液および培養上清の呈色を確認した。 *P. putida* GB-1 株で推定される全 7 種類の Mn 酸化遺伝子のすべてを KT2440 で確認した。KT2440 株の *lapA* (PP_0168), *cumA* (PP_1034), *copA2* (PP_2205), *mopA* (PP_2561), *mcoA* (PP_3184), *mnxG* (PP_3490), *copA1* (PP_5380) のそれぞれの遺伝子上流側 300bp と下流側 300bp を、一方の末端にベクターの挿入領域との相同配列をもつように設計したプライマー対を用い、KT2440 ゲノムを鋳型として PCR で増幅し、精製した。つぎに、ゲンタマイシン耐性遺伝子カセットを、増幅した遺伝子上流領域の一部と相同な配列を一方の末端に、増幅した遺伝子の下流領域の一部と相同な配列を他方の末端にもつように設計したプライマー対を用い、pPS856 プラスミドを鋳型として、PCR で増幅し、精製した。これら 3 つの DNA 断片と *Sal I* と *Pst I* を用いて線状化した pK19mobsacB を混合し、試験管内組換え酵素によって、全てが連結した組換え遺伝子をもつプラスミドを大腸菌 DH5 α への形質転換によって、PP_5380, PP_0168, PP_1034, PP_2205, PP_2561, PP_3490, PP_3184 のそれぞれ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プラスミドを構築した。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プラスミドは、大腸菌 S17-1 λ pir へ導入し、大腸菌形質転換体と KT2440 株と混合し、接合反応後、クロラムフェニコールとゲンタマイシンへの耐性によって、まずシングルクロスオーバー組換えにより目的組換え遺伝子が KT2440 ゲノム上に導入された形質転換体を選抜した。その後、ダブルクロスオーバー組換えにより目的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形質転換体を、スクロース耐性株とした。

結果・考察： *P. putida* KT2440 株は GB-1 株と同様に、

培地中の Mn (II) の存在で呈色するコロニーを形成した。また、銅 (II) と亜鉛 (II) でも呈色コロニーを確認した。これらの呈色した成分は細胞外に分泌されており、培養液の上清に存在することが明らかとなった。KT2440 を親株とした *lapA*, *cumA*, *copA2*, *mopA*, *mcoA*, *mnxG*, *copA1* の欠失株は、親株と比較して、寒天培地上の Mn (II) 添加による呈色コロニー形成に顕著な違いを確認できなかった。また、銅 (II) と亜鉛 (II) 添加による呈色コロニーでも同様に違いを確認できなかった。これらの結果より、KT2440 株の金属酸化能は複数の遺伝的要因で行われることが示唆された。

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
jun.kaneko.b6@tohoku.ac.jp

目的：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は、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サプリメントとしての需要が高まっている。我々は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、アミロイド β 産生に関わる膜酵素である γ セクレターゼの活性を用量依存的に抑制することを発見し、細菌による機能性プラズマローゲン生産の可能性を発想した。本研究では、その基礎となる細菌酵素によるビニルエーテル結合形成の分子機構の解明を目指した。

方法： *S. ruminantium* のゲノム解析情報からビニルエーテル結合形成に関与していると予想したグラム陽性型リン脂質生合成酵素 PlsX, PlsY の遺伝子を大腸菌に導入して様々な条件で培養し、リン脂質画分を調製して DNP 法によりプラズマローゲン生産を確認した。一方、本菌における形質転換系の確立をめざし、ゲノム解析により発見したプラスミドを活用して大腸菌とのシャトルベクターを構築するとともに、 *S. ruminantium* へのエ

レクトロポレーションによる導入条件を検討した。

結果・考察：細胞質酵素である PlsX の遺伝子を pTrc99a 発現ベクターに組み込み、大腸菌 JM109 に導入して PlsX 発現株を得た。一方、膜酵素である PlsY の遺伝子を pTrc99a の発現スイッチ部の下流に繋いで低コピー pMW219 をベースとしたプラスミドを構築し、JM109 での PlsY 発現株を得た。さらに *plsX* と *plsY* を共に導入した株も構築し、これらの発現条件及び培養条件によるプラズマローゲン生産性を検討した。その結果、*plsX* と *plsY* の両方をもつ株を IPTG を終濃度 0.001mM で添加して 37℃ で 12 時間培養後、24 時間静置培養を行った時にプラズマローゲンのスポットが検出された。スポットの MS 分析で C16:1 の脂肪アルデヒドのヒドラゾン誘導体と確認された。一方、TYL (乳酸) 培地で培養液を通常環境で遠心集菌して、コンピテント化処理した *S. ruminantium* 菌体にパルスを当て、嫌気ボックス (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) 内で TYG (グルコース) 寒天培地に塗布することでシングルコロニー形成を確認した。また、*S. ruminantium* TAM6421 株が有する最も小さい plasmid 9 と大腸菌クローニングベクター pMD20 を組み合わせたプラスミドを構築し、*Bacillus subtilis* の形質転換を確認した。現在、これらを用いて *S. ruminantium* の形質転換を試みている。本成果はビニルエーテル結合を導入する酵素の分子機構の解明、ならびに細菌による機能性プラズマローゲンの生産の技術開拓研究の基盤となると期待される。

***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
kawasaki@cck.dendai.ac.jp

目的：*Corynebacterium glutamicum* (コリネ型細菌) は、特定のストレスに応答してグルタミン酸を過剰に生産する。このメカニズムを解析する過程で、我々はグルタミ

ン酸過剰生産誘導性ストレスに応答して転写量が増加する遺伝子を本菌に 7 つ見出している。これらはいずれも短い ORF で機能が未知である。本稿ではこれらを *uk1* (*unknown1*) ~ *uk7* とする。遺伝子破壊株の解析から本研究では *uk2* と *uk3* に注目し、機能解明を目指した。

