

NUMBER 34

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH
COMMUNICATIONS**

2020

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 34



2 0 2 0

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 清水 昌 富田 房男 原島 俊	左子 芳彦 鈴木 健一郎 永井 和夫 古川 謙介	
監事	下元 高文	藤井 智幸	
評議員	大島 敏久 笹川 千尋 関 達治 谷 吉樹 藤田 正憲	北本 勝ひこ 下田 親 武田 直久 土屋 英子 吉田 敏臣	

目 次

巻頭言	富田 房男	1
-----	-------	---

■ 2018年度大型研究助成

絶滅危惧樹木の保全に不可欠な菌根菌の系統分類と 菌株コレクションの構築	奈良 一秀	3
糸状菌の細胞接着制御による有用物質高生産を目指した 新規高密度培養技術の開発	阿部 敬悦	17
糸状菌における多糖資化の優先順位決定に関わる シグナル伝達・遺伝子発現制御機構の解明	小林 哲夫	41
バイオ合成による環境適合型半導体製造技術基盤の構築： 細菌による多様なカルコゲン代謝機構の解明と合理的活用法の検討	池 道彦	57

■ 2014年度寄付講座助成

微生物二次代謝産物の物理化学的性質に着目した physicochemical screening による新規物質の発掘とその実用化研究	中島 琢自	67
質量分析による新規物質の探索	松尾 洋孝, 中島 琢自	75
質量分析および主成分分析を利用した 探索系による含窒素物質の探索	松尾 洋孝, 中島 琢自	93
モリブデン酸化および質量分析を組み合わせた 含硫黄物質探索系の構築と新規含硫黄物質の取得	松尾 洋孝, 中島 琢自	101
エルゴステロール修飾シリカ (ES シリカ) を用いた 新規物質の探索	松尾 洋孝, 中島 琢自	111
PC screening を活用した放線菌ゲノムからの 新規物質探索および生合成研究	稲橋 佑起, 中島 琢自	121

■ 2018年度 一般研究助成

緑藻クロレラの細胞内共生による繊毛虫の進化と 多様性のメカニズムの解明……………	児玉 有紀	129
かつお節かび付け工程で働く好乾性糸状菌の分類と 菌叢解析に関する研究……………	竹中 慎治	129
日本産海岸生地衣類の種多様性解明と同定ツールの開発および分類……………	原田 浩	130
熱帯アジアで猛威を振るうぶどうサビ病菌の生態学的・分類学的研究……………	小野 義隆	131
木材腐朽菌の進化仮説を実験室内で実証する……………	中沢 威人	132
難分解性物質を利用する昆虫における共生酵母とその機能……………	土岐和多瑠	132
放線菌門に属さない放線菌様系統「クテドノバクテリア」の 選択的培養法の確立と分離及び創薬微生物資源としての有効性の検証……………	矢部 修平	133
シロアリ腸内原生物に細胞共生する <i>Desulfovibrio</i> 属細菌の共生進化……………	桑原 宏和	134
市民科学者とアカデミアの協働体制の構築と博物館が所蔵する 学術的レガシーの活用による未記載・未解明大型担子菌類探求の推進……………	佐久間大輔	135
アーキア界に広がるメチル化合物利用性メタン生成アーキアの分離と その進化・生態……………	春田 伸	135
酵母の接合型遺伝子のグローバルな機能とホモリズムとの相互作用……………	前川 裕美	136
アーキア膜脂質によるバクテリア膜脂質の置換に基づく大腸菌の 細胞膜エンジニアリング……………	邊見 久	137
空気と電気から含窒素有機化合物を製造する革新的発酵プロセスの 創出に向けた基盤研究……………	高妻 篤史	138
微生物が備える可逆的ゲノム改編による環境適応メカニズムの解明……………	田中 誠司	138
変動環境下における葉面細菌のストレス対処と増殖に関する研究……………	井口 博之	139
人工ゲノム再編系による酵母発酵性能の改良……………	太田 邦史	140
グリシン誘導性 small RNA GcvB によるサルモネラ増殖抑制機構の解析……………	宮腰 昌利	141
ゲノムマイニングおよび培養試験から存在が見いだされた 新規な亜硝酸還元酵素の正体と機能をつきとめる……………	押木 守	141
tRNA 依存型ペプチド合成酵素の tRNA 基質認識機構の解明と 新規ペプチド系抗生物質の創製……………	丸山千登勢	142
分裂酵母における細胞壁ホメオスタシスの化学遺伝学的解析……………	西村 慎一	143

自然界からは未発見の有用アミノ酸脱水素酵素の酵素工学的創製……………	櫻庭 春彦	143
大腸からの粘液分泌を活性化する菌株の同定とその作用機序の解明 ～腸内フローラの変動から推察される微生物叢への着目～……………	東村 泰希	144
ミコール酸含有細菌の接触刺激による放線菌二次代謝応答機構の 変異ゲノム解析を用いた解明……………	浅水 俊平	145
脂質代謝異常に対する新たな防御応答機構の解明と 有用スフィンゴ脂質生産の基盤構築への応用……………	谷 元洋	146
光による大腸菌組換えタンパク質大量発現系の開発……………	華岡 光正	146
酸素耐性ビフィズス菌が有する抗酸化機構の解明……………	山本 裕司	147
海洋性紅色光合成細菌によるバイオポリエステル生産システムの開発……………	樋口美栄子	148
鉄腐食性メタン生成菌固定化電極を用いた 省エネルギー型二酸化炭素変換技術の開発……………	若井 暁	149
リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産に向けた 環境汚染物質分解細菌の利用……………	渡邊 崇人	149
埋立地浸出水処理槽において低濃度・低負荷条件で 1,4-ジオキサン分解を担う微生物群集機能の解明……………	宮田 直幸	150
カニ殻堆肥由来の放線菌 <i>Cellulosimicrobium</i> sp. NTK2 の遺伝資源と 特性を利用した次世代バイオマス“キチン”からの有用物質生産……………	有馬 二郎	151
光駆動ATP再生ミトコンドリアを用いた光エネルギー利用型酵母の 創製とバイオファインケミカル生産への応用……………	原 清敬	152
1細胞解析による遺伝子発現ノイズ制御機構の網羅的解明……………	宮崎 亮	152
微生物により生成される高蓄電ミネラルの生成機構解明……………	二又 裕之	153
芳香族化合物を特異的に吸着する微生物を用いた 活性汚泥の機能向上に関する研究……………	森 一博	154
軽油相当の炭化水素を大量生産可能なシアノバクテリアの創出……………	新井 宗仁	155

■ 2017年度若手研究者助成

結晶性酸化鉄を還元する新規な微生物の分離培養と 代謝メカニズムの解明……………	青柳 智	157
--	------	-----

巻 頭 言

富 田 房 男*

昨年（2019年）中国武漢市で発生した新型コロナウイルスのパンデミックのためこれまでに経験のない年になってしまった。様々の専門分野である微生物を取り扱うのを本職とする学会も例年のように開催できず全く予想外の年である。本財団も3月に理事会を開催したが、その後の会はネットでしか開催できなかった。ネットでの開催は、初めてのことであり、なかなかうまくできなかったと反省しきりである。

開催できなかった国際学会もある。私の関係するものではタイ・バンコックでのAFSLAB（アジア乳酸菌学会連合）が中止になったことと韓国・大田市でのIUMS（国際微生物会連合）がネットとを主体とする開催になったことが残念なことである。

さて我々が扱う領域は、微生物で細菌、カビ、酵母が主体であり、古細菌、原核生物、真核生物など全生物をカバーするものである。これにウイルスも入るので生物全体の対象とする広大なものと理解している。先に述べたIUMSが、カバーしているのも同じである。

私の研究分野は、原核生物が主体で少しの真核生物分野もあった。またファージも研究したので先の述べた領域にすべて関わりがあると言わせていただくことをお許しいただきたい。私は、幸いにも微生物に対する注目が集まっている時代を過ごしてきた。微生物工業の盛んなときであり、微生物の研究開発おける基礎から応用まですべてに注目が集まっていた。ノーベル賞受賞の大村智先生のエバーメクチンの発見もこの時代（1979年）にあった。

また、このところ遺伝子組換え作物の故か、遺伝子組換え作物・食品などに対する科学的根拠のない反対がある。遺伝子組換えで微生物の発酵生産の改良やインスリンの生産を酵母で行うなど素晴らしい成果があり、一般に歓迎されていた良い時代を過ごしてきたと感謝している。

これを書いているときに「ゲノム編集」にノーベル化学賞授賞の報道が入ってきた。ゲノム編集は、ご承知のように微生物での研究がきっかけであり、その貢献は極めて大きい。これが植物、動物、ヒトにまで展開されていることは喜ばしいことである。私の考えでは、上に述べた遺伝子組換えに起こったような反対運動が起こらないように願っている。遺伝子組換えよりもより正確に遺伝子改変を行えることに期待している。

さて、わが国の昨今の微生物分野の活動を見るにそれほどの活況を呈していないように見える。例えばアミノ酸の発酵生産は、国内ではほとんど行われておらず、原体を持ち込み、精製と製品化しか行われていない。また抗生物質を含む生理活性物質の探索研究もあまり目に

*富田房男
北海道大学名誉教授・公益財団法人発酵研究所(IFO) 理事

しない。ただし、新聞情報では、微生物を使った発電、コンクリートの劣化修復、地盤固めや夢に近いが津波の高さを抑えるなどユニークな報告がある。

また、チャレンジ精神のあらわれの一つとして最近の報告 (Nature Plants Sep.14, 2020) を注目したい。ここでは、ルビスコ (炭素固定化の第一段階を触媒する酵素) 遺伝子を大腸菌に導入して、光合成効率を向上させるための戦略的作物の収量向上の聖域である光合成のスピードアップを研究するための最適な実験環境を構築したことが報告されている。

私の望んでいるところは、当財団理事長のお考え、『国がやらない、やれないような特色ある研究助成にしたいと思っております。例えば、微生物の研究にとって重要であるが、地味で目立たず、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「微生物の分類に関する研究」および真理の探究を目指した「微生物の基礎研究」に重点的に助成金を支給しております。研究助成の対象としては、独創的、チャレンジングで夢のある研究の応募を歓迎します。』と同じである。

我々が手にしている微生物は、想定されている存在種の 0.01% 以下とも言われており、圧倒的にわからないものが多いということを再認識したいものである。微生物との共生、腸内菌叢、極限微生物などなど興味津々のところが多い。

私は、微生物の研究には、チャレンジ精神プラス根気が科学的発想豊かさと同等に手法の研究・開発が大事だと思っている。生理活性物質の探索には特にこれらのことが大事と思っている。斬新な手法で新規微生物発見と活用にチャレンジしてほしいと願っています。わが国は天然資源に恵まれていないが微生物資源、そしてこの分野の人材に恵まれていると信じている。また、我が国の今ある微生物資源も相当なもので、この活用も肝要である。微生物資源の保存は、我が国の国家事業である。これらに立脚した「科学・技術立国」こそ我が国の特色と考えている。

皆様のチャレンジを期待するものです。どうか研究課題「微生物の分類に関する研究」と「微生物の基礎研究」への応募を多く寄せていただきたいものです。

2018年度大型研究助成の研究報告

助成期間：2018年4月～2020年3月

絶滅危惧樹木の保全に不可欠な菌根菌の 系統分類と菌株コレクションの構築

奈良 一 秀

東京大学大学院新領域創成科学研究科

〒277-8563 柏市柏の葉5-1-5

Inferring phylogeny and isolating culture strains of the key ectomycorrhizal fungi to the conservation of endangered host trees

Kazuhide Nara

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa city, Chiba 277-8563

Many tree species depend on ectomycorrhizal (ECM) fungi, root colonizing symbiotic microbes, for soil nutrients and thus for growth and survival, although ECM associations of endangered tree species remained unknown. In previous studies, we discovered new ECM fungal species, *Rhizopogon togasawarius* and *Rhizopogon yakushimensis* that specifically colonize endangered trees *Pseudotsuga japonica* and *Pinus amamiana*, respectively. Both fungi are the most dominant species in soil spore banks within the remaining forest patches and would play key roles in seedling establishment and forest regeneration after disturbance. To assess the conservation values of these important and potentially endangered ECM fungi, we need to know more about their evolutionary and biogeographic backgrounds, but it is often challenging to estimate divergent time of fungi due to the scarcity of fungal fossils necessary for time calibration. In place of the fungal fossils, here we applied the robust divergent time of the host *Pseudotsuga* lineages to fungal phylogeny. Phylogenetic trees of *R. togasawarius* with closely related species found two monophyletic groups, representing Asian and North American species groups, as exactly the same as the host phylogeny. Given the divergence between the two groups happened 32 million years ago as evidenced in the host lineages, the nucleotide substitution rate of fungal ITS regions was estimated to be 0.52 ± 0.11 (substitutions per site per 10^9 years), which was very close to the rate of the host, i.e. 0.56 ± 0.07 . This correspondence indicates that the hosts and ECM fungi should have similar generation time, and indeed both are pioneer species that regenerate after disturbance. Using the derived substitution rates, we estimated that *R. togasawarius* diverged from Chinese and Taiwanese relatives around 17.5 and 14.5 millions years ago, respectively. When the same substitution rate was applied to the phylogeny of *R. yakushimensis* and their relatives, *R. yakushimensis* was estimated to have diverged from their relatives in Southern China or Japan around 16.2 millions years ago. The estimated divergence of *R. togasawarius* and *R. yakushimensis* coincided with the initial formation of Japan archipelago, indicating that they originated from allopatric speciation associated with the geological event. These findings may have profound implications to ECM fungal evolution, providing time scales for ITS phylogeny and clear evidence of biogeographic effects on fungal evolution.

Given both *R. togasawarius* and *R. yakushimensis* have the same distribution ranges as their specific hosts, it is highly likely that these fungal species deserve endangered status. So far, very few fungal species are included in IUCN Redlist due to the difficulty in the assessment. Here, we successfully isolated 21 and 11 strains of *R. togasawarius* and *R. yakushimensis* from soil spore banks collected from the entire distribution ranges. Four representative strains were deposited to NBRC culture collections for *in vitro* conservation of the fungi and future application to the endangered hosts. While microbial culture collections have not yet been utilized for ECM fungal conservation, they may play important roles in future. We also tried to maintain fungal strains in association with host seedlings in a greenhouse. ECM seedlings colonized by *R. yakushimensis* were successfully maintained for two years without any airborne contamination, showing far better growth compared to nonmycorrhizal seedlings. While long-term sub-culturing of ECM strains often results in the loss of mycorrhiza formation abilities, we can avoid the trouble by maintaining the strains under the ECM symbiosis.

Key words: ectomycorrhizal fungi, endangered tree species, soil spore bank, molecular clock, evolutionary rates

E-mail: nara@k.u-tokyo.ac.jp

共同研究者：村田政穂（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

阿部寛史（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

杉山賢子（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

大嶋健資（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

緒 言

外生菌根菌（以下、菌根菌）はマツ科やブナ科などの樹木細根に共生する真菌類であり、担子菌と子嚢菌の多様な系統群が含まれる（Smith & Read, 2008）。菌根菌は樹木の光合成産物を受け取ることで生きており、土壤中に菌糸を広げて子実体を発生させるためにも樹木との共生は不可欠である（Lamhamedi *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2001）。一方、菌根菌は土壤中の菌糸で効率的に吸収した窒素やリンなどの養分を植物に供給している（Hobbie & Högberg, 2012; Köhler *et al.*, 2018）。事実上、宿主樹木の成長に必要な養分のほとんどは菌根菌から供給されているため、宿主樹木が成長・生存するためには菌根菌との共生が必須である（Smith & Read, 2008; 奈良, 2014）。以上のように、樹木と菌根菌の共生は相利的な関係であり、その上に森林生態系が成り立っていると云っても過言ではない。

自然界での菌根菌の感染経路として、土壤中の菌糸ネットワークと孢子（菌核等を含む）の2つが存在する。既に成立した森林では、樹木の菌根とそこから伸びる菌糸ネットワークが土壤中に普遍的に存在し、発生する子実体から孢子も供給されるため、宿主樹木のほぼ全ての細根が菌根化している。大規模な攪乱によって宿主樹木が死滅してしまうと、土壤中の菌糸ネットワークは消失し、孢子の供給も激減するため、宿主樹木の定着は著しく阻害される（Nara & Hogetsu, 2004; Nara, 2006）。しかし、土壤中に蓄積された休眠状態の孢子（埋土孢子）が主要な感染源として機能する場合があります。親和性のある宿主樹木の定着が優先的に促進される（Baar *et al.*, 1999; Izzo *et al.*, 2006）。このような埋土孢子を形成する菌種は、成木に共生している菌根菌群集とは大きく異なり、より少ない種で構成されるのが一般的である（Taylor & Bruns, 1999; Miyamoto & Nara 2016; Murata *et al.*, 2017a）。

マツ科のマツ属（*Pinus*）やトガサワラ属（*Pseudotsuga*）は光要求性の高い陽樹であり、攪乱後にいち早く定着する先駆種的な性質を持っている。このような樹木は、埋土孢子として優占することが多いショウロ属（*Rhizopogon*）やアミタケ属（*Suillus*）に親和性があるため、他の樹木より優先的に攪乱地に侵入することができる（Baar *et al.*, 1999; Izzo *et al.*, 2006; Peay *et al.*, 2009）。特にショウロ属（*Rhizopogon*）の埋土孢子の寿命は長く、少なくとも数十年は土壤中で感染性を維持すると考えられおり（Brunns *et al.*, 2009）、マツ林だけでなく、遷移の進んだ多様な森林土壤中に検出される（Miyamoto & Nara, 2016）。このように、宿主樹木も菌根菌も攪乱環境に適応することで存続している共生関係と言える。

マツ属やトガサワラ属には、被子植物との競争や近年

の森林破壊・人工林化によって生息域が縮小・断片化し、絶滅の危機に瀕している種が存在する。本研究で対象とするトガサワラ（*Pseudotsuga japonica*）は高知県の東部と紀伊半島の一部にのみ生息する日本の固有種であり、絶滅危惧種に指定されている（IUCN, 2020）。残存する林分はいずれも規模が小さく、スギやヒノキの人工林の中にパッチ状に残存する形で存在する。化石や分子時計による証拠によって、トガサワラの祖先は約3200万年前に北米からベーリング陸橋経由でアジアに渡り、その後中国のシナトガサワラ（*Pseudotsuga sinensis*）と約2000万年前に分化したと推定されている（Wei *et al.*, 2010）。

トガサワラと同属のベイマツ（*Pseudotsuga menziesii*）は北米西部に広大な分布域を持つ同地域の森林生態系を代表する樹種である。林業上も中心となる樹種であることから、多くの研究蓄積がある。菌根菌については、ベイマツにしか共生しないショウロ属（トガサワラ属に特異的な *Villosuli* 亜属）が存在し（Grubisha *et al.*, 2002）、埋土孢子で優占すること、山火事などの攪乱後にベイマツの更新を助ける重要な機能を持つことが明らかにされている（Barker *et al.*, 2013）。そこで日本のトガサワラでも菌根を調べたところ、トガサワラに特異的な菌根菌が存在し、埋土孢子として最も優占することが示され、攪乱後の実生定着に中心的な役割を持っていると推測された（Murata *et al.*, 2017a）。この菌種は Mujic *et al.* (2014) によって *Rhizopogon togasawariana*（のちに *R. togasawarius* と訂正、和名はトガサワラショウロ）として記載され、*Villosuli* 亜属に含まれることが示された。*Villosuli* 亜属がトガサワラ属樹木にのみ共生すること、宿主のトガサワラ属は北米とアジアで3200万年前に分岐していること、ショウロ属は地中に子実体を形成し、動物に孢子散布を依存しているため長距離散布ができないことを考えると、トガサワラショウロも宿主と同じ時期に種分化したものと考えられる。

トガサワラとトガサワラショウロの共進化系は、菌根菌の系統進化において重要な知見を提供してくれる可能性がある。植物や脊椎動物に比べて菌類の化石標本は極めて少なく、分子系統樹の分岐年代推定の補正が困難である（Barbee & Taylor, 2010）。全く異なる系統群の化石を利用せざるを得ないため、菌類の分岐年代推定には大きな誤差が含まれ、その推定値が3～5倍も異なることもある（Lücking *et al.*, 2009）。一方、植物寄生菌の分岐年代推定に宿主植物の分岐年代を用いた例がある（Takamatsu & Matsuda, 2004）。同様の手法が菌根菌の分岐年代推定に応用された例はないが、化石によって補正され信頼性も高いトガサワラの分岐年代を使うことで（Wei *et al.*, 2010）、トガサワラショウロと近縁種の分岐

年代推定ができるものと考えられる。さらに、生態的に密接な関係にある宿主と菌根菌の塩基置換速度の比較によって世代時間などに示唆を与える知見が得られるであろう。

トガサワラショウロは宿主樹木と同じ分布域しか持たないため、宿主樹木と同様に絶滅危惧種に該当する可能性が高い。さらにマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析によって、分断化された集団間の遺伝子流動は宿主よりも菌根菌の方で制限され、集団の遺伝的分化が遙かに進行していることが明らかになった (Abe *et al.*, unpublished)。これは花粉を風によって長距離散布することができるトガサワラにくらべ、胞子散布を小型動物に依存しているトガサワラショウロの方で強い分散制限が加わっているためである。つまり、隔離集団内の近交弱勢によって絶滅に至るリスクは宿主よりも菌根菌の方で高いことを示唆している。これまで、トガサワラをはじめとする絶滅危惧樹木の保全では、種子の収集や保存、栽培、域外への植栽など、対象樹木にのみ注意が払われてきた。しかし、トガサワラとトガサワラショウロの密接な生態的關係と長い共進化の歴史から考えると、トガサワラショウロがなければ希少なトガサワラ林を自然に維持することはできないであろう。トガサワラショウロを菌株として保管・維持することができれば、絶滅の危機にある樹木と菌根菌の保全上、重要な意義があると考えられる。この場合、集団間の遺伝的分化が進んでいることを考慮すると、できる限り異なる集団から菌株を収集することが重要となる。

本研究で対象とするもう一つの宿主樹木はヤクタネゴヨウである。ヤクタネゴヨウの系統進化や生物地理についての詳細は不明である。現在は、屋久島と種子島の限られた地域にしか生息せず、近年はマツ材線虫病の被害によってさらに個体数が減少傾向にある絶滅危惧種である (Akiba & Nakamura, 2005)。本種の菌根菌を調べたところ、ヤクタネゴヨウにしか共生しない新種のショウロ属菌を発見し、ヤクタネショウロ (*Rhizopogon yakushimensis*) として記載された (Sugiyama *et al.*, 2018)。ヤクタネショウロも残存林の埋土孢子群集で最も優占する菌種であり、攪乱後の宿主実生の定着に重要な役割を果たしていると推定できる (Murata *et al.*, 2017b)。

ヤクタネショウロについてもマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝解析によって、宿主以上に遺伝子流動が制限されて集団分化が進んでいることが明らかにされている (Sugiyama *et al.*, unpublished)。風媒花の宿主よりも小型動物に胞子散布を依存するヤクタネショウロで強い分散制限がかかっているためである。トガサワラショウロと同様に、ヤクタネショウロも絶滅危惧種に該当し、そのリスクは宿主以上に深刻であると考えら

れる。本種についても、異なる集団から菌株を網羅的に収集し、カルチャーコレクションとして整備することで、本菌種の保全だけでなく、絶滅危惧種である宿主の保全にも活用できると考えられ研究意義は大きい。

菌根菌の菌株を維持するために継代培養が一般的に行われる (Corbery & LeTacon, 1997)。しかし、長期間継代培養した菌株は樹木との共生能力が失われることも多い (Marx & Daniel, 1976; Thomson *et al.*, 1993)。純水やミネラルオイル、アルギン酸ビーズに培養菌糸を封入して低温保存する試みもあるが、有効性が実証された菌種は少数であり、これらの手法では死滅してしまう菌種も存在する (Lalaymia *et al.*, 2014)。一般的な微生物株保存で用いられている凍結乾燥や凍結保存は、菌根菌に適応するのが難しい場合が多いものの、様々な改良が行われており技術が確立されれば有効な菌株維持手法になると思われる (Homolka *et al.*, 2006; Crahay *et al.*, 2013)。しかし、現段階では菌根菌の菌株維持に凍結乾燥や凍結保存を標準としているカルチャーコレクションはなく、高額な機器を必要とする点も問題であろう。一般的な研究室レベルでも菌株を長期間にわたって安定的に維持できる新たな手法が望まれる。

絶対共生菌であり培地上での生育が困難なアーバスキュラー菌根菌の場合、INVAM等のカルチャーコレクションでは植物と共生させてポット栽培することで菌株が維持されている。人工培地上で生育する菌種も多い外生菌根菌の場合はこのような手法で菌株が維持されることはなかったものの、菌株の感染能力を維持したまま自然な状態で菌株を維持できるメリットは大きいと考えられる。

そこで本研究では、(1)宿主の分岐年代を適用することで、トガサワラショウロの分岐年代や進化速度を明らかにすること、(2)推定された進化速度をヤクタネショウロに適用してその種分化の過程を明らかにすること、(3)埋土孢子を用いてトガサワラショウロおよびヤクタネショウロの菌株を単離すること、(4)宿主樹木と共生させた状態で菌株の維持が可能かを検証することを目的とする。

実験方法

調査地と土壌サンプリング

宿主樹木の主要生息地を網羅的に調査地とした (Fig.1)。トガサワラショウロについては、トガサワラが優占する奈良県吉野郡川上村の三之公川、和歌山県日高郡印南町の川又観音、和歌山県東牟婁郡本宮町の大塔山、高知県安芸郡馬路村の安田川山と魚梁瀬、高知県安芸市の西ノ川山の計6林分を対象とした (Table 1)。ヤ

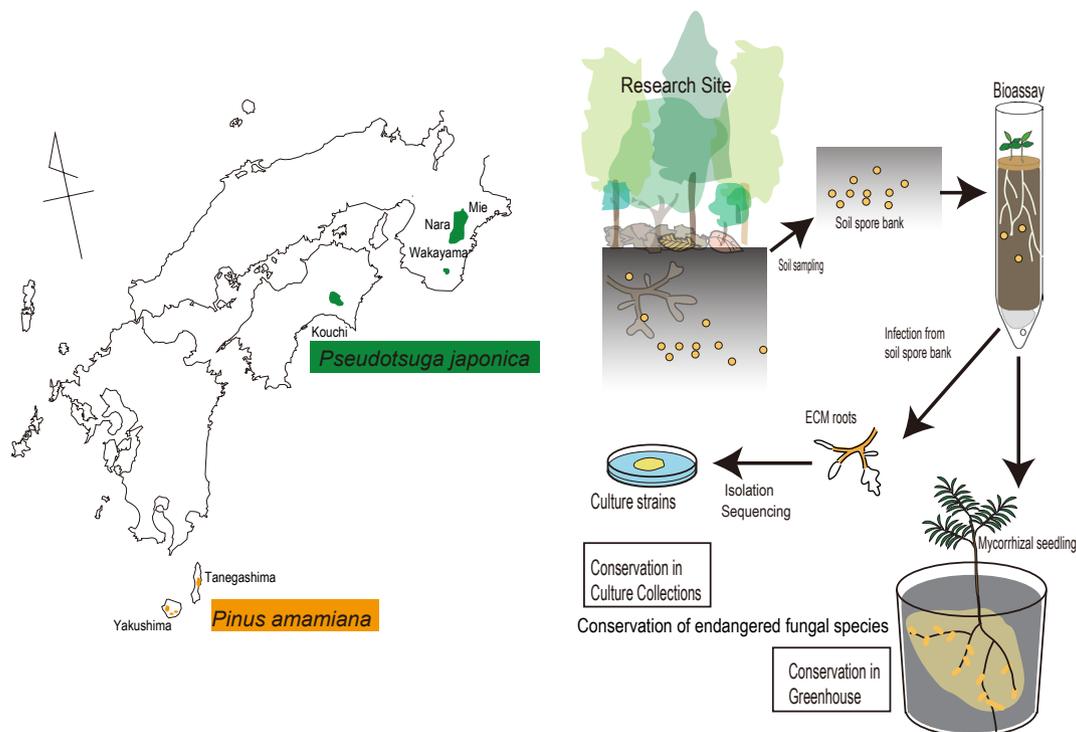


Fig. 1 Distribution of endangered *Pseudotsuga japonica* and *Pinus amamiana* forests (left) and illustration of research outline (right)

Table 1. Sampling site information

Species	Site names	Prefecture, islands	Number of samples	Coordinates
<i>Rhizopogon togasawarius</i>	Sannokogawa	Nara	25	N: 34°15' 38.1" E: 136°05' 49.3"
	Kawamatakannon	Wakayama	25	N: 33°54' 37.1" E: 135°22' 03.8"
	Ohtosan	Wakayama	25	N: 33°45' 06.3" E: 135°41' 55.7"
	Yasudagoyama	Kouchi	50	N: 33°37' 49.8" E: 134°02' 37.0"
	Yanase	Kouchi	25	N: 33°38' 22.8" E: 134°05' 55.8"
	Nishinokoyama	Kouchi	25	N: 33°36' 36.5" E: 133°57' 53.6"
	<i>Rhizopogon yakushimensis</i>	Hirauchi	Yakushima	26
Ohko Forestry Road Banri		Yakushima	21	N: 30°19' 40.1" E: 130°24' 37.7"
Wasedagawa		Tanegashima	32	N: 30°36' 36.9" E: 131°01' 43.4"

For each species, soil core samples were collected to conduct bioassay experiments and bait ectomycorrhizal fungi from soil spore banks.