方法：*uk2* および *uk3* をそれぞれインフレームで破壊した $\Delta uk2$ 株と $\Delta uk3$ 株を構築し、グルコース消費量あたりのグルタミン酸生産量 (本稿ではグルタミン酸生産性とする) を調べた。両遺伝子破壊株の相補株、両遺伝子増幅株のグルタミン酸生産性も調べた。*uk2* に関する解析では、*uk2* のフレームシフト変異型、サイレント変異型発現プラスミドを $\Delta uk2$ 株に導入し、それらの表現型を調べた。また、*uk2* の機能に関連があると考えられた pyruvate dehydrogenase complex (PDHc) と oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHc) の酵素活性について、*uk2* 組換え株の細胞抽出液を用いて NADH アナログである APADH の増加を指標に評価した。*uk3* に関する解析では、His-tag 融合型 UK3 発現プラスミドも用いた。

結果・考察： $\Delta uk2$ 株は、野生型株と比べてグルタミン酸生産性が低下していた。そこで培養液中のアミノ酸および有機酸の分析をしたところ、酢酸が蓄積していた。また、酢酸代謝およびグルタミン酸代謝にそれぞれ関連する PDHc および ODHc の活性が $\Delta uk2$ 株では低下していた。相補株では、グルタミン酸生産性が回復し、酢酸蓄積量は減少した。PDHc および ODHc の酵素活性も回復した。続いてフレームシフト変異型、サイレント変異型 *uk2* 発現株の表現型を調べると、両株ともにグルタミン酸生産性が回復し、酢酸の蓄積は減少していた。これらのことから、*uk2* がコードする機能因子は糖代謝の制御因子であり TCA 回路鍵酵素の活性調節に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く、今後の課題である。一方、*uk3* は 3 回膜貫通型タンパク質をコードしていると予測される。この点を確認するために超遠心分画を調べたところ、膜面分を含む沈殿中に His-tag 融合型 UK3 が検出された。

$\Delta uk3$ 株は、野生株と比べてグルタミン酸生産性が低下していた。相補株では、グルタミン酸生産性が回復していた。増幅株では、グルタミン酸生産性が上昇しており、生育量あたりのグルコース消費量も増加していた。これらのことから、*uk3*がコードする機能因子は膜タンパク質であり、UK3は糖代謝を正に制御する因子であると考えられる。近年のデータベース情報の増加に伴って、UK3は真正細菌に広く分布する普遍的な因子であることが分かってきている。しかし、UK3の機能解析は他に例がないのが現状である。糖代謝制御に関わる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
yuki.doi.doct@gmail.com

目的：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が発現するメカニズムを解明すると共に、それをを用いてバイオディーゼル燃料の製造過程で副生される廃棄グリセロールからL-乳酸を高生産する系の構築を目的とした。

方法：*E. faecalis* W11株の培養はジャーファーメンターを用いて行われた。培養液にはW11株の酸素要求量以上の酸素が供給され、培養液のpHはpHコントローラーを用いて7.5に自動調整された。遺伝子の発現解析は逆転写-PCR法を用いて行われ、培養液中の糖・有機酸・アルコールはバイオセンサBF-7（王子計測）およびF-キット（ロッシュ）を、細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）はNAD/NADH Quantitation Kit（バイオビジョン）を用いて定量された。

結果・考察：グルコースあるいは低濃度のグリセロールを好気代謝しているW11株と比較して、高濃度(>1.0M)のグリセロールを好気代謝しているW11株ではピルビン酸の好気代謝経路であるアセトインおよび酢酸の生産を担う酵素遺伝子の発現がいずれも強く抑制されていた。その細胞内NADH/全NAD比は極めて高い値を示したことから、グリセロール代謝で生じた過剰なNADHによる還元ストレスがそれらの遺伝子発現を抑制したことが示唆された。一方、その還元ストレスは嫌氣的なNADH酸化経路であるアルコール発酵を担う酵素遺伝子の発現を上昇させたが、培地にエタノールの生産は認められなかった。これは、アルコール発酵を担う酵素が酸素に対して非常に脆弱であることから、発現した酵素タンパク質が酸素によって失活したためと考えられる。これらに対して、ピルビン酸からL-乳酸の生産すなわち乳酸発酵を担うL-乳酸脱水素酵素の遺伝子発現と活性はあらゆる培養環境下で認められた。これらの結果から、*E. faecalis*の好気性乳酸発酵は乳酸発酵以外のピルビン酸代謝経路の抑制および機能不全に起因することが示された。

*E. faecalis*のこの代謝を利用することで、1.5Mのグリセロールおよび1.4Mの廃棄グリセロールから120時間以内にそれぞれ約1.4M(126g/L)および1.15M(104g/L)のL-乳酸の発酵生産に成功した。これらの生産量は既報を大きく上回る。しかしながら、生産物(L-乳酸)による代謝阻害などのため、その生産量をさらに向上させることはできなかった。回分培養系においてL-乳酸の生産量をさらに向上させるためには、乳酸(塩)などへの耐性を向上させた変異株を作製・使用する必要があると考えられる。

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
yas@pu-toyama.ac.jp

目的：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。本研究は、その活性本体を明らかにし、その発酵物を食品へ応用することを目的として行われた。

方法：薬草粉末（クミスクチン、沖縄ウコン、春ウコン、ギムネマシルベスタ、キダチアロエ、黒ニンジン、レモングラス、長命草）は、沖縄長生薬草本社より入手した。無調整豆乳はマルサンアイ社製を使用した。乳酸菌は、*Lactobacillus delbrueckii* KM-2株（沖縄・久米島の海草から分離）を用いた。アミラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、チロシナーゼは和光純薬より購入し、比色法による阻害活性試験に用いた。

結果・考察：薬草（3g/L）を加えた豆乳をオートクレーブ滅菌後に、乳酸菌 KM-2 株を接種し発酵したもの（サンプル A）、薬草を加えた豆乳を滅菌せずに乳酸菌を接種し発酵したもの（サンプル B）、豆乳に薬草を加え、滅菌せずに発酵したもの（サンプル C）、豆乳に乳酸菌を加えて発酵したもの（サンプル D、対照区 1）、薬草のみを熱水抽出したもの（サンプル E、対照区 2）、合計 5 サンプルについて、 α -グルコシダーゼに対する阻害活性を比較した。遠心分離により発酵物から固形分を除去し、上清を活性試験に供した。その結果、 α -グルコシダーゼ阻害率は、サンプル A が 5%、B が 85%、C が 45%、D が 12%、E が 8% であった。このとき糖尿病治療薬アカルボースは 1mg/mL で 20% の阻害率を示した。

さらに、上記のサンプル A～E の内容物を HPLC により分析した。D には、イソフラボン配糖体であるゲニスチンとダイジンが主成分として検出されたが、最も活性の強い B には、それら配糖体は検出されず、新たな

疎水性成分が検出された。以上をまとめると、薬草粉末を滅菌せずに豆乳発酵すれば、グルコシダーゼ阻害活性が安定して得られることが確認されたことより、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の関与が強く示唆された。現在は、関与する微生物の同定と、豆乳発酵液中に生産される α -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
shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp

目的：卵菌 *Phytophthora infestans* は、低温に応答して遊走子を放出後、シスト形成、シスト発芽、付着器形成へと至る形態分化を経て宿主植物に感染する。この形態分化を特異的に制御する分子機構を解明することを目指して、本研究では、シスト発芽を特異的に阻害する化合物を同定し、取得した化合物を用いた化学遺伝学により、形態分化を制御する分子機構を解明することを目的とした。

方法：土壌より単離した放線菌の二次代謝産物をターゲットとして、*P. infestans* シスト発芽を特異的に阻害する化合物を探索した。放線菌抽出サンプルから各種クロマトグラフィーにより阻害物質を精製し、取得した化合物を ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル解析により同定した。同定したシスト発芽阻害物質が、*P. infestans* の形態分化に与える影響、および 25℃ の比較的温暖な条件下で生育する *Pythium aphanidermatum* の形態分化に与える影響を定量的に評価した。また、シスト発芽阻害物質存在下で発現量が変動する遺伝子を同定し、その機能を遺伝学的に解析した。

結果・考察：土壌から単離した放線菌を培養して調製した約 700 のアセトン抽出サンプルから、シスト発芽を阻害する活性を有すサンプルの一つを見出した。シスト発芽阻害物質生産菌の 76.4L の培養液から各種カラムクロマトグラフィーによりシスト発芽阻害物質を精製し、2.9mg

の精製標品を得た。各種スペクトル解析により精製したシスト発芽阻害物質をβ-ルプロマイシンと同定した。β-ルプロマイシンは、10℃での*P. infestans*形態分化におけるシスト発芽を特異的に阻害し、シスト発芽を50%阻害するβ-ルプロマイシン濃度(IC₅₀)は37nMであった。*P. infestans*において、β-ルプロマイシン存在下で発現量が変動する遺伝子をRNA-seq解析および定量RT-PCR法を用いて探索した結果、キナーゼ様タンパク質の発現量が劇的に変動していることを見出し、この遺伝子の機能を遺伝学的に解析している段階である。

更に、β-ルプロマイシンは、*P. infestans*の25℃で起きる遊走子嚢からの菌糸伸長を阻害すること、*P. aphanidermatum*のシスト発芽(IC₅₀=226nM)と卵胞子からの菌糸伸長(IC₅₀=60nM)を阻害する事、真菌*Colletotrichum orbiculare*の胞子発芽を阻害(IC₅₀=516nM)する事を明らかにした。β-ルプロマイシンは、ヒトテロメラゼの構成成分(TS-A)に結合し(K_i=0.74μM)、テロメアの伸長を阻害する事が報告されている。一方卵菌においては、β-ルプロマイシンが*P. infestans*の寒天培地上での生育を阻害しなかったこと、*P. infestans*のゲノムデータベース上にヒトのテロメラゼ構成成分と相同性の高い因子が見出されなかったことなどから、今回見出されたβ-ルプロマイシンのシスト発芽阻害活性は、新たな作用機序によるものであると推測された。また、β-ルプロマイシンは、卵菌だけでなく真菌の菌糸伸長も阻害したことから、分類学的に異なる卵菌と真菌において保存された形態分化機構の解明に繋がるものと期待される。

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
ykuboha@juntendo.ac.jp

目的：DIF-1 (differentiation-inducing factor-1) は、細胞性粘菌の一種「キイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*)」の分化誘導因子として単離・同定された

低分子化合物だが、近年我々は、DIF-1とその誘導体が*in vitro*で強力な抗菌活性を有することを発見した。

本研究の目的は、*D. discoideum*由来のDIF-1をリード化合物とした新規抗菌薬の開発とその作用機序解析を進めることにある。とりわけ、既存薬剤耐性菌に対しても有効な抗菌薬の開発を目指すこととした。

方法：*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌：薬剤感受性株)およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA), *Enterococcus faecalis* (腸球菌：薬剤感受性株), バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE), *Escherichia coli* (大腸菌)を用いて、各種DIF誘導体の抗菌活性を検討した：抗菌活性は、発育阻止円観察 (disc-diffusion法)と最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC)によって判定した。

結果・考察：約30種類のDIF誘導体を用いて、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性をdisc-diffusion法で検討した。その結果、多くのDIF誘導体が黄色ブドウ球菌およびMRSAの発育を強力に阻害することが明らかとなった。我々の用いたMRSA株は、ペニシリン以外にもストレプトマイシン、イミペネム、レボフロキサシン、クリンダマイシン等の抗菌薬に対する多剤耐性を示したことから、それら既存薬とDIFの作用機序は少なくとも一部異なると考えられる。

黄色ブドウ球菌、MRSA、腸球菌、VREに対するDIF誘導体のMIC値を検討した結果、いくつかのDIF誘導体がそれら細菌株の発育を強力に阻害することが明らかとなった。それらのDIF誘導体は、我々が調べた全てのグラム陽性細菌の発育を強力に阻害したが、大腸菌(グラム陰性細菌)の発育を阻害しなかった。