クタネショウロについてはヤクタネゴヨウが優占する鹿児島県熊毛郡屋久島町の平内と大川林道万里，鹿児島県熊毛郡中種子町の早稲田川の計3林分を対象とした (Table 1)。一般的に菌根菌の菌株単離には子実体が用いられることが多い。しかし，トガサワラショウロとヤクタネショウロについては，子実体の発見例が極めて少なく (Mujic *et al.*, 2014; Sugiyama *et al.*, 2018)，網羅的な菌株収集に利用することは事実上不可能である。一方，

どちらの菌種も宿主樹木の残存林において埋土孢子群集では最も優占することが判明しており，埋土孢子から菌株を得られれば遺伝資源収集に理想的である。そこで，各調査対象林分内で無作為に選んだトガサワラまたはヤクタネゴヨウの周辺の21～50地点において，5cm×5cm×10cm (深さ)の土壤ブロックを採取した。各林分のサンプリング地点数は林分サイズや宿主樹木の残存数によって異なる。

バイオアッセイ

採取した土壌試料から粗大有機物を取り除いて1ヶ月以上風乾させた。Murata *et al.* (2017a) に従ってバイオアッセイ容器を作成し、チューブに土壌を入れ、トガサワラ林分から採取された土壌にはバイマツの種子を、ヤクタネゴヨウ林分から採取された土壌にはヤクタネゴヨウまたはヒメコマツの種子を植えて光と温度環境が制御された実験室のクリーンブース（日照16時間、暗条件8時間、温度25℃）で約6カ月育苗した。バイマツとヒメコマツはトガサワラやヤクタネゴヨウの種子の入手が困難であったため、同属近縁種で代用したものであり、先行研究でトガサワラショウロまたはヤクタネショウロの埋土胞子から菌根を形成することが確認されている（Murata *et al.*, 2017a, 2017b）。育苗期間中、苗当たり2～3mlの水道水を3～5日ごとに灌水した。

なお、バイオアッセイ苗の菌根のDNA解析によって（下記参照）、ヤクタネショウロが感染していることが確認された苗はポリポットに移植し、温室（自然光）に設置したクリーンブース内（温度25℃）で維持管理を行った。

外生菌根の形態類別と菌根菌の分離・培養

先行研究（Ishida *et al.*, 2007; Nara *et al.*, 2003）と同様にバイオアッセイ苗の全ての菌根を丁寧に水道水で洗浄し、実体顕微鏡下で観察し、菌根表面の色や形状などの特徴により形態類別を行った。トガサワラショウロまたはヤクタネショウロの菌根形態タイプのみを解析対象とし、各苗あたり最大で3つの菌根を反復試料としてランダムに採取したのち、それぞれ個別の2mlチューブに入れ、DNA抽出に供した。また、比較的新しく形成されたと思われる菌根を別を選択し、菌根菌の分離試験に供した。

採取した菌根は、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度1%）で2分30秒間表面殺菌した後、滅菌水で2回洗浄し、30ppmのテトラサイクリンを添加したMMN（Marx, 1969）平板培地上に静置し、20℃で約1ヶ月間培養した。その後、トガサワラショウロとヤクタネショウロ様の菌叢形態を示したものを新たなMMN培地に移植し純化した。純化した菌叢から菌糸を採取しDNA抽出に供した。

分子生物学的手法による菌根菌の同定

改変されたCTAB法（Nara *et al.*, 2003）によってDNAを抽出し、フォワードプライマーのITS1FやITS0F-TとリバースプライマーのITS4やITS4B、LB-Wを用いてリボソームDNAのITS領域を増幅した（Bahram *et al.*, 2011; Gardes & Bruns, 1993; Tedersoo *et al.*, 2008; White *et al.*, 1990）。増幅した産物をITS1もし

くはITS4をプライマーとしてシーケンスを行った。得られた配列データは、シーケンスアセンブリソフトウェアATGC ver. 7（GENETYX社、日本）で波形確認とベースコールのエラーを修正した後、配列のマッチングを行った。ITS領域の相同性が97%以上を同じ種（MOTU: molecular operational taxonomic unit）と定義し、配列のクラスタリングを行った。その後、NCBI（National Center for Biotechnology Information）が提供しているBLASTプログラムを使用し、登録されている菌種との相同性の検索を行い、種の同定を行った。バイオアッセイ苗の菌根から分離された菌株は、純化の後、上記の同定によってトガサワラショウロまたはヤクタネショウロであることが確認されたもののみを菌株として扱った。また、同じ土壌サンプル由来であっても別の菌根から分離された菌は異なる菌株として扱った。

系統解析

トガサワラショウロのITS塩基配列をqueryとして、NCBIのBlast検索（Megablast）によって相同性が95%以上の近縁な塩基配列を取得した。系統解析の際に冗長となる同一地域の同一塩基配列や、一部領域に欠損のある配列は削除した。トガサワラショウロを含む *Villosuli* 亜属と近縁な別亜属から *Rhizopogon vulgaris*（AF062931, AF062934）を外群として加えて系統解析の配列データセットとした。以降の系統解析は全てMEGA ver.10（Stecher *et al.* 2020）を用いて行った。アラインメントはMUSCLEのデフォルト設定で行ったのち、両端の塩基長が不揃いな部分を手作業で削除した。系統解析の塩基置換モデルには、BIC（Bayesian Information Criterion）scoresが最も低いものを最適モデルとして用いた。系統樹は最尤法（ML法）と近隣接合法（NJ法）によって作成した。いずれも、ギャップはpairwise deletionとして扱い、分岐の信頼度は500回のブートストラップ検定によって算出した。

ヤクタネショウロについても同様にして系統解析を行った。外群には *Rhizopogon evadens*（AF062927）および *Rhizopogon occidentalis*（AF058305）を使用した。

ITS領域の変異速度、および近縁種との分岐年代の推定

トガサワラショウロの系統解析に使用したITS領域全体（ITS1, 5.8S, ITS2）のアラインメントから外群の配列を除き、トガサワラショウロを含むアジア種群と北米種群の平均遺伝距離をMEGA ver.10によって算出した。算出の際には最適な塩基置換モデルを採用した。それぞれの特異的宿主であるトガサワラ属樹木が分岐したのは化石などの証拠から約3200万年前と推定されている（Wei *et al.*, 2010）。そこで、これらのトガサワラ属

樹木と特異的に共生するアジア種群と北米種群が分岐したのも同じ年代と仮定し、ITS領域の変異速度(% divergence/My)を推定した。その後、推定された変異速度を用いて、中国本土の近縁種、および台湾の近縁種との分岐年代の推定を行なった。

ITS1領域のみ、ITS2領域のみ、およびITS1とITS2領域(ITS領域全体から保存された5.8S領域を除いたもの)でも同様の変異速度と、アジア種群の分岐年代推定を行なった。ただし、遺伝距離推定には、それぞれのデータセットに最適な塩基置換モデルを新たに選択した。宿主のITS領域についても、シナトガサワラ(*Pseudotsuga sinensis*, *Pseudotsuga sinensis* var. *wilsoniana*)、ペイマツ(*Pseudotsuga menziesii*)、*Pseudotsuga macrocarpa*の塩基配列をNCBIから取得し、上記と同様な変異速度の推定を行なった。

トガサワラショウロと近縁種の系統解析では塩基置換数は十分に少数であったことから、塩基置換モデルを考慮しない遺伝距離(substitutions/site/10⁹years)でも分岐年代を推定した。ここでも北米種群とアジア種群の分岐年代を3200万年前と仮定し、相対遺伝距離によってアジア地域内の分岐年代の推定を行った。また、宿主の塩基置換速度との比較も上記と同様に行った。

結果と考察

トガサワラショウロの系統進化と進化速度

安田川山の調査地から採取した50の土壌サンプルのうち、48においてバイオアッセイ苗にトガサワラショウロの菌根が形成され、埋土胞子の存在が確認された。これらのトガサワラショウロ菌根、および菌根から単離した菌株(後述)のITS配列は全て、Murata *et al.* (2017b)がバイオアッセイ苗の菌根から得た配列(LC260453)、およびMujic *et al.* (2014)が新種記載に用いた子実体タイプ標本の配列(KC542888)と同一であった(ただし後述するように1塩基の多型サイトが含まれる)。これらの配列とデータベース上の近縁な配列を含めた分子系統解析によって、トガサワラショウロとトガサワラショウロに近縁な種は(簡略化のため未記載のMOTUを含めて種と表現する)、北米とアジアの明瞭な2つの系統群に別れた(Fig.2)。また、アジア地域内では中国と台湾の種が単系統であり、トガサワラショウロと姉妹群を形成した。このような樹形は宿主であるトガサワラ属の系統関係と全く同一であり(Gernandt & Liston, 1999; Wei *et al.*, 2010)、互いに宿主特異性を維持したまま共進化をしてきたことが示唆される。

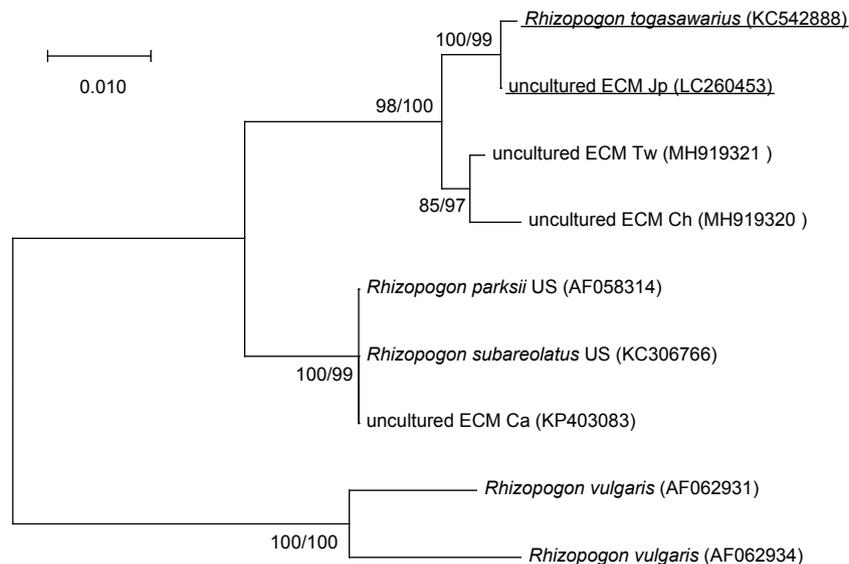


Fig. 2 Phylogenetic trees of *Rhizopogon togasawarius* and related species based on ITS sequences. Branching supports based on bootstrap tests on Maximum Likelihood (ML) and Neighbor Joining (NJ) trees are shown (ML/NJ). Kimura's two parameter model with gamma distributed rate variation was used as the best substitution model. NCBI accession numbers are included in the OTU labels. ITS sequences obtained from ectomycorrhizal roots (ECM) and culture strains in this study were identical to the underlined published sequences from ECM (LC260453) or sporocarp type specimens (KC542888). Abbreviations: ECM, ectomycorrhiza; Jp, Japan; Ch, China; Tw, Taiwan; US, United States; Ca, Canada.

北米種群とアジア種群が宿主と同様に3200万年前に分岐したと仮定した場合、ITS領域全体（5.8S rDNAを含む）の進化速度は0.11% divergence/Myと推定された。これを元に、トガサワラショウロと中国の近縁種が分岐した年代は1710万年前、トガサワラショウロと台湾の近縁種との分岐は1410万年前と推定された（Table 2）。完全に保存されていた5.8S領域を除いたITS1とITS2領域の進化速度は0.15% divergence/Myと大きくなったものの、推定分岐年代は大きく変化しなかった。これらの分岐年代は、地殻変動によってユーラシア大陸から日本列島が形成された時期と一致する（鎌田, 2016）。また、宿主であるトガサワラとシナトガサワラの分岐年代とも大きく乖離しない（Wei *et al.*, 2010）。つまり、トガサワラショウロとその近縁種は、宿主特異性を維持したまま宿主樹木と同じ生物地理学的なプロセスを辿ってきたものと考えられる。

中国と台湾の近縁種間に分岐年代を同様に計算したところ590万年前と推定されたものの、ITS1領域の塩基配列は全く同じであった。このことから台湾と中国に陸橋が形成された氷期に移入交雑が起こった可能性が考えられる。宿主についても、タイワントガサワラを独立した種とするか、中国のシナトガサワラと同一とするかは議論が分かれている（Farjon, 1990）。移入交雑によって部分的に遺伝子の交換が行われるような場合はゲノムワイドな解析を行わなければ正確な進化プロセスを明らかにすることはできないであろう。

トガサワラショウロと近縁種間の塩基置換速度

（substitutions/site/10⁹years）の推定値は、ITS領域全体で0.52、保存された5.8S領域を除くと0.70であった（Table 3）。トガサワラショウロが中国と台湾の近縁種から分岐した年代は、それぞれ1750万年前と推定された。Takamatsu & Matsuda (2004) によってウドンコカビ菌（*Goloviomycetes*）で推定されたITS領域の塩基置換速度は2.52±0.11と本研究の推定値よりも数倍も速い。全く生態の異なる菌群のため単純な比較はできないが、この塩基置換速度の大きな差異は植物や動物で明らかにされているように、主に世代時間の違いを反映しているものと考えられる。また、これらの結果は、分子系統解析に時間軸を取り入れる場合、生態も異なる全く別系統の化石によって補正を行うことが不適切であることを明示している。いずれにせよ、ITS領域は菌根菌の群集解析や種レベルの系統解析に最も利用されている部位であり、本研究で示した進化速度の推定値はこれらの研究分野におおよその時間軸を提供できる意義のある結果であると考えている。

トガサワラ属樹木のITS領域の進化速度を計算すると、ITS領域全体では0.11% divergence/My、保存された5.8領域を除くと0.13% divergence/Myとなり、トガサワラショウロの推定値とほぼ同じ値を示した（Table 2）。塩基置換速度の推定値（substitutions/site/10⁹years）でも、ITS領域全体で0.56、5.8S領域を除くと0.62と推定され、ともにトガサワラショウロと近縁種群の推定値と同程度であった（Table 3）。進化速度は世代時間と関係があり、世代時間が短いほど進化

Table 2. Evolutionary rates of ITS regions and estimated divergence time within *Rhizopogon togasawarius* and their host lineages

	DNA region used for divergence time estimation			
	ITS1	ITS2	ITS1+5.8S+ITS2	ITS1+ITS2
<i>Rhizopogon togasawarius</i> and relatives				
best substitution model selected	K2	JC	JC	JC
aligned sequence length(bp)	220	251	630	471
evolutionary rate (% divergence/My)	0.136	0.158	0.108	0.147
Divergence from Chinese relative (Mya)	13.7	19.4	17.1	16.9
Divergence from Taiwanese relative (Mya)	13.7	14.2	14.1	14
<i>Pseudotsuga</i> (host tree genus)				
best substitution model selected	TN	TN	TN	TN
aligned sequence length(bp)	1177	232	1571	1409
evolutionary rate (% divergence/My)	0.140	0.091	0.117	0.131

Divergence time was estimated from relative phylogenetic distances to the distance between Asian and North American species groups, given they were diverged 32 millions years ago as evidenced in host *Pseudotsuga*. Only the mean values are shown for evolutionary rates and divergence time. Substitution models: K2, Kimura's 2 parameters; JC, Jukes Cantor; TN, Tamura-Nei.

Table 3. Estimated substitution rates of ITS regions for *Rhizopogon togasawarius* and its relatives in comparison to their coevolved hosts

	DNA regions used for the estimation of substitution rates and divergence time			
	ITS1	ITS2	ITS1+5.8S+ITS2	ITS1+ITS2
<i>Rhizopogon togasawarius</i> and relatives				
aligned sequence length(bp) (L)	220	251	630	471
number of substitutions between Asia and North America (K)	9.3±2.8	11.8±3.2	21.0±4.4	21.0±4.2
substitution rate (substitution/site/billion years)	0.66±0.20	0.73±0.20	0.52±0.11	0.70±0.14
Divergence from Chinese relative (Mya)	14.2	20.4	17.5	17.5
Divergence from Taiwanese relative (Mya)	14.2	15.0	14.5	14.5
<i>Pseudotsuga</i> (host tree genus)				
aligned sequence length(bp)	1177	232	1571	1409
number of substitutions between Asia and North America	50.2±5.9	6.5±2.3	56.7±7.0	56.7±7.0
substitution rate (substitution/site/billion years)	0.67±0.08	0.44±0.16	0.56±0.07	0.62±0.08

Substitution rates are obtained by calculating $K/L/(2T)$, where K is the mean number of substitutions between Asian and North American species pairs, L is sequence length, and T is 0.032 billion years representing the divergence time of the host *Pseudotsuga* lineages. Mean values followed by SE, which were calculated from 500 bootstrap tests.

は早くなる (Smith & Donoghue, 2008). トガサワラもトガサワラシヨウロも攪乱に依存した生存戦略を持つと考えられることから、その世代時間は攪乱周期と対応している可能性がある。

ヤクタネシヨウロの系統進化と分岐年代推定

3つの調査地から採取した大半の土壌サンプルでバイオアッセイ苗にヤクタネシヨウロの菌根が形成され (平内 19/26, 万里 15/21, 早稲田川 25/32), 埋土胞子の存在が確認された。これらの菌根, および菌根から単離した菌株 (後述) の ITS 配列は全て, Murata *et al.* (2017a) が現地ヤクタネゴヨウ成木から得た菌根 (LC315873), および Sugiyama *et al.* (2018) がヤクタネシヨウロの新種記載に用いた子実体タイプ標本の配列 (LC216339) と完全に一致した。これらのヤクタネシヨウロの配列とデータベースに登録された近縁な塩基配列は (相同性が 95% 以上), いずれも日本および中国で採取された菌根から検出されたものであり, シヨウロ属の既知種とは系統的に大きく離れていた (Fig. 3)。これまでに提唱されているシヨウロ属のどの亜属にも含まれない新たな亜属と考えられる (Sugiyama *et al.*, 2018)。ヤクタネシヨウロは中国の中部や北部の菌種ではなく, 中国南部の種と単系統群を形成する点については高い信頼性が得られた。この単系統群には日本で採取された菌根由来の配列も含まれているが, これらの系統関係については ML 法と NJ 法で一致しなかった部分がある。ML 法では中国南部の種が単系統群内の他の種と姉妹関係にあったが (Fig. 3), NJ 法ではヤクタネシヨウロが他の種と最も基

部で分岐するという結果であった。

トガサワラシヨウロで推定された ITS 領域全体の進化速度を用いて, 中国南部で検出された種とヤクタネシヨウロの分岐年代を推定すると 1780 万年前となった (Table 4)。単系統群内の日本の近縁配列との分岐年代は 1640 万年前と推定された。同様にトガサワラシヨウロで推定された塩基置換速度からヤクタネシヨウロの分岐年代を推定したところ, 中国南部の近縁種, 日本国内の近縁種とはそれぞれ 1770 万年前, 1620 万年前に分岐したと推定された (Table 5)。この単系統群内では, ITS1 領域に比べて ITS2 領域の変異が少なく, 特にヤクタネシヨウロ以外の日本の配列と中国南部の配列には 2 塩基の置換しかなかった。つまり, それほど古くない時代に, 中国南部とヤクタネシヨウロ以外の日本の近縁種の間に移入交雑が起こった可能性がある。いずれにせよ, ヤクタネシヨウロはアジアの近縁種と分岐して 1600 万年以上も独自進化をした希少種であることは間違いない。

ヤクタネシヨウロの宿主であるヤクタネゴヨウの系統進化や生物地理についてはほとんど分かっていない。仮にヤクタネシヨウロとヤクタネゴヨウが宿主特異性を維持したまま共進化をしてきたと仮定すると, ヤクタネゴヨウも古い地質時代に中国南部との共通祖先から分岐した可能性が高い。また, 上述したようにトガサワラシヨウロが同じ時代に中国の近縁種と分岐したと推定されていることから, いずれも日本列島の形成初期にユーラシア大陸から隔離される形で異所的種分化の過程を辿ったものと考えられる。

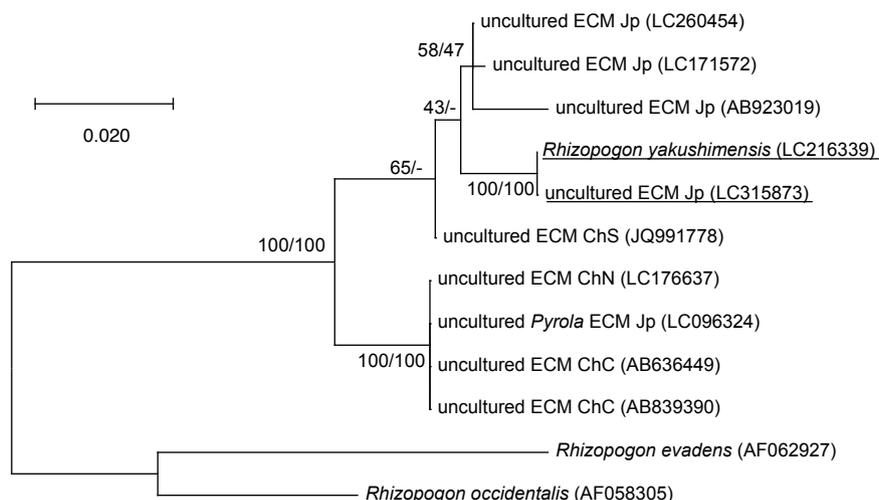


Fig. 3 Phylogenetic trees of *Rhizopogon yakushimensis* and related species based on ITS sequences. Branching supports based on bootstrap tests on Maximum Likelihood (ML) and Neighbor Joining (NJ) trees are shown (ML/NJ). Kimura's two parameter model with gamma distributed rate variation was used as the best substitution model. NCBI accession numbers are included in the OTU labels. ITS sequences obtained from ectomycorrhizal roots (ECM) and culture strains in this study were identical to the underlined published sequences from ECM (LC315873) and sporocarp type specimens (LC216339). Abbreviations: ECM, ectomycorrhiza; Pyroloa, Pyroloa mycorrhiza; Jp, Japan; ChS, Southern China; ChN, Northern China; ChC, Central China.

Table 4. Estimated divergence time of *Rhizopogon yakushimensis* from their relatives in Asia based on evolutionary distances

	DNA region used for divergence time estimation			
	ITS1	ITS2	ITS1+5.8S+ITS2	ITS1+ITS2
best substitution model selected	K2	K2	K2	K2
aligned sequence length(bp)	239	376	624	464
divergence from S.China relatives (Mya)	26.6	6.1	17.8	17.9
divergence from Japanese relatives (Mya)	18.9	8.5	16.4	16.6

Table 5. Estimated divergence time of *Rhizopogon yakushimensis* from their relatives in Asia based on ITS substitution rates

	DNA region used for divergence time estimation			
	ITS1	ITS2	ITS1+5.8S+ITS2	ITS1+ITS2
aligned sequence length (bp)	239	376	624	464
number of substitutions vs S.China relative (K)	8.0±2.7	3.5±1.7	11.5±3.4	11.5±3.1
divergence from S.China relative (Mya)	25.4±8.6	6.4±3.1	17.7±5.2	17.7±4.8
number of substitutions vs Japanese relatives (K)	5.7±2.2	4.8±1.9	10.5±3.1	10.5±2.9
divergence from Japanese relatives (Mya)	18.1±7.0	8.7±3.5	16.2±4.7	16.2±4.5

Divergence time was calculated using the estimated substitution rates in Table 3. Mean values followed by SE, which were calculated from 500 bootstrap tests with MEGA ver.X.

トガサワラシヨウロとヤクタネシヨウロの菌株単離

トガサワラシヨウロの菌株採取地のうち三之公川と川又観音、大塔山、魚梁瀬、西ノ川山は大雨による林道寸断などの影響によりサンプリングを一年延期せざるをえなかったため、現在バイオアッセイ中であり、菌株取得には至っていない。それ以外の菌株採取地のうち、トガサワラシヨウロは安田川山で21菌株、ヤクタネシヨウロは平内で1菌株と大川林道万里で5菌株、早稲田川で5菌株の単離に成功した。MMN 平板培地上での菌叢形態はトガサワラシヨウロは暗黒色、ヤクタネシヨウロはこげ茶色で、ともに気中菌糸はあまり形成しなかった (Fig.4)。これらの結果は、子実体が得にくい希少菌種でも埋土胞子を利用することにより1回の現地調査で効率的に遺伝資源の収集が可能であることを示している。

単離された菌株のうち、トガサワラシヨウロの1菌株とヤクタネシヨウロ3菌株を菌株保存機関である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) に寄託した (Table 6)。動物や植物に比べて分布域や個体数を調べるのが困難な菌類は、同じ真核多細胞生物でありながらデータ不足によって絶滅危惧種としての登録数が圧倒的に少ない (IUCN, 2020)。

このため、カルチャーコレクションで菌類の絶滅危惧種を保全するという概念自体も存在していなかった。本研究によって、絶滅危惧微生物の保存というカルチャーコレクションの新たな機能がさらに発展することを願う。

トガサワラシヨウロまたはヤクタネシヨウロの菌株間の菌叢形態を比較したところ、各菌種ともに菌株間に大きな違いはなかった。さらに、採取された菌根や分離菌株のITS領域の塩基配列を比較したところ、トガサワラシヨウロでは1塩基で多型が観察された (菌株では21菌株中7菌株がTで14菌株がC、菌根では140サンプル中3つがTで残りの137がC)。同じ土壌サンプル内では同一の多型タイプを示すことが多かったものの、一部では同じ土壌サンプル内で2つのタイプが存在していたことから、集団内で固定されていないことが明らかにされた。一方、ヤクタネシヨウロの菌根や分離菌株のITS領域の配列は全く同一であり、多型はなかった。一般に、ITS領域には種内変異が存在する 경우가多く、同じ地下生菌のイボセイヨウシヨウロなどでは10塩基サイト以上で確認されている (Kinoshita *et al.*, 2011)。おそらく、絶滅危惧樹木にのみ共生することから、集団のサイズが小さいために遺伝的浮動の影響を強く受け、固

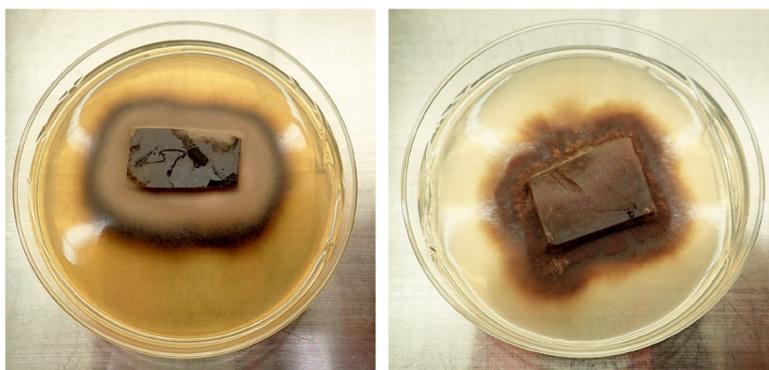


Fig. 4 Cultured strains of *Rhizopogon togasawarius* (left) and *Rhizopogon yakushimensis* (right) grown on Modified Melin-Norkrans in a 90 mm plate.