DIFの作用機序を解明するため、トランスポゾンを利用して黄色ブドウ球菌遺伝子に変異を入れDIF存在下で生育する菌の単離を試みているが、現段階ではDIF耐性株を得ていない。さらに我々は、透過型電子顕微鏡を用いて、DIF存在下での黄色ブドウ球菌の形態変化を観察した。その結果、DIF誘導体存在下においては、多くの菌細胞内に細胞壁/膜の特異な多層構造が形成されることが判明した。この構造体の形成とDIFの抗菌作

用の因果関係は不明だが、今後、その関連を明らかにすると同時に、DIFをリード化合物とした新規抗菌薬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
ohta9203@gpo.kumamoto-u.ac.jp

目的：我々は、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、その後の本研究助成により、乳酸菌のリプログラミング物質がリボソームであることを発見した。本研究では、リボソームが細胞内に取り込まれる際の分子機構の解明と細胞内におけるリボソームの局在場所の同定を目的とした。

方法：ヒト皮膚細胞（Human Dermal Fibroblast cells, Cell Applications, Inc. Cat No.106-05a）を用いて、細胞外からリボソームを添加して細胞塊を形成させた。9種類のエンドサイトシス阻害剤の存在下で細胞塊形成実験を行い、その効果を比較検討した。エンドサイトシス阻害剤は、filipin, nystatin, genistein, cytochalasin B, bafilomycin A1, concanamycin A, 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride, chlorpromazine, methyl- β -cyclodextrinを用いた。また、我々の細胞塊形成実験では、トリプシン処理が必須であることから、リボソーム取り込みに対するトリプシンの効果を直径50nmの蛍光ビーズを用いて検討した。

大腸菌（*Escherichia coli* JE28）由来のリボソーム（大サブユニットを構成するL12タンパク質にHisタグが付いている）を用いて細胞塊を形成し、抗Hisタグ抗体を用いた免疫染色法を行い、細胞内におけるリボソームの局在を調べた。

結果・考察：8種類のエンドサイトシス阻害剤は細胞塊形成を抑制したが、methyl- β -cyclodextrinの存在下では細胞塊形成が促進された。これらの結果から、リボソームによる細胞塊形成には、エンドサイトシスが関与していることが示唆された。今後は、何故、methyl- β -cyclodextrin

だけが細胞塊形成を促進するのかを解明したい。次に、トリプシン処理直後の細胞へのビーズの取り込みを調べたところ、培養細胞に直接添加した場合と比べ、トリプシン処理直後の細胞は蛍光ビーズを劇的に細胞内に取り込むことが明らかになった。リボソームの直径は20nmであることから、リボソームの細胞内への取り込みは、エンドサイトシスと細胞膜に傷や穴を開けて取り込みを促すトリプシン処理の相乗効果であることが明らかになった。

Hisタグが付いているリボソームを取り込んで形成された細胞塊の凍結切片を作成し、抗Hisタグ抗体を用いて免疫染色法を行ったところ、ドット状のシグナルが細胞質だけでなく核内にも観察された。3次元の解析では、取り込まれたリボソームは核内にも存在していることが示された。リボソームが核膜孔を通して核内に運ばれている可能性が考えられる。

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
yaeno@agr.ehime-u.ac.jp

目的：植物病原糸状菌は宿主植物の細胞壁という物理的障壁を乗り越えなければ感染できない。絶対寄生性の子嚢菌である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分解して侵入し、感染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、細胞壁分解酵素群は非常に高い活性を持つと予想される。しかしながら、全ゲノム配列が解読されたにもかかわらず細胞壁分解酵素遺伝子は見つかっていない。また、細胞壁の貫穿後に宿主の抵抗性反応を抑制する病原性タンパク質についてもほとんどわかっていない。そこで本研究では、細胞壁分解や抵抗性抑制に関わ

るタンパク質を同定することを目的として、付着器発芽管に含まれるタンパク質を網羅的に解析し、候補タンパク質について研究を行った。

方法：分生子をセルロース膜上で発芽させ、付着器を形成したタイミングでオオムギ表皮細胞に移植するとそのまま侵入できることを確認した。したがって、付着器発芽管の内部には、侵入のための細胞壁分解酵素群や抵抗性抑制のための病原性タンパク質がすでに存在することが示唆された。そこで、セルロース膜上で半同調的に分生子が発芽する条件を見出して付着器発芽管を大量に収集し、付着器発芽管が破裂しやすいバッファーに懸濁して遠心分離することにより分生子本体を排除して付着器発芽管に含まれるタンパク質のみを回収した。2010年に解読されていた全ゲノム配列情報が不完全であることが判明したため、新たに全ゲノム配列を解読し、抽出したタンパク質を質量分析に供してゲノム情報を参照して網羅的にタンパク質を同定した。

結果・考察：プロテオーム解析の結果、幾つかのタンパク質が細胞壁分解酵素の候補として新規に見つかった。その中のひとつを APEC5 (appressorial effector candidate 5) と名付け、立体構造モデルを作製して類似するタンパク質を立体構造データベースにて検索したところ、糞生菌の *Podospora anserina* の Gluc131A の触媒ドメインに酷似することが明らかとなった。しかしながら、APEC5には PaGluc131Aが持つような糖質結合モジュール (CBM) が存在しない。そのためまず、APEC5がむしろ病原性タンパク質であるという可能性を調査するため、オオムギ表皮細胞およびシロイヌナズナにおいて APEC5 遺伝子を過剰発現させたところ、宿主の抵抗性を抑制するような機能は持たないことが示唆された。このことから、今後は CBM を持たないがグルカナナーゼとして細胞壁成分を分解する可能性を検証するとともに、APEC5 に PaGluc131A の CBM を結合させた人工型の分解酵素を作製し、高機能化に向けて引き続き研究を行う予定である。

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
arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的：木質バイオマスを原料として生産されるバイオエタノールは、石油や天然ガスに代わる新たなエネルギー源として期待されている。しかし、木質バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンが組み合わさった複雑な構造を持つため分解が困難である。シロアリは高効率で木材を分解・資化することができるが、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。それらは従来の酵素にない優れた性質を持つ可能性があるが、知見に乏しく、その利用には至っていない。そこで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。