Table 6. Deposited culture strains of ectomycorrhizal fungi isolated from soil spore banks

Species	Strain*	Site of collection	Bioassay host	NBRC number
<i>Rhizopogon yakushimensis</i>	Ryaku No.32 (<i>Rhizopogon</i> Y2-21 No.199)	Ohko Forestry Road Banri	<i>Pinus parviflora</i>	NBRC 113761
<i>Rhizopogon yakushimensis</i>	Ryaku No.33 (<i>Rhizopogon</i> Y1-3 No.196)	Wasedagawa	<i>Pinus parviflora</i>	NBRC 113762
<i>Rhizopogon yakushimensis</i>	Ryaku No.10 (<i>Rhizopogon</i> T-1 No.200)	Hirauchi	<i>Pinus parviflora</i>	NBRC 113763
<i>Rhizopogon togasawarius</i>	Rtoga No.10 (<i>R.togasawariana</i> No.193)	Yasudagoyama	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	NBRC 113764

*Lab strain names followed by working strain IDs in parentheses



Fig. 5 *Pinus amamiana* seedlings, nonmycorrhizal (above) or ectomycorrhizal with *Rhizopogon yakushimensis* (below), grown for two years in a green house

定 (fixation) が進んだと考えられる。

宿主苗と共生状態での菌株維持

ヤクタネシヨウロの感染した苗は、対照区の子実体の非感染の苗に比べて顕著に成長が促進されていた (Fig. 5)。2年後でもヤクタネシヨウロの菌根は確認できたことから、苗との共生状態で菌株を維持できることが実証できた。HEPA フィルターを装着したクリーンブース内で育てていることもあり、周囲から孢子で他の菌根菌が侵入することも確認されていない。同様の環境で育苗している他のマツとシヨウロの組み合わせでは子実体の発生も確認されていることから、ヤクタネシヨウロの子実体が栽培によって得られる可能性もある。その場合は、特定菌株の孢子が大量に採取できるため、埋土孢子による菌株の維持へも繋がるであろう。さらに、有性生殖によってより優れた菌株を得るような実験も可能となるなど、発展性が望める菌株の維持管理方法である。

要 約

樹木の成長や生存には菌根菌という根に共生する菌類が不可欠だが、絶滅危惧樹木と菌根菌の相互作用に関する知見は乏しい。先行研究において、絶滅危惧種に指定されているトガサワラとヤクタネゴヨウの菌根菌を調べたところ、いずれもその樹種にしか共生しない新種の菌根菌が発見され、それぞれトガサワラシヨウロ、ヤクタ

ネシヨウロとして記載された。どちらの菌種もそれぞれの絶滅危惧樹木に特異的に共生するため、宿主の系統進化や生物地理の影響を強く受けている可能性が高い。トガサワラの分岐年代については化石標本等によって詳細に明らかにされているため、これをトガサワラシヨウロの分岐年代推定や進化速度推定に活用できると考えた。そこで本研究ではトガサワラシヨウロと近縁な登録配列をNCBIから取得して系統解析を行ったところ、宿主の系統進化と同様に北米種群とアジア種群に明確に別れた。この分岐年代を宿主の分岐年代である3200万年前と仮定すると、中国や台湾の近縁種とトガサワラシヨウロが分岐したのは1500~1800万年前であると推定された。また、宿主樹木と菌根菌のITS領域の塩基置換速度は同程度であったことから (0.5 substitutions/site/10⁹ years)、両者の生態的な世代時間が近い可能性を示している。

ヤクタネシヨウロについても同様の系統解析を行ったところ、中国南部や国内の一部の未記載種と単系統群になることが明らかにされた。この系統群はこれまで知られていないどの亜属にも含まれないことから、アジアで進化した固有の系統群である可能性が高い。トガサワラシヨウロで得られた塩基置換速度を利用してヤクタネシヨウロの分岐年代を推定したところ、少なくとも1600万年以上に分岐したと推定された。トガサワラシヨウロとヤクタネシヨウロの両方がほぼ同時期に日本の固有種として分岐し、それが日本列島が大陸から切り

離された時期と一致することから、両種とも地殻変動にともなう異所的種分化によって誕生したと考えられる。

トガサワラシヨウロもヤクタネシヨウロも絶滅危惧種に指定された宿主樹木の存在する場所にしか生息していないため、発見された菌根菌自体も絶滅の危機にあることが強く示唆される。また、どちらの菌種も埋土胞子として最も優占していたことから、絶滅危惧樹木実生の定着や森林の更新に中心的な役割を担っていると考えられる。そこで本研究では、これら宿主樹木、菌根菌、そして希少な森林生態系保全に資するため、トガサワラシヨウロとヤクタネシヨウロの菌株を網羅的に分離収集した。どちらも子実体の収集が困難であることから、埋土胞子から宿主実生に菌根を形成させるバイオアッセイ試験で釣り上げて分離を試みた結果、トガサワラシヨウロで21菌株、ヤクタネシヨウロで11菌株の分離に成功した。この一部をNBRCのカルチャーコレクションとして寄託した。埋土胞子からの菌根菌株収集、絶滅危惧菌種を保全するためのカルチャーコレクション利用は、ともに新しい試みであり、今後の発展が期待できる。

菌根菌の菌株維持は一般的に継代培養によって行われるが、それが長期間に及ぶと菌根形成能力が失われることも多い。そこで、樹木と共生状態での菌株維持のため、バイオアッセイの過程でヤクタネシヨウロの感染が確認されたヤクタネゴヨウ苗を温室に設置されたクリーンブース内で2年間育てた。その結果、外部から他の菌根菌の侵入もなく、ヤクタネシヨウロが維持できることを確認した。さらに育苗を続けることで子実体が発生する可能性もあり、さまざまな発展性が考えられる。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 村田政穂, 杉山賢子, 奈良一秀. 2018. 屋久島のヤクタネゴヨウ人工林における外生菌根菌の埋土胞子群集. 第62回日本菌学会大会 (5月25-27日, 伊那)
- 2) 小泉敬彦, 奈良一秀. 2019. 外生菌根菌の群集形成における気温の寄与. 第66回日本生態学会大会 (3月15-19日, 神戸)
- 3) 大嶋健資, 杉山賢子, 金谷整一, 村田政穂, 奈良一秀. 2019. 埋土胞子の混合接種による遺伝的に分化した外生菌根菌集団間の外交配の誘導. 第130回日本森林学会大会 (3月20-23日, 新潟)
- 4) Nara, K. 2019. What will happen to ectomycorrhizal fungi in fragmented forests?: population genetic implications from endangered or relict forests. The 10th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushroom (Oct. 20-25, Suwa, Nagano)
- 5) 大嶋健資, 杉山賢子, 金谷整一, 村田政穂, 奈良一秀. 2020. 絶滅危惧樹木ヤクタネゴヨウ保全のための外生菌根菌の遺伝的救助. 第131回日本森林学会大会 (3月27-30日, 名古屋)
- 6) 酒井敦, 安藤暁子, 奈良一秀. 2020. 高知県安田川山希少個体群保護林におけるトガサワラの成長と更新. 第131回日

本森林学会大会 (3月27-30日, 名古屋)

- 7) 村田政穂, 金谷整一, 奈良一秀. 2020. ヤクタネシヨウロの埋土胞子は何年生きるか: 過去の松枯れ被害地から推定. 第131回日本森林学会大会 (3月27-30日, 名古屋)

原著論文

- 1) Sugiyama, Y., Murata, M., Kanetani, S. & Nara, K. 2019. Towards the conservation of ectomycorrhizal fungi on endangered trees: native fungal species on *Pinus amamiana* are rarely conserved in trees planted *ex situ*. *Mycorrhiza* **29**: 195-205.
- 2) Miyamoto, Y., Maximov, T.C., Sugimoto, A. & Nara, K. 2019. Discovery of *Rhizopogon* associated with *Larix* from north-eastern Siberia: insights into host shift of ectomycorrhizal fungi. *Mycoscience* **60**: 274-280.

その他 (総説・書籍)

- 1) 奈良一秀, 村田政穂. 2018. 絶滅危惧樹木を支えるキノコの発見: 共進化した菌根菌が保全の鍵. *遺伝* **72**: 448-453.

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、本研究の一部は科学研究費補助金を利用して行われました。現地調査の許可をいただきました林野庁、奈良県川上村、屋久島森林生態系保全センターに感謝申し上げます。現地調査では金谷整一氏、手塚賢至氏、斎藤俊浩氏にご協力をいただきました。

文 献

- Akiba, M. & Nakamura, K. 2005. Susceptibility of adult trees of an endangered species *Pinus armandii* var. *amamiana* to pine wilt disease in the field. *J. For. Res.* **10**: 3-7.
- Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M. & Bruns, T.D. 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytol.* **143**:409-418.
- Bahram, M., Pölme, S., Kõljalg, U. & Tedersoo, L. 2013. A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**:313-320.
- Barker, J.S., Simard, S.W., Jones, M.D. & Durall, D.M. 2013. Ectomycorrhizal fungal community assembly on regenerating Douglasfir after wildfire and clearcut harvesting. *Oecologia* **172**:1179-1189.
- Berbee, M.L. & Taylor, J.W. 2010. Dating the molecular clock in fungi - how close are we? *Fungal Biol. Rev.* **24**: 1e16.
- Bruns, T.D., Peay, K.G., Boynton, P.J., Grubisha, L.C., Hynson, N.A., Nguyen, N.H. & Rosenstock, N.P. 2009. Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 year of a 99-year spore burial experiment. *New Phytol.* **181**:463-470.
- Corbery, Y. & LeTacon, F. 1997. Storage of ectomycorrhizal fungi by freezing. *Ann. For. Sci.* **54**:211-217.

- Crahay, C., Declerck, S., Colpaert, J.V., Pigeon, M. & Munaut, F. 2013. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biol.* **117**:103–111.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific, Königstein, Germany
- Gardes, M. & Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113–118.
- Gernandt, D.S. & Liston, A. 1999. Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* **86**:711–723.
- Grubisha, L.C., Trappe, J.M., Molina, R. & Spatafora, J.W. 2002. Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Mycologia* **94**:607–619.
- Hobbie, E. & Högberg, P. 2012. Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytol.* **196**: 367–382.
- Homolka, L., Lisá, L. & Nerud, F. 2006. Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method. *Cryobiology* **52**:446–453
- Ishida, T.A., Nara, K. & Hogetsu, T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol* **174**:430–440.
- IUCN. 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. <https://www.iucnredlist.org>. Accessed on 19 March 2020.
- Izzo, A., Canright, M. & Bruns, T.D. 2006. The effects of heat treatments on ectomycorrhizal resistant propagules and their ability to colonize bioassay seedlings. *Mycol. Res.* **110**:196–202.
- 鎌田浩毅 2016. 地球の歴史(下)人類の台頭, 中央公論新社, 東京, 283pp.
- Kinoshita, A., Sasaki, H. & Nara, K. 2011. Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. *Mycologia* **103**:779–794.
- Köhler, J., Yang, N., Pena, R., Raghavan, V., Polle, A. & Meier, I.C. 2018. Ectomycorrhizal fungal diversity increases phosphorus uptake efficiency of European beech. *New Phytol.* **220**: 1200–1210.
- Lalaymia, I., Cranenbrouck, S. & Declerck, S. 2014. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **24**:323–337.
- Lamhamedi, M.S., Godbout, C. & Fortin, J.A. 1994. Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobus* seedlings. *Can. J. For. Res.* **24**: 1797–1804.
- Lücking, R., Huhndorf, S., Pfister, D.H., Plata, E.R. & Lumbsch, H.T. 2009. Fungi evolve right on track. *Mycologia* **101**: 810–822.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections I: antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**:153–163.
- Marx, D.H. & Daniel, W.J. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can. J. Microbiol.* **22**:338–341.
- Miyamoto, Y. & Nara, K. 2016. Soil propagule banks of ectomycorrhizal fungi share many common species along an elevation gradient. *Mycorrhiza* **26**:189–197.
- Mujic, A.B., Hosaka, K. & Spatafora, J.W. 2014. *Rhizopogon togasawariana* sp. nov., the first report of *Rhizopogon* associated with an Asian species of *Pseudotsuga*. *Mycologia* **106**:105–112.
- Murata, M., Kanetani, S. & Nara, K. 2017a. Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests. *Plos One* **12**: e0189957
- Murata, M., Nagata, Y. & Nara, K. 2017b. Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. *Ecol. Res.* **32**:469–479.
- 奈良一秀 2014. 木を育て、森を生み出す微生物「菌根菌」. *森林科学* **70**:31–34.
- Nara, K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytol.* **169**: 169–178.
- Nara, K. & Hogetsu, T. 2004. Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology* **85**: 1700–1707.
- Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z. & Hogetsu, T. 2003. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytol.* **159**:743–756.
- Peay, K.G., Garbelotto, M. & Bruns, T.D. 2009. Spore heat resistance plays an important role in disturbance-mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *J. Ecol.* **97**:537–547.
- Smith, S.A. & Donoghue, M.J. 2008. Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. *Science* **322**:86–89.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic Press in an Imprint of Elsevier, Great Britain, pp 787.
- Stecher, G., Tamura, K. & Kumar, S. 2020. Molecular evolutionary genetic analyses (MEGA) for macOS. *Mol. Biol. Evol.* **37**: 1237–1239.
- Sugiyama, Y., Murata, M. & Nara, K. 2018. A new *Rhizopogon* species associated with *Pinus amamiana* from Japan. *Mycoscience* **59**:176–180.
- Takamatsu, S. & Matsuda, S. 2004. Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. *Mycoscience* **45**: 340–344.
- Taylor, D.L. & Bruns, T.D. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* **8**:1837–1850.
- Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I. & Kõljalg, U. 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytol.* **180**:479–90.
- Thomson, B.D., Malajczuk, N., Grove, T.S. & Hardy, G.E.S.J. 1993. Improving the colonization capacity and effectiveness of ectomycorrhizal fungal cultures by association with a host plant and re-isolation. *Mycol. Res.* **97**:839–844.
- Wei, X.X., Yang, Z.Y., Li, Y. & Wang, X.Q. 2010. Molecular phylogeny and biogeography of *Pseudotsuga* (Pinaceae): insights into the floristic relationship between Taiwan and its adjacent areas. *Mol. Phyol. Evol.* **55**:776–785.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., eds. Berkeley, CA, USA: Academic Press, pp. 314–322.
- Wu, B., Nara, K. & Hogetsu, T. 2001. Can ¹⁴C-labeled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? *New Phytol.* **149**:137–146.