方法：EuCBHは麹菌で、またNtSymX11は大腸菌で生産した。AfGEは麹菌と酵母を用いて生産した。いずれのタンパク質もNi²⁺カラムを用いて精製し、その酵素学的性質を解析した。

結果・考察：結晶性セルロースの分解において中心的な役割を果たすセロビオヒドロラーゼの一つであるシロアリ腸内共生原生動物由来のEuCBHの麹菌を用いた生産を試みた。*Aspergillus aculeatus* 由来のβ-グルコシダーゼをコードする *Aabgl1* と共発現させたところ、培養上清への分泌生産が認められた。しかし、キャリアであるα-アミラーゼ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ずに発現したところ、より多量のEuCBHが生産された。これらのサンプルについて活性測定を行ったが、明確な活性を示さず、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。

次にシロアリ腸内共生細菌由来のキシラナーゼ NtSymX11 の生産および機能解析を行った。NtSymX11

は触媒ドメイン以外に糖質結合モジュール CBM36 を 2 個持つ。様々なコンストラクトを作製して大腸菌で生産したところ、キシラン特異的な分解活性が認められた。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 20 倍高い触媒効率を示すこと、CBM36 は酵素の安定性を低下させるが、触媒効率を上昇させることがわかった。

併行して *A. fumigatus* 由来のグルクロン酸エステラーゼ AfGE の生産も行った。AfGE はキシランとリグニン間の結合を切断し、セルラーゼ類の働きを補強する機能を持つと予想される。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。

以上、本研究では 3 種類のバイオマス分解酵素の生産と性状解析を行った。EuCBH については、麹菌での異種タンパク質生産においてキャリアを用いない方が生産量が高い場合があるとの知見が得られた。NtSymX11 と AfGE についてはどちらも既知酵素に比べ高い触媒能を持つことがわかった。今後はこれらの酵素を他の酵素と組み合わせ、バイオマスの高効率分解系を構築することを計画している。

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
uchino-yoshihito@nite.go.jp

目的：これまでの培養実験から、難培養性 *Dehalococcoides* 属細菌の *Sulfurospirillum* 属細菌による増殖促進は、両細菌間での「細胞外電子伝達」による可能性が示唆されているが、詳細は明らかではない。本研究では、培養実験に加えて遺伝子レベルの解析を行うことで、増殖促進メカニズムの解明を行うことを目的とする。

方法：供試菌株として、我々が分離し既に全ゲノムを決定している *Dehalococcoides* 属細菌 UCH007 株及び *Sulfurospirillum* 属細菌 UCH001 株を使用した。まず、

増殖促進因子が生体分子であるかどうか確認するため、①両株を親水性 PVDF 膜で隔てた隔離培養、②滅菌された培養物を添加する培養、③両株で感受性の異なる薬剤を添加する培養により UCH007 株の増殖(脱塩素化反応)が促進されるかの確認を行った。つぎに、増殖促進が起きている時の両株の位置関係を確認するため、混合培養物の SEM 観察(ポリ-L-リジンコーティングディッシュ上に試料を吸着させ前処理を行った)及び FISH 法による観察を行った。さらに、混合培養時に特異的に発現変動する遺伝子を選抜するため、UCH001 株の単独培養物又は両株の混合培養物から抽出した RNA について新型シーケンサーを用いて解析し全ゲノム配列にマッピングする RNA-seq 解析を行った。最後に、カナマイシン耐性カセットを含む遺伝子破壊コンストラクトを作製し、UCH001 株の増殖促進関連遺伝子の破壊法を検討した。結果・考察：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あれば伝達できないものであることが示唆された。また、UCH007 株の細胞のサイズが小さいため FISH 法による顕微鏡観察は困難であったが、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 解析の結果では、混合培養時に、UCH001 株の呼吸や電子の移動を伴う反応に関係するチトクロム類、酸化酵素、還元酵素等をコードする遺伝子の発現量が上昇することが明らかとなった。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、*Dehalococcoides-Sulfurospirillum* 属細菌間で、微生物どうしが接触し、電子を介して起きている可能性が考えられる。

我々は、UCH001 株の遺伝子破壊株の作製を試みたが、残念ながら成功しなかった。促進メカニズムの解明には、遺伝子破壊株は必要であり、今後の課題であると考える。

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
s.katou@aist.go.jp

目的：セシウム（Cs）の放射性同位体は核廃棄物等に由来する放射能汚染の主要な原因物質である。生物を使ったCs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。実際にある種の植物や微生物にCs取り込み・蓄積能が確認されているが、これらの生物は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。そのためKがCsよりも多い環境ではCsの取り込みは格段に低下してしまう。大腸菌は3種のK輸送系（Kup, Kdp, Trk）を持ち、そのうちKupにのみ非特異的なCs輸送活性が確認されている。しかしKupのCs輸送活性・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目的とした。

方法：校正機能を持たないrTaqポリメラーゼを使用したエラープロンPCR法により、大腸菌*kup*遺伝子にランダム変異を導入した。増幅断片をpBadGiiiAのアラビノース誘導プロモーター下流に組み込み、大腸菌*kup*欠損株に形質転換した。異なる変異型Kupを発現する大腸菌株を約3万株回収し、変異株ライブラリを作製した。大腸菌野生型株およびKup誘導発現株を異なるK、Cs濃度条件下で培養し生育を測定することで、Cs取り込み能が向上した変異株のポジティブスクリーニング条件を検討した。変異型Kupライブラリをスクリーニング条件で計20回継代培養し、集積された株から計100株の候補株を得た。候補株をスクリーニング条件で培養し、野生型Kup誘導発現株より生育が有意に向上した株を選別し、アミノ酸変異箇所の同定、Cs取り込み活性の測定に供した。大腸菌の細胞内Cs濃度は、菌体を

塩酸性条件下で煮沸し、得られた上清を原子吸光光度計で測定することで定量した。

結果・考察：細胞内へのCsの取り込みがK欠乏条件において大腸菌の生育を促進するという知見に基づき、K欠乏（10 μ M）・Cs存在下（100 μ M）でCs取り込み能が高い大腸菌株を集積可能なポジティブスクリーニング系を構築した。約3万株の異なる変異型Kupを発現する大腸菌株ライブラリをスクリーニング系で集積し、最終的にK欠乏・Cs存在下で有意に増殖が改善するC1株、C2株を得ることができた。このうちC1株はKCl 10 μ M、CsCl 10 μ M添加条件下、大腸菌野生型株と比較して最大で46倍のCs取り込み活性を示した。導入された変異型*kup*の塩基配列解析の結果、C1にはE80G、C2にはD283、T374AおよびT512Aのアミノ酸置換が確認された。2菌株共に酸性アミノ酸に変異が入っていることから、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
akameya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的：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、高効率なD-乳酸生産系の構築を目的に、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特異な好熱菌を見出し、その代謝系の解明を行った。

方法：D-乳酸蓄積能を示した微生物サンプルから菌の単離を行い、16S rRNAおよび遺伝子間領域配列解析から菌の同定を行った。菌株保存機関から取り寄せた類縁菌を本研究で用いた条件で培養し、各株のD-乳酸生成能および生育能を比較した。また、D-乳酸生成代謝を同定するため、単離株のゲノム解析および酵素活性測定を行った。

結果・考察：各種培養により、D-乳酸を選択的に蓄積する好熱性微生物を単離に成功した。16S rRNAおよび遺伝子間領域配列解析から、本単離株は*Geobacillus*属に属する菌と推定された。グリセロールからD-乳酸を選択的に生成する本単離株のような性質は、これまで*Geobacillus*属細菌において報告されていない。菌株保存機関から取り寄せた類縁菌7株（*G. stearothermophilus*から2株、*G. kaustophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermodenitrificans*, *G. thermoglucosidasius*, *G. thermoavorans*から1株ずつ）を同条件で培養した際には、単離株のような旺盛な生育やD-乳酸蓄積は見られなかった。単離菌のグリセロール依存的な生育およびD-乳酸生成能は、*Geobacillus*属類縁菌の中でも特異な性質であることが示唆された。また興味深いことに、60℃では単離菌もグリセロール添加無機培地での生育が阻害され、本菌のグリセロール資化に70℃という高温環境が寄与している可能性も示唆された。乳酸菌などのD-乳酸生成菌は解糖系を生合成経路とするのに対し、本菌はメチルグリオキサールを経た経路でグリセロールからD-乳酸を生成することがゲノム解析および生化学的解析から示唆された。こうした代謝は毒性の高いメチルグリオキサールの解毒経路として知られているが、野生型生物での炭素資化に寄与していることを示した例は知られていない。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
dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

目的：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立てにより処理されているため、温室効果ガス増加等の環境負荷が懸念されている。そこで、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が望まれている。本研究では、*Nocardia* sp. NBRC 15532株のゴム分解能を用いたゴム廃棄物からの有価物変換系の構築を目指して、ゴム分解機構の全容を明らかにすることを目的とした。

方法：*Nocardia* sp. NBRC 15532株のゴム代謝時に誘導される遺伝子の特定にはマイクロアレイ解析を用い、誘導条件下で2倍以上の転写量の増大が認められる遺伝子を候補とした。遺伝子破壊には、CRISPR-Cas9を含むpCRISPOmyces-2ベクターを使用した。遺伝子破壊株のゴム分解能は、反応時間毎の基質（ポリイソプレン）の分子量をゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）分析により測定することで評価した。*lcp*遺伝子産物（Lcp）を得るために、ヒスチジンタグを付加した*lcp*を*Escherichia coli*（大腸菌）BL21（DE3）株で発現させた。ヒスチジン融合Lcp（Lcp-His）の精製にはNi-アフィニティカラムを用いた。ゴム分解産物（イソプレンオリゴマー）の特定にはHPLC-MS分析を用いた。

結果・考察：ゴム分解に関わる遺伝子を同定するために、マイクロアレイ解析を行なった結果、ゴム代謝時に特異的に発現上昇する121の遺伝子が限定された。その中には、推定の細胞外オキシゲナーゼ遺伝子（*lcp*）やイソプレンオリゴマー分解に関わると考えられる7つのアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）遺伝子、低分子化されたイソプレンの代謝に関わると考えられるβ酸化系遺伝子群が含まれていた。ゴム分解に真に関わる遺伝子を明

らかにするために、CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集技術により *lcp* の内部領域を欠失させた *lcp* 欠失株を得た。*lcp* 欠失株のゴム分解能を評価するために、野生型株と欠失株の培養菌体とポリイソプレンを37℃で反応させた。その結果、野生型株は反応20日でポリイソプレンを分解したのに対して、欠失株はその分解能を完全に失っていた。以上の結果から、*lcp* が本株のゴム分解に必須であることが示された。

Lcpによるゴムの分解で生じるイソプレンオリゴマーを特定するために、精製Lcp-Hisとポリイソプレンの反応産物をHPLC-MSで分析した。その結果、反応産物には3~9量体に相当する分子量のイソプレンオリゴマーが含まれていることが示された。今後は、特定の分子量のイソプレンオリゴマーを生産することを目指して、トランスクリプトーム解析で特定したALDH遺伝子や β 酸化系遺伝子の破壊を行う予定である。

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
ttajima@hiroshima-u.ac.jp

目的：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。そこで本研究では効率的な物質変換触媒のモデルとしてグリセロールを基質とした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行った。また、宿主である低温菌は、一般に増殖が遅く、菌体収量が低いことが課題である。そこで、その問題点を解決するために、培養時間の短縮と菌体収量の向上を目的として新規低温菌の単離と培養条件の検討を行った。

方法：物質変換触媒の構築については、グリセロールを

1,3-プロパンジオールに変換する反応系を *Klebsiella pneumoniae* 由来の1,3-プロパンジオール生成酵素 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低温性 *Shewanella* 属細菌に発現させ、熱処理を行うことでシンプル酵素触媒を調製した。低温菌の探索には北海道東沖にて北海道大学調査船おしよ丸によるハイドレート調査（北見工業大学）に同行し、海底泥水を採取した。これをマリンプロス (Difco) にて反復回分培養を3週間継続し、その後形成されたコロニーを18℃と37℃で培養した。18℃でのみ生育したコロニーを低温菌として、16S rRNA 配列解析および培養試験を行った。