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

阿部敬悦

東北大学大学院農学研究科

〒980-8572 仙台市青葉区荒巻字青葉468-1

Novel technology of high-cell density culture by controlling hyphal aggregation of filamentous fungi in submerged culture

Keietsu Abe

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

468-1, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8572

Filamentous fungi are widely used for production of enzymes and chemicals, and are industrially cultivated both in liquid and solid cultures. Submerged culture is often used as liquid culture for filamentous fungi. In submerged culture, filamentous fungi show diverse macromorphology such as hyphal pellets and dispersed hyphae depending on culture conditions and genetic backgrounds of fungal strains. Although the macromorphology greatly affects the productivity of submerged cultures, the specific cellular components needed for hyphal aggregation have not been characterized. The fungal cell wall, a complex and highly dynamic structure, is composed mainly of polysaccharides. In *Aspergillus* species, these polysaccharides are mostly α -glucans (α -1,3-glucan (AG) with a small amount of α -1,4-glucan), β -glucans (β -1,3-glucan with 1,6-branches), chitin, and galactomannan. Some fungi have an extracellular matrix (ECM), which is composed of polysaccharides including galactosaminogalactan (GAG), and is associated with (or attached to) the major cell wall polysaccharides. Through functional analysis of AG synthase genes in *Aspergillus nidulans*, we found that the hyphae of an AG-deficient strain are dispersed under liquid culture conditions, whereas wild-type mycelia form pellets. *A. nidulans* has two AG synthase genes, *agsA* and *agsB*. To clarify the role of AG in hyphal aggregation, we constructed strains overexpressing *agsA* (*agsA^{OE}*) or *agsB* (*agsB^{OE}*), in which the other AG synthase gene was disrupted. Cell wall analysis of the two strains revealed that hyphal pellet formation depends on the molecular mass and spatial localization of AG as well as the amount of AG in the cell wall of *A. nidulans*. In addition, we discovered that the AG and the extracellular polysaccharide GAG contribute to hyphal aggregation in the industrial fungus *Aspergillus oryzae*, and that a strain deficient in both AG and GAG (AG-GAG Δ) shows dispersed hyphae in liquid culture. Under flask culture conditions, the productivity of a recombinant polyesterase, CutL1 was significantly higher in the AG-GAG Δ strain than in the wild type and AG-deficient (AG Δ) strains. Furthermore, computational fluid dynamics (CFD) simulation revealed that the AG-GAG Δ strain achieved markedly better mixing than the wild type strain in the whole space of 3L bioreactor, causing the higher productivity of enzyme by AG-GAG Δ strain. Through our study, we demonstrated the contribution of chemical properties of AG and GAG to hyphal aggregation. Since various filamentous fungi have AG synthase gene(s) and/or GAG biosynthetic genes, regulation of the biosynthesis of the two polysaccharides could be a potential way of controlling formation of hyphal pellets and thus can improve productivity of industrial fermentation using filamentous fungi.

Key words: Key words: fungi, hyphae, aggregation, α -1,3-glucan, galactosaminogalactan

E-mail: keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

共同研究者：宮澤 拳（東北大学大学院農学研究科）

吉見 啓（東北大学未来科学技術共同研究センター）

緒 言

糸状菌は様々な環境に適応し、多様な代謝能を有することから、酵素や化成品などの生産に利用されている種も多く存在する (Cairns *et al.*, 2019, Abe *et al.*, 2006, Papagianni, 2004). 糸状菌を用いた有用物質の工業生産は、栄養や誘導基質の拡散が容易な液体培養で行われることが一般的で、その生産スケールは数百 kL にも及ぶ。糸状菌は培養条件に依存してペレット状からパルプ状まで様々な形態を示すが (Veiter *et al.*, 2018), この性質が発酵生産効率の不安定要因となっている。しかしながら、糸状菌の形態を完全に制御する手法は確立されておらず、発酵産業における課題となっている。液体培養における糸状菌のペレット形成には細胞表層の因子が関与すると考えられるが、その要因については形態学的なアプローチがなされるにとどまっておらず、根本的なペレット形成の要因については明らかになっていなかった。

糸状菌の液体培養条件下の形態の違いは培養条件に強く依存しており、目的生産物の生産性と強い相関がある (Anteck *et al.*, 2016). ペレット形成時にはその直径が数 mm にもなり、ペレット内部への栄養や酸素供給が制限される (Anteck *et al.*, 2016). 酸素や栄養供給はペレット表面から約 200 μm までしか十分でないことも報告されている (Driouch *et al.*, 2012). 菌糸がペレットを形成する場合、培養液はニュートン性¹を示す (Krull *et al.*, 2013). 一方、菌糸が分散状態の場合には、培養液粘度が上昇し、攪拌効率が悪化する (Anteck *et al.*, 2016). 加えて、培養液が強い非ニュートン性²を示すため、対流酸素輸送が制限される (Anteck *et al.*, 2016). *Aspergillus* 属菌は通常、ペレット形態をとることが多い (Henry *et al.*, 2019, Jeennor *et al.*, 2019, Tokashiki *et al.*, 2019, Yoshimi *et al.*, 2013, Driouch *et al.*, 2012, Porcel *et al.*, 2005). *Trichoderma* 属菌はセルラーゼの生産に用いられる産業菌であるが、それらの菌糸は通常は分散状態をとる (Limón *et al.*, 2011, Ahamed & Vermette, 2009). *Penicillium* 属菌はペレットを形成する (Cronenberg *et al.*, 1994, Hotop *et al.*, 1993). クモノスカビ *Rhizopus oryzae* は通常分散形態をとるが、その場合の粘度上昇が顕著なため、ペレット形成条件が探索されている (Liu *et al.*, 2008, Liao *et al.*, 2007a, Liao *et al.*, 2007b, Zhou *et al.*, 2000). *Neurospora* 属菌の菌糸も一般的にはペレットを形成する (Nair *et al.*, 2016).

Takahashi & Yamada (1959) は、ペレットの形成過程は 2 通りあり、分生子が発芽前に凝集する“凝集型”と、個々の菌糸が独立して分岐生長を続けた結果ペレット状

になる“非凝集型”に分けられると報告した。この二つの型は培養条件にも影響されるが、主としてその菌株の特性によるものであると考えられており、*Aspergillus niger* は凝集型を、*Penicillium chrysogenum* は非凝集型をとると考えられている (Takahashi & Yamada, 1959). このモデルは近年でも支持されている (Veiter *et al.*, 2018, Zhang & Zhang, 2016). *A. niger* においては塊の形成が顕著であるが、本菌の産業的な重要性が高いことから、morphology engineering という学問分野としてその形態制御が議論されている。従来のペレット制御方法として、攪拌回転数や温度、pH、接種分生子数の制御によってその凝集性を制御することが試みられてきた (Bizukojc & Ledakowicz, 2010, Lopez *et al.*, 2005, Kelly *et al.*, 2004, Papagianni, 2004, Nielsen *et al.*, 1995, Nielsen & Krabben, 1995). 近年になって、“modern morphology engineering techniques”として、微粒子の添加によるペレットサイズの低減 (Gonciarz & Bizukojc, 2014, Driouch *et al.*, 2012, Driouch *et al.*, 2010) や、浸透圧によるペレット形態の制御手法 (Wucherpfennig *et al.*, 2011) とそれに伴う生産性改善が報告されている。これらの手法により、形態学的な観点からの菌糸ペレットの制御手法は大きく進歩してきたが、生物学的なペレット形成のメカニズムやその形成因子については依然不明のままであった。

菌糸のペレット形成には細胞表層の因子が関与することが推察される。糸状菌の菌糸の表面は多糖を主成分とした細胞壁に覆われている (Yoshimi *et al.*, 2016). 細胞壁は細胞形態の維持や細胞の保護、細胞外情報の細胞内への伝達など、生育に必須の役割を担っている。また、細胞壁は菌が外界 (宿主細胞、基質および菌自身の細胞) と最初に接触する構造体であることから (Yoshimi *et al.*, 2016), 細胞壁の構造を理解することは真菌に起因する感染症や発酵生産効率の制御に重要であると考えられる。細胞壁は多糖が複雑に絡み合った構造体でありながら、常に合成と再構築が繰り返される高度に動的な構造体でもある (Latgè & Beauvais, 2014). 細胞壁を構成する主要な多糖として、 α -グルカン (α -1,3-グルカン (AG) および少量の α -1,4-グルカン)、 β -グルカン (β -1,6 分岐 β -1,3-グルカン)、キチン、ガラクトマンナンが知られている (Yoshimi *et al.*, 2016, Beauvais *et al.*, 2014, Latgè, 2010). 細胞壁にはガラクトマンノプロテイン、GPI-アンカー型タンパク質、細胞壁タンパク質も含まれており、細胞外情報の伝達や細胞壁再構築における役割を有する (Gow *et al.*, 2017). 真菌の中には、細胞壁の外側に細胞外マトリクス (ECM) を有する種も存在する。ECM は多糖やタンパク質、脂質、核酸からなり、バイオフィルムの構成因子として知られている (Beauvais *et al.*, 2014). また、ECM は菌種によって非常に多様性が高い

¹ 流れの剪断応力とずり速度の関係が比例した粘性の性質を持つ流体。

² 流れの剪断応力とずり速度の関係が線形ではない粘性の性質を持つ流体。

(Latgè, 2010). *Aspergillus* 属糸状菌においては, ECMに含まれる多糖としてガラクトサミノガラクトン (GAG) や AG, ガラクトマンナンが知られている (Loussert *et al.*, 2010, Beauvais *et al.*, 2007).

筆者らは, *Aspergillus* 属を中心とした糸状菌のシグナル伝達系を攪乱する抗真菌剤の研究開発過程において, 糸状菌に特徴的な細胞壁多糖 AG を欠失した菌株が菌糸塊を形成せず, 菌糸が培地中に均一分散することを発見した (Yoshimi *et al.*, 2016). また, 産業菌である麹菌では, AGに加えて水溶性バイオフィルム構成多糖の GAG も菌糸塊形成に関与することを見出した (Miyazawa *et al.*, 2019). 本論文では, これらの多糖が菌糸接着因子として機能することを発見した経緯と, 菌糸接着因子を欠損した分散型菌株が高密度培養に好適であり, 工業培養の革新的技術につながる可能性について報告する.

実験方法

菌株, 培養条件, 遺伝学的実験

モデル糸状菌 *A. nidulans* の野生型株として ABPU1 株 (Motoyama *et al.*, 1996) を用いた. また, 産業用糸状菌 (麹菌) *A. oryzae* の野生型株として RIB40 系統の NS4 株 (*niaD*⁻, *sC*⁻) に非相同末端組換え修復遺伝子 *ligD* およびアデニン生合成遺伝子 *adeA* を破壊した ($\Delta ligD::sC$, $\Delta adeA::ptrA$) 株 (Mizutani *et al.*, 2008) を用いた. *A. nidulans* および *A. oryzae* の形質転換はプロトプラスト・PEG 法 (Gomi *et al.*, 1987) により行った. 本研究では, *A. nidulans* および *A. oryzae* の最少培地として Czapek-Dox (CD) 培地を使用した. *A. nidulans* では, 栄養要求性に応じてアルギニン (0.2g/L), ビオチン (0.02mg/L), ピリドキシン (0.5mg/L), ウリジン (1.22g/L), ウラシル (1.12g/L) を添加した. *A. oryzae* では, *niaD* の栄養要求性を持つ株の培養の際は 10×Stock Sol. の窒素源を 70mM 硝酸ナトリウムの代わりに 70mM L(+)-グルタミン酸ナトリウム 1水和物にした CD 培地 (CDE 培地) を用いた. また, *adeA* の栄養要求性を持つ株を培養する際は, 0.01% となるようにアデニンを添加した CDE 培地 (CDEA 培地) を用いた. また *A. oryzae* のペレット形成能評価などの表現型観察や酵素生産性評価には富栄養培地 YPD 培地を用いた (Miyazawa *et al.*, 2016). 平均ペレット直径は, 無作為に選んだ 10 個の菌糸塊を実体顕微鏡 M125 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で観察して測定した. *Escherichia coli* の培養には LB 培地を用い, 抗生物質として適宜アンピシリンやカナマイシンを添加した. 上記培地を寒天平板培地として使用する場合には終濃度 1.5% (w/v) となるよう寒天を加えた. *A. nidulans* の寒天平板培養および液体振盪培養は通常は

37°C で行い, *A. oryzae* では 30°C で培養を行った.

A. nidulans における α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsA* および *agsB* 単独高発現株の作製

A. nidulans は 2 種の AG の合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB* を有しており通常の栄養生長では *agsB* のみが発現している. 両遺伝子の機能解析を目的に *agsA* 単独高発現株 (*agsA*^{OE} 株) および *agsB* 単独高発現株 (*agsB*^{OE} 株) を作製した. *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株は, 各々の遺伝子の内在性プロモータを, 構成的に高発現する *tef1* プロモータにそれぞれ置換することにより作製した. *agsA*^{OE} 株の取得のため, プラスミド pAPyT-*agsA* を作製した. *agsA* の 5' 非翻訳領域 (amplicon 1) および翻訳領域の一部 (amplicon 2) を *A. nidulans* ABPU1 のゲノム DNA を鋳型として増幅した. また, *pyroA* マーカー (amplicon 3) をプラスミド pUCpyroA (Yoshimi *et al.*, 2013) を鋳型として増幅した. *tef1* プロモータ (amplicon 4) は *A. nidulans* のゲノム DNA を鋳型として増幅した. これら 4 断片と *Bam*HI で線状化した pUC19 を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いて連結した. 得られたプラスミドは *Not*I で処理し, $\Delta agsB$ 株の形質転換に用いた.

agsB^{OE} 株の取得のため, プラスミド pAPyT-*agsB* を作製した. *agsB* の 5' 非翻訳領域 (amplicon 1) および翻訳領域の一部 (amplicon 2) を *A. nidulans* ABPU1 のゲノム DNA を鋳型として増幅した. また, *pyroA* マーカー (amplicon 3) をプラスミド pUCpyroA (Yoshimi *et al.*, 2013) を鋳型として増幅した. *tef1* プロモータ (amplicon 4) は *A. nidulans* のゲノム DNA を鋳型として増幅した. これら 4 断片と *Bam*HI で線状化した pUC19 を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いて連結した. 得られたプラスミドは *Not*I で処理し, $\Delta agsA$ 株の形質転換に用いた. *agsA* および *agsB* 高発現株は *pyroA* の要求性により選抜した. 両高発現コンストラクトの正しい導入はサザンブロット解析により確認した.