結果・考察：構築した低温菌株を45℃で熱処理してシンプル酵素触媒を調製し、グリセロールを基質とした変換反応を行った。DhaBとDhaTを発現させた株では補酵素の添加量増加に伴い1,3-プロパンジオールの生成量が増加した。また、さらにギ酸デヒドロゲナーゼを発現させた株では、NADHを添加することなく高収率(98.5%)での変換が可能であった。以上より低温菌を用いたシンプル酵素触媒が有用物質生産に適用可能であることが示された。次に低温菌の培養条件を検討したところ、通気やスレオニンの添加により *Shewanella* 属細菌において菌体収量を8倍に向上させることができた。また、北海道東沖にて取得した海底泥を接種した反復回分培養液より低温菌を単離した。それらは16S rRNA 解析により、*Pseudoalteromonas* 属、*Vibrio* 属であった。そのうち、*Pseudoalteromonas* sp. AK17株は比増殖速度が最も高く($\mu=0.80\text{h}^{-1}$)、*Shewanella* 属細菌の約2倍であった。以上より酵素触媒の宿主の候補となる新たな低温菌を単離することに成功した。今後、変換酵素発現のための遺伝子導入について検討を進めていきたい。

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
emasai@vos.nagaokaut.ac.jp

目的：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。方法：遺伝子破壊は相同組換えにより行い、遺伝子発現は*Sphingobium japonicum* UT26S株を宿主に用いて行った。プロトカテック酸 (PCA) とバニリン酸 (VA) の取り込み能測定には¹⁴C 標識化合物を用いた。5,5'-デヒドロジバニリン酸 (DDVA) の取り込み能は、DDVA 存在下で特異的に転写が誘導される転写制御系を利用したプロモーター解析ベクターを作製して評価した。*ddvK* を付加した本ベクターを導入した UT26S 株の DDVA 培養時におけるプロモーター活性をレポーター遺伝子の発現量で評価した。PCA と DDVA からのポリマー原料化合物 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) の生産能評価は、SYK-6 株の PDC ヒドロラーゼ遺伝子破壊株に *pcaK* 又は *ddvK* を導入した株を用いて行った。化合物の分析には高速液体クロマトグラフィーを用いた。

結果・考察：SYK-6 株の PCA, VA, DDVA の取り込みにプロトン駆動力が必要であることから、major facilitator superfamily (MFS) の関与を予想した。SYK-6 株の 67 遺伝子を破壊し、生育能を調査した結果、SLG_12880 (*pcaK*) 破壊株の PCA での生育能の低下が観察された。また、*pcaK* 破壊株の PCA 取り込み能は顕著に低下し、若干の VA 取り込み能の低下が見られた。さらに *pcaK* 発現 UT26S 株が両基質の取り込み能を獲得したことから、*PcaK* は SYK-6 株において PCA の主要な取り込みと、VA の部分的な取り込みを担うことが示唆された。PCA から PDC への変換において、*pcaK* の導入は PCA 変換

能と PDC 生産能を向上させることが示された。

pcaK を含む 8 個の MFS に属する芳香族酸/H⁺ シンポーター (AAHS) ファミリー遺伝子の多重破壊株を作製して VA 取り込み能を評価するとともに、各遺伝子を UT26S 株で発現させて VA 取り込み能を調べた。その結果、SYK-6 株の VA 取り込みに *pcaK* を含む複数の AAHS 遺伝子が関与することが示唆された。

SLG_07710 (*ddvK*) 破壊株は DDVA での生育能を欠損し、*ddvK* 発現 UT26S 株は DDVA 取り込み能を獲得したことから、*DdvK* は DDVA トランスポーターであることが明らかとなった。アミノ酸配列相同性から、*DdvK* は MFS に属する新規トランスポーターであることが示された。DDVA から PDC への変換実験から、トランスポーター遺伝子の発現強化が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
hatada@sit.ac.jp

目的：リグニンは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期待されている。リグニンは数種の芳香族モノマーが重合した物質であり、リグニン内主要結合である β -O-4 結合を特異的に切断する酵素の開発はリグニン有効利用への鍵となる。これまでに我々は、 β -O-4 結合を選択的に還元開裂する海洋性 *Novosphingobium* 属細菌 (*Sphingomonadaceae* 科) を深海沈木より発見し、本細菌が有する 5 つの酵素から成るカスケード反応を利用し C6-C3 構造を骨格とする芳香族モノマーの One-Pot 生産に成功した。本課題では、同様の機能を有する、より優れた酵素の獲得を目指して、リグニンの特異的変換能を有する微生物種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。併せて、既に保有している酵

素の改良指針を得ることも試みた。

方法：微生物の環境依存的な分布に着目し、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、目的とする微生物の分離条件を検討した。まず、環境 RNA (16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域) に基づく微生物菌叢データより、各環境における存在密度を数値化する[データ処理]、次に、算出値と塩基配列 (4-mer unit でクラスタリング) の重相関解析を行う[数理計算]、そして、相関の見出せた環境サンプル (海洋堆積物、海水) を抽出、さらに多次元尺度法にて近傍プロットに配置されたサンプルを絞り込み、対応する[実環境データ抽出]、さらに、それらを因子分析等の因子抽出法により成分分解し[多変量解析]、最後に、導出された成分を基に培地を構築し、環境微生物の単離を試行[検証試験]の5ステップで実施した。得られた情報に基づき、対象とする微生物群の生育に好適な条件を設定し、海底下コアサンプルから新規微生物の単離を試みた。