アルギニン要求性を持つ株に対しては, *Bam*HI で処理した pA-AoargB を形質転換することによりその要求性を回復させた. pA-AoargB は以下の手順で作製した. *A. nidulans* の *argB* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (amplicon 1) および 3' 非翻訳領域 (amplicon 2) をそれぞれ *A. nidulans* ABPU1 のゲノム DNA を鋳型として増幅した. また, *A. oryzae* の *argB* マーカー (amplicon 3) を *A. oryzae* のゲノム DNA を鋳型として増幅した. これら 3 断片と *Bam*HI で線状化した pUC19 を In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories) を用いて連結した. 得られたプラスミドは *Not*I で処理し, アルギニン要求性株の形質転換に用いた. *A. oryzae* *argB* マーカーの置換は PCR により確認した. 一部の例外を除くすべての *ligD* 遺伝子

破壊株は、*NotI* 処理したプラスミド pAP-CligD を形質転換して *ligD* 遺伝子を相補させた。

A. nidulans の細胞内アミラーゼ遺伝子 *amyG* 破壊株 ($\Delta amyG$) の作製

amyG 遺伝子の 5' 非翻訳領域 (amplicon 1) および翻訳領域 (amplicon 2) を *A. nidulans* のゲノム DNA を鋳型として、*pyrG* マーカー (amplicon 3) を *A. oryzae* のゲノム DNA を鋳型としてそれぞれ増幅した。得られた 3 断片はゲル抽出し、2 次目の PCR の鋳型として用い、3 断片を融合した。得られた PCR 産物はゲル抽出し、ABPU1 ($\Delta ligD$) 株の形質転換に用いた。*amyG* 遺伝子の置換は PCR により確認した。

A. oryzae における GAG 合成酵素遺伝子の破壊株の作製

A. oryzae の GAG 合成酵素遺伝子クラスターのうち *ugeZ* と *sphZ* 遺伝子を以下の方法で同時に破壊した (Miyazawa *et al.*, 2019)。*ugeZ* 遺伝子および *sphZ* 遺伝子の 3' 非翻訳領域 (それぞれ amplicon 1, 2) および *adeA* 遺伝子 (amplicon 3) を PCR により増幅した。PCR の鋳型として amplicon 1, 2 では *A. oryzae* ゲノム DNA を、amplicon 3 では TOPO-2.1-*adeA* プラスミドを用いた。各 PCR 産物はゲル抽出して 2 次目の PCR の鋳型として用いて 3 断片を融合した。目的の PCR 産物はゲル抽出し、*A. oryzae* の野生型株および AG Δ 株 (*agsA*, *agsB*, *agsC* の三重破壊株) の形質転換に用いた (Miyazawa *et al.*, 2016)。*sphZ* および *ugeZ* 遺伝子の破壊はサザンブロット解析により確認した。

細胞壁からの多糖の分画

CD 培地で 24 時間培養した菌糸を Miracloth (Merck Milipore, Darmstadt, Germany) でろ過回収し、純水で洗浄後、凍結乾燥した。凍結乾燥菌体をボールミルで粉碎後、熱水抽出、アルカリ抽出を行って、水溶性画分、アルカリ (2M NaOH) 可溶性画分 (AS)、アルカリ不溶性画分 (AI) に分画した (Yoshimi *et al.*, 2013)。AS 画分は、アルカリ中和時に可溶性の AS1 画分と不溶性の AS2 画分に分けられる。各画分は粗精製であり、多糖とそれ以外の物質も含んでいる。例えば AS2 画分は 35% (重量) が多糖 (主に α -1,3-グルカン)、40% が脂質、25% は夾雑物である。菌糸を事前にクロロホルム:メタノール (1:1) で脱脂した場合は、多糖の重量% が 70% に改善されるので、必要に応じて脱脂を実施した。

各画分の単糖成分は以下の方法で定量した (Yoshimi *et al.*, 2013)。各画分 10mg を 200 μ L の 12.5M 硫酸に懸濁し、4 $^{\circ}$ C、16 時間 インキュベートした。その後、4.8mL の水を懸濁液に加え、100 $^{\circ}$ C、12h 加熱し加水分解した (硫

酸の終濃度 0.5M)。加水分解反応後の溶液に炭酸バリウムを加えて中和し、8,000 \times g、10 分間遠心分離し、上清を取得した。加水分解物の上清の構成単糖は High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) 法により検出し定量した。分析カラムとして CarboPac PA1 (4mm x 250cm) に CarboPacPA1 guard カラムを付けて使用した (カラム温度 35 $^{\circ}$ C)。18mM NaOH を溶離液として流速 1mL/min で分析を行った。単糖成分の標準糖としてグルコース、ガラクトース、グルコサミン、ガラクトサミンおよびマンノースを用いた。

α -1,3-グルカン平均分子量の測定 (HPSEC 法)

AS2 画分に含まれる主要多糖 AG の分子量は、分子篩カラム Sugar KS-805 (8.0cm x 300mm; Showa Denko Co. Ltd., Tokyo, Japan) および Sugar KS-G68 6B ガードカラム (Showa Denko) を用い、1M NaOH を移動相として Dionex ICS-5000 の耐アルカリポンプにより流速 1mL/min で分析を行った (Miyazawa *et al.*, 2018)。検出は示唆屈折計で行った。AS2 画分 10mg を 1M NaOH 溶解し、分析を行った。分子量は、デキストランをスタンダードとして算出した。

ガラクトサミノガラクトタンの部分精製

麹菌 *A. oryzae* AG Δ 株もしくは AG Δ 株に対して GAG 生合成遺伝子を破壊した AG-GAG Δ 株 (mock) の分生子を終濃度 1.0×10^6 個となるよう 1L の改変 Brian 培地 (Fontaine *et al.*, 2011) 3 本 (計 3L) に接種し、30 $^{\circ}$ C、160rpm、72 時間振盪培養した。培養液を Miracloth でろ過し、菌糸を除去し、上清を取得した。培養上清はガラスフィルターで再度ろ過し、3 本の培養液を合わせて、1L までロータリーエバポレータを用いて濃縮した。濃縮した培養液は 4 $^{\circ}$ C で水に対して透析し、再度 1L となるようエバポレータで濃縮した。次に、20g の水酸化ナトリウムを加え (終濃度 0.5M)、4 $^{\circ}$ C で攪拌した。この溶液を 3,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、残渣を回収した (0 倍量エタノール画分)。上清には 0.5L のエタノールを加え、4 $^{\circ}$ C で 5 時間攪拌しながら保持した。この溶液を 3,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、残渣を回収した (0.5 倍量エタノール画分)。この操作を繰り返し、1, 1.5, 2, 2.5 倍量エタノール画分をそれぞれ取得した。各画分とも 3M 塩酸で中和し、水に対して透析し、凍結乾燥した。各画分に含まれる単糖成分は細胞壁からの多糖の分画で得られた画分と同様に定量した。分生子凝集性の評価には、2mg の AG Δ 株由来各エタノール画分または AG-GAG Δ 株由来 1.5 倍量エタノール画分を 1mL の 0.1M 塩酸に溶解し、10 分間 vortex したものをを用いた。

Smith 分解による α -1,3-グルカン糖鎖ユニットの決定

AS2 画分 (20mg) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH3.9) 10mL に溶解し、終濃度 30mM になるように過ヨウ素酸ナトリウムを添加した。その混合液を 4℃ で暗所 72 時間攪拌しながら保持した後、エチレングリコール 0.1mL を加えて、過剰な過ヨウ素酸ナトリウムを除去した。その試料を透析した後、 NaBH_4 (30mg) を加えて 3 時間室温で保持した。その試料を 10% (v/v) 酢酸で中和後、透析した。氷酢酸を終濃度 0.5M になるように添加して 24 時間室温で保持した。その試料を凍結乾燥し、少量の 1M NaOH に溶解後、前述の HPSEC 法で分子量を分析した。Smith 分解前の分子量と分解後の分子量を比較し、構成単位の分子量を決定した (Miyazawa *et al.*, 2018)。

菌糸細胞壁多糖の蛍光標識による解析

菌糸細胞壁多糖の蛍光染色は、Miyazawa *et al.*, (2018) の方法に従った。菌糸をスライドガラスの上に置き 55℃ で 15 分間乾燥させた。次いで 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) で 2 回洗浄した後、4% のパラホルムアルデヒドで固定した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AG 分解酵素の α -1,3-グルカン結合ドメインと GFP の融合体 (AGBD-GFP) で菌糸細胞壁の AG を染色した。 β -1,3-グルカンは 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 β -1,3-グルカンモノクローナル抗体で染色した。キチンは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Alexa Fluor 350 結合小麦胚芽レクチンで染色した。GAG は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Alexa Fluor 647-conjugated soybean agglutinin (SBA-Alexa Fluor 647; Invitrogen) で染色した (Miyazawa *et al.*, 2019)。菌糸の AG 分解酵素処理には、*Bacillus circulans* KA-304 の α -1,3-グルカナーゼ (Yano *et al.*, 2006) を使用し、 β -1,3-グルカン分解では *A. niger* 由来の β -1,3-グルカナーゼ (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いた。

菌糸の凝集アッセイ

GAG 存在下の菌糸の凝集性評価は以下の方法で行った。AG-GAG Δ 株の分生子を $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ となるよう 50mL の YPD 培地に接種し、120rpm, 30℃, 9 時間振盪培養した。培養液は Miracloth を用いてろ過し、菌糸細胞を水で 2 回洗浄した。湿重 500mg の菌糸細胞を 10mL のリン酸緩衝生理食塩水 (10mM リン酸ナトリウム, 137mM NaCl, pH7.4) に懸濁し、これを菌糸懸濁液として凝集性評価に用いた。400 μL の水, 50 μL の 1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0), 25 μL の菌糸懸濁液および 25 μL のエタノール画分を含む溶液を混合した。混合液はプレートミキサーを用いて 1,200rpm, 30℃, 1 時間攪拌し、実体顕微鏡を用いて凝集体の形成を観察した。

GAG 存在下における菌糸の凝集に対する pH の影響の評価は、25 μL の菌糸懸濁液を 450 μL の各種緩衝液 (終

濃度 100mM; pH4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) および 25 μL の 1.5 倍量エタノール画分と混合した溶液を 1 時間攪拌し、実体顕微鏡で観察することにより行った。用いた緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0-5.0), リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0-7.0), トリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH8.0) である。

水素結合形成の阻害による凝集への影響の評価は、25 μL の菌糸懸濁液を 450 μL のリン酸ナトリウム緩衝液 (終濃度 100mM), 0, 1, 2, 4 または 8M 尿素および 25 μL の 1.5 倍量エタノール画分と混合した溶液を 1 時間攪拌し、実体顕微鏡で観察することにより行った。

GAG のガラクトサミン残基のアセチル化

5mg の 1.5 倍量エタノール画分 (GAG 濃縮画分) を 800 μL の水冷 0.5M NaOH に溶解し、水冷 2M HCl で中和することにより GAG を溶解した。この溶液に 4mL の 50mM 酢酸ナトリウムを加え混合した。次に、4mL のメタノールと 10mg の無水酢酸を加え、室温で 24 時間攪拌しながら保持しアセチル化反応を行った。反応の後のサンプルは水に対して透析し、凍結乾燥した。この反応をもう一度繰り返し、計 2 回のアセチル化反応を実施した。

コロイド滴定による GAG のアセチル化度 (DD) の決定

GAG の DD はキトサンの DD の測定方法であるコロイド滴定法により決定した (Hattori *et al.*, 2009, Terayama, 1952)。凍結乾燥した 5mg の GAG を 0.1M 塩酸に溶解し、0.1M 塩酸を用いて 1g とした。30mL の水を GAG を含む溶液に加え、300mL の三角フラスコに移してスターラで攪拌しながら、滴定の指示薬として 0.1% (w/v) トルイジンを数滴溶液に滴下した。次に、GAG を含む溶液に対し、N/400 ポリビニル硫酸カリウム (PVSK; Fujifilm Wako, Osaka, Japan) をビュレットを用いてスターラで攪拌しながら滴下した。溶液の色が青色から桃色に変化する点を滴定の終点とした。

GAG の *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の DD は下記の式から求めた。1.5 倍量エタノール画分中の GAG 以外の成分を考慮するため、AG-GAG Δ 株の 1.5 倍量エタノール画分の滴定量を各サンプルの滴定量から引いた。1.5 倍量エタノール画分に含まれる総ヘキソサミン量は改変 Blix 法 (Johnson, 1971) により求めた。すなわち、1.5 倍量エタノール画分を 8M 塩酸に懸濁し、100℃, 4 時間加熱し加水分解した。次に、加水分解した溶液をねじ付ガラス試験管中で総量 1mL となるよう水で希釈した。この時、塩酸濃度が 0.2M 以下となるよう留意した。この溶液に 1mL のアセチルアセトン試薬 (4% アセチルアセトン in 1.5N 炭酸ナトリウム) を加えて混合し、沸騰水浴中で 30 分間反応させアセチル化した。室温で放冷し、5mL のエタノールを添加

し混合した。これに1mLのEhrlich試薬(2.67% (w/v) *p*-dimethylaminobenzaldehyde in 95% ethanol : conc. HCl (1:1) solution)を加えて混合し、室温で25分間放置し発色させた。この溶液の A_{528} を測定し、ガラクトサミンの標準曲線からサンプル中の総ヘキサミン量を算出した。

$$DD(\%) = \frac{\frac{X}{161}}{\frac{X}{161} + \frac{Y}{203}} \times 100$$

$$X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1000} \times f \times 161 \times v$$

$$Y = a \times b - X$$

where:

a, sample (g); *b*, ratio of total hexosamine in 1.5-vol. EtOH fraction from AG Δ ; *v*, titer of N/400 PVSK solution (mL); *f*, factor of N/400 PVSK solution

モデル酵素クチナーゼ CutL1 分泌生産量の評価

クチナーゼ高発現株 AG-GAG Δ -cutL1 株はプラスミド pNGA-gla-Cut (Maeda *et al.*, 2005) を用いて以前と同様の方法で作製した (Miyazawa *et al.*, 2016)。cutL1 高発現コンストラクトの *niaD* 遺伝子座への1コピーでの挿入をサザンブロット解析により確認した。酵素生産性は以下の方法で評価した。WT-cutL1, AG Δ -cutL1, AG-GAG Δ -cutL1 の各株の分生子を 1.0×10^4 /mL となるようそれぞれ50mLのYPM液体培地に接種し、30°C, 100rpm, 24時間回転振盪培養した。培養液はMiraclothでろ過した。菌糸細胞は水で洗浄し70°C, 24時間乾燥後に重量を測定した。400 μ Lの培養上清に200 μ Lの100% (w/v) のトリクロロ酢酸を加え、培養上清中に含まれるタンパク質を沈殿させ、SDS-PAGEによりタンパク質を分離させ、CBB染色した。染色されたタンパク質のバンドのうちクチナーゼ CutL1 のバンドをImageJを用いて定量した。CutL1量は精製 CutL1 を用いて作成した標準曲線から算出した。

菌糸分散麹菌 *A. oryzae* AG-GAG Δ 株と野生株の培養液の流体特性解析

佐竹化学機械工業(株)製3L容ジャー型発酵槽に1.5Lの培地を仕込み、30°C, 660rpm, 60時間培養を行った。佐竹化学機械工業(株)に依頼して、解析ソフトウェア Fluent (Ansys, Canonsburg, PA, USA) を用いて、乱流モデルに Realizable *k-e* (Shih *et al.*, 1995) を適用して computational fluid dynamics (CFD) シミュレーション解析を行った。