結果・考察： α -proteobacteria を解析対象とした多次元尺度法解析の結果、リグニン特異的変換に関連する酵素遺伝子と相同性の高い構造遺伝子を有する *Sphingomonadaceae* 科既知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-}) を設定した。これらの塩類組成を基に固体培地を作成し、海底下コアサンプルから新規と考えられる微生物を単離した。現在これらの株の詳細な系統学的分析を進めている。

short chain dehydrogenase-reductase (SDR) は多様なアルコールの酸化/還元を触媒する巨大な酵素スーパーファミリーであるが、その構造と機能の相関はまだ未解明な部分が多い。前述の反応カスケードの第一段階を担う SDR (SDR3) について構造予測プログラムによりモデルを構築したところ、Rossmann-fold モチーフを持つ予測構造モデルが得られ、補酵素および基質結合部位が推定できた。今後、 β -O-4 結合の特異的開裂酵素に関わる酵素群の更に詳細な速度論的解析や構造解析精密化から得られる知見と新規単離株から得られる新規酵素の知見

を統合することにより、より実用的なりグニンバイオ変換技術の開発が期待される。

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
horiuchi@kit.ac.jp

目的：地球温暖化の抑制や循環型社会構築の観点から、リグノセルロース系バイオマス等の再生可能資源を原料としたバイオプロセスによる有用物質生産の研究が活発化している。リグノセルロース系バイオマス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。

方法：5株の *X. dendrorhous* (JCM 9680~JCM 9684, JCM 19184) を用いて、グルコース及びキシロースを炭素源とする合成培地を用い pH5.0、通気量 1vvm、温度 22°C、攪拌速度 500~700rpm に制御したジャーフェーマンター培養により培養特性を比較した。次に、バイオマス原料として、食糧供給と競合せず世界的規模で生産量が多く、セルロース・ヘミセルロース含有率が高いトウモロコシの芯 (コーンコブ) を用いることとし、酸加水分解及び酵素糖化により 100g/L のコーンコブからキシロース約 25g/L、グルコース約 28g/L 含有するコーンコブ加水分解液を得て培養実験に供した。

結果・考察：*X. dendrorhous* の各菌株を用いてグルコース・キシロースをそれぞれ 25g/L 含有する合成培地により回分培養を行ったところ、いずれの菌株でもキシロース・グルコースを炭素源として速やかに資化することが明らかになった。一方アスタキサンチン及びキシリ

トールの生産特性は菌株により大きく異なったが、最大でアスタキサンチン約9mg/L、キシリトール約16g/Lが生産された。その内アスタキサンチン及びキシリトール両方の生産が認められたJCM 9680及びJCM 9683を用いて合成培地による回分培養を行ったところ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明らかになった。次に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て同様の回分培養を行ったところ、合成培地を用いた場合に比べ菌体増殖が促進され3-4mg/Lのアスタキサンチン生産が可能なが明らかとなった。一方キシリトールは一時的に生産されたもののその後資化され消失した。その原因を明らかにするためバイオマス加水分解液の成分を検討したところ、加水分解液に含有されるコーンコブ由来の高濃度ミネラル成分がキシロース代謝を促進していると考えられた。更に温度条件を検討したところ、比較的低温（22℃）でキシリトール生産が促進され、一方高温条件下（28℃）でキシリトール代謝が抑制される現象が見いだされたことから、温度シフトを行う回分培養を検討し、アスタキサンチン生産を大幅に向上させたが、キシリトールの分解抑制まだ不十分であった。今後更に培養工学的検討を進め、バイオマス原料を用いたアスタキサンチン・キシリトールの同時生産プロセスの開発を進める予定である。

平成 27 年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：平成 27 年 4 月～平成 30 年 3 月

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
enjuero@pu-toyama.ac.jp

目的： *Salinispora* 属などいくつか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。このことから、多種多様な二次代謝産物を生産する放線菌の場合、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、次の2点を仮定した。まず、二次代謝遺伝子による分類が可能である。次に、新奇性の高い化合物の生産菌は新規分類群である。以上の仮定を検証するため、本研究では新規骨格化合物を放線菌より探索し、生産菌の同定および二次代謝遺伝子の解析を計画した。

方法：放線菌の分離源には、海洋島として高度に隔離され、植物をはじめ多くの固有種を有する小笠原諸島を選定した。特異的な環境2点から分離した194株を3種類の培地で培養し、ブタノール抽出物に含まれる化合物は、UVスペクトルを指標とした物理化学的スクリーニングにより、新規性の判定を行った。

結果・考察：判定の結果、7株に新規と推定される化合物の生産が確認されたため、これらを各種クロマトグラフィーによって単離・精製し、MS・NMRによる構造解析を行った。解析の結果、7株が生産する化合物は、いずれも陸上放線菌の生産物として報告されている化合物、もしくはその類縁体であると決定・推定された。本探索によって得られた新規化合物の生産候補株は全体の約3.7%と低いことや、既知化合物を生産している可能性が高いことから、当初計画していた「新規骨格化合物生産菌の取得および二次代謝遺伝子の解析」を遂行することは困難であると判断し、本計画を中止した。

次に遺伝子配列データベースを用いて、二次代謝遺伝子を指標とした分類の可能性を検証するため、放線菌に特異的な化合物の二次代謝遺伝子が16S rRNAに基づいた系統樹においてどのように分布しているのかをNBRC

の小牧博士らと解析した。これまでに、当研究室で *Streptomyces* 属放線菌から発見したヒアルロマイシン(ルプロマイシン + C₅N ユニット)、キナマイシン、ラキサイジン、アルキベマイシン、プチロラクトールの4化合物についての分布傾向を得た。ルプロマイシン、C₅N ユニット、キナマイシン、ラキサイジンの生合成遺伝子クラスターはそれぞれ3科5属、2科3属、3科5属、3科5属の放線菌に分布しているのに対し、アルキベマイシンは *Streptomyces* 属の小さなクラスターにのみ存在しており、ヒアルロマイシンやプチロラクトールは存在しないことが判明した。これらの結果は二次代謝遺伝子の分布に系統樹とは異なる傾向があることを示唆しており、二次代謝遺伝子による分類の可能性を支持するものである。

発酵研究所助成研究報告 第32号【非売品】

平成30年12月10日 印刷

平成30年12月20日 発行

編集委員長 横田 明
編集委員 金子嘉信, 左子芳彦, 永井和夫
西山 真, 福田雅夫

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
大阪市福島区吉野1丁目2番7号