結 果

モデル糸状菌 *A. nidulans* *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株の表現型 *A. nidulans* の *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株は、 Δ *agsB* 株

に対して *agsA* 高発現カセットを、 Δ *agsA* 株に対して *agsB* 高発現カセットをそれぞれ導入することにより作製した。まず、*agsA*^{OE} 株の *agsA* 遺伝子の発現量を解析したところ、野生型株や Δ *agsB* 株に比べて顕著に増加した ($P < 0.05$; Fig. 1A)。また、*agsB*^{OE} 株の *agsB* の発現量は野生型株や Δ *agsA* 株に比べて顕著に増加した ($P < 0.05$; Fig. 1B)。このことから、それぞれの高発現株において *agsA* または *agsB* の発現上昇が認められることが示された。

CD寒天平板培地上で4日間培養させたコロニーの生育は各株の間で顕著な差異は認められなかった。CD液体培地を用いた液体振盪培養においては、先行研究と一致して (Yoshimi *et al.*, 2013)、野生型株や Δ *agsA* 株は緊密な菌糸塊を形成したのに対し、 Δ *agsB* では菌糸が分散した (Fig. 1C)。*agsA*^{OE} 株において Δ *agsB* 株の菌糸分散性は回復し、菌糸密度の低い菌糸の塊を形成した (Fig. 1C)。*agsB*^{OE} 株は野生型株と類似した緊密な菌糸の塊を形成しながら生育した (Fig. 1C)。以上のことから、*agsA*^{OE} 株と *agsB*^{OE} 株の間の凝集性の違いが *AggA* と *AggB* により合成される多糖の化学構造の違いに起因する可能性が示唆された。

A. *nidulans* *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株のアルカリ可溶性グルカンは α -1,3-グルカン (AG) である

agsA^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株の細胞壁成分を解析するために、熱水アルカリ抽出法によって細胞壁成分を分画した。先行研究からアルカリ可溶性画分で中和後水不溶性の AS2 画分に AG が含まれることが知られている (Yoshimi *et al.*, 2013)。AS2 画分は主にグルコースと少量のマンノースを含んでいたが、 Δ *agsA* Δ *agsB* 株においてはほとんどグルコースを含まなかった (Fig. 2A)。*agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株の総画分重量に対する AS2 画分中のグルコース量はそれぞれ 18.9% および 18.2% で、野生株 (6.6%) の約3倍であった。AI 画分には各株ともそれぞれ 10% のグルコサミンとグルコースおよび 1-2% のマンノースが含まれていた (Fig. 2B)。以上をまとめると、*agsA*^{OE} 株、*agsB*^{OE} 株とも細胞壁中のアルカリ可溶性グルカンの量が野生型株に比べて増加することが示された。

野生型株の AS2 画分およびポジティブコントロールとして用いたムタンをそれぞれ α -1,3-グルカナーゼで処理したところ糖の遊離が検出された。一方、 Δ *agsA* Δ *agsB* 株の AS2 画分およびネガティブコントロールとして用いたカードランからはほとんど糖の遊離は認められなかった (Miyazawa *et al.*, 2018)。*agsA*^{OE} 株と *agsB*^{OE} 株の AS2 画分からは共に、野生株やムタンの場合と同様に糖の遊離が認められた (Miyazawa *et al.*, 2018)。

¹³C NMR 解析により、野生株の AS2 画分と *Streptococcus salivarius* 由来の糖転移酵素 GTF-J により酵素合成され

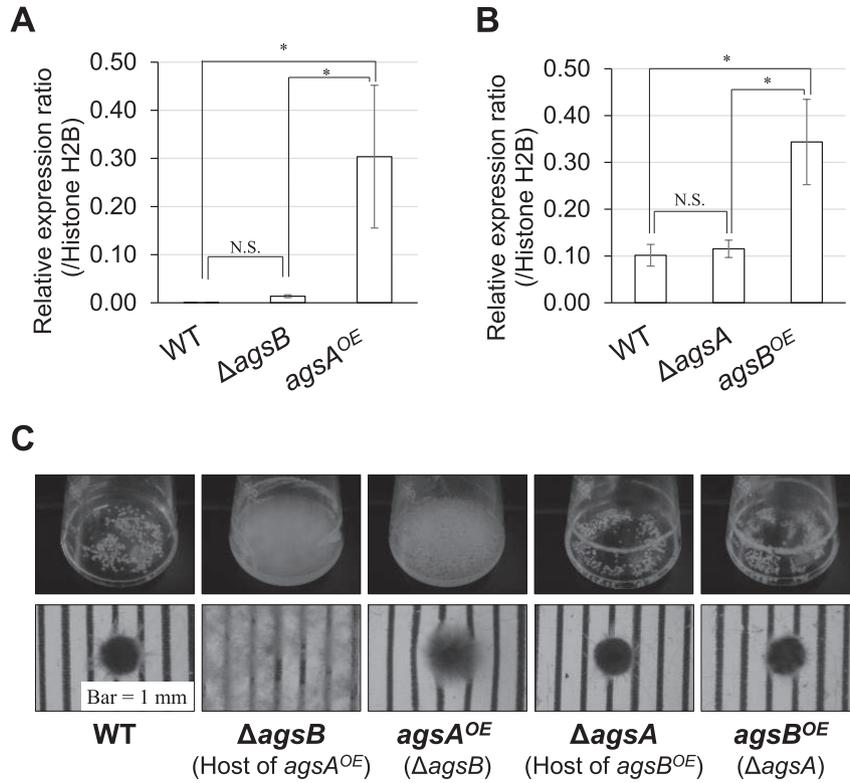


Fig. 1 Characterization of the *agsA*^{OE} and *agsB*^{OE} strains in liquid culture. Conidia (final concentration, 5×10^5 /mL) of the wild-type, *agsA*^{OE}, *agsB*^{OE}, $\Delta agsA$, and $\Delta agsB$ strains were inoculated into CD liquid medium and rotated at 160rpm at 37 °C for 24 h. (A, B) Transcript levels of the (A) *agsA* and (B) *agsB* genes were determined by quantitative PCR on total RNA. Error bars represent the standard deviation of the mean calculated from three replicates. Asterisks denote significant differences based on Tukey's test ($*P < 0.05$). (C) Growth of the wild-type, $\Delta agsB$, *agsA*^{OE}, $\Delta agsA$, *agsB*^{OE} strains. Upper row, photographs of cultures in Erlenmeyer flasks; lower row, representative hyphal pellets of each strain under a stereomicroscope. Scale intervals are 1 mm. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

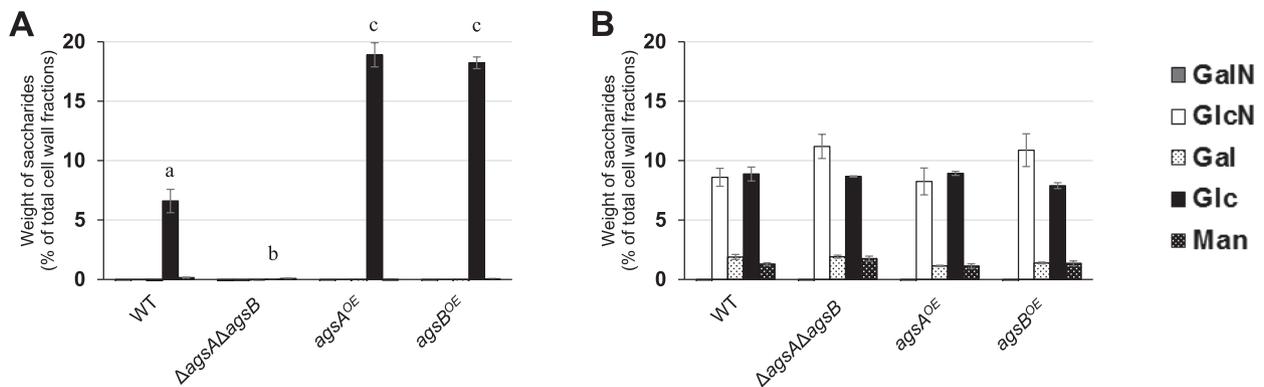


Fig. 2 Monosaccharide composition of cell wall fractions from the wild-type (WT), $\Delta agsA \Delta agsB$, *agsA*^{OE}, and *agsB*^{OE} strains. The strains were cultured in CD medium (160rpm, 37 °C, 24 h). (A) Alkali-soluble, insoluble in water at neutral pH fraction (AS2). (B) Alkali-insoluble (AI) fraction. Error bars represent the standard error of the mean calculated from three replicates. Different letters denote significant differences based on Tukey's test ($P < 0.05$). GalN, galactosamine; GlcN, glucosamine; Gal, galactose; Glc, glucose; Man, mannose. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

たムタンでは典型的なAGのシグナルが検出された。*agsA^{OE}*株と*agsB^{OE}*株のAS2画分からは共に、ムタンと同一の化学シフトにシグナルが検出された(Miyazawa *et al.*, 2018).

次に、多糖のメチル化分析を行い、AS2画分中の多糖の結合様式を決定した(Miyazawa *et al.*, 2018)。野生型株のAS2画分には主に1,3-グルコシド結合を示す2,4,6-tri-*O*-methyl(Me)-glucose (Glc) (1,3,5-triacetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-D-glucitol)が含まれていた。また、少量の2,3,4,6-tetra-*O*-Me-Glc (非還元末端), 3,4,6-tri-*O*-Me-Glc (1,2-グルコシド結合), 2,4-di-*O*-Me-Glc (3,6-分岐)も検出された。1,4-グルコシド結合(2,3,6-tri-*O*-Me-Glc)はAG鎖のプライマーまたはスパーサー分子由来と考えられる。1,2-グルコシド結合はガラクトマンナンに由来すると考えられる。3,6-分岐はAS2画分に混入する β -1,3/1,6-グルカンに由来すると考えられる。野生型株のAS2画分と同様に、*agsA^{OE}*株と*agsB^{OE}*株の

AS2画分からはいずれも同じメチル化糖誘導体が検出された。以上の三つの解析から、野生型株、*agsA^{OE}*株および*agsB^{OE}*株のAS2画分は主にAGから構成されていることが明らかになった(Miyazawa *et al.*, 2018)。

A. *nidulans*の細胞壁AS2画分のアルカリ可溶性グルカンの平均分子量

糸状菌のアルカリ可溶性グルカンの分子量は約1,000,000であることが推定されており(Choma *et al.*, 2013)。その大きさから正確な分子量の推定が難しいとされてきた。本研究では、HPSECを用いてアルカリ可溶性グルカンの分子量の効率的な評価方法を確立した。分子量標準として用いたデキストランは、溶出量が大きくなるとその分子量が小さくなり、70,000-2,160,000の間で対数近似しその分子量を見積もった。*agsA^{OE}*株のアルカリ可溶性グルカンのピークは*agsB^{OE}*に比べて小さい溶出量に検出された(Fig.3A)。*agsA^{OE}*株のアルカリ

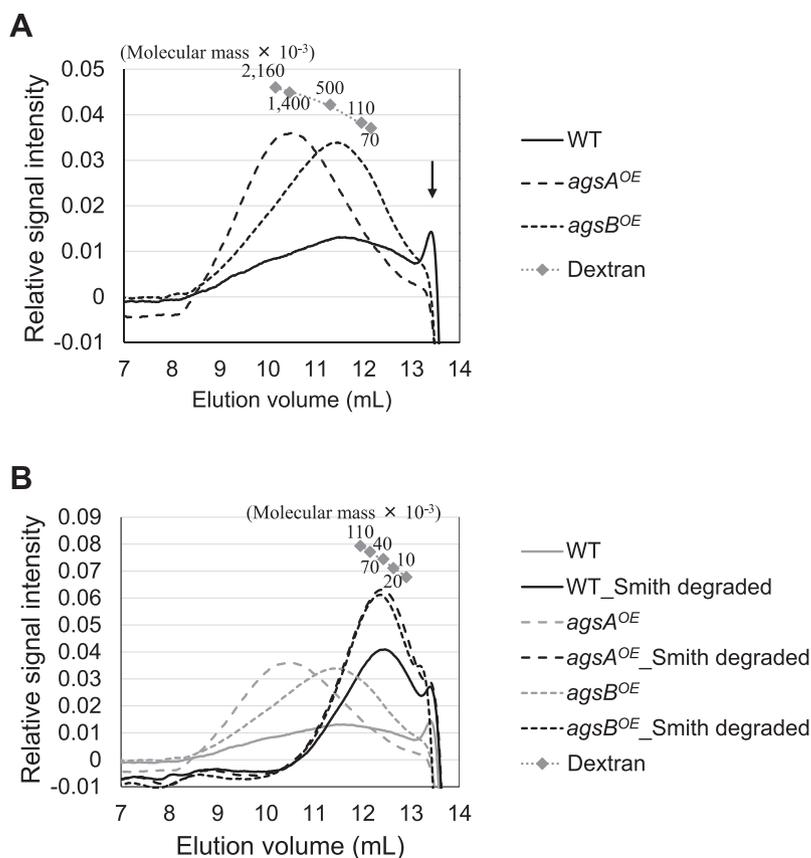


Fig. 3 High-performance size-exclusion chromatography elution profiles of (A) AS2 fractions and (B) Smith-degraded AS2 fractions from the wild-type, *agsA^{OE}*, and *agsB^{OE}* strains. The AS2 fraction (10mg) from each strain was dissolved in 1 M NaOH/H₂O. Glucan elution was monitored as refractive index. Molecular masses of the glucan peaks were determined from a calibration curve of dextran standards. Elution profiles shown in gray in (B) are the same as in (A). The results of a representative of three experiments are shown. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

可溶性グルカンのピークトップ分子量 (M_p) は $1,480,000 \pm 80,000$ で, $agsB^{OE}$ 株 ($372,000 \pm 47,000$) の約 4 倍であった ($P < 0.01$; Table 1). 野生型株のアルカリ可溶性グルカンの M_p は $agsB^{OE}$ 株よりも小さかった ($P < 0.05$; Table 1). 野生型株のアルカリ可溶性グルカンの量は $agsB^{OE}$ 株よりも少なかったことから, 野生型株のアルカリ可溶性グルカンが分解に対して感受性が高い可能性が考えられる. これらの分子量は平均糖鎖重合度 (DP) として $9,160 \pm 520$ ($agsA^{OE}$), $2,230 \pm 290$ ($agsB^{OE}$), 908 ± 319 (wild-type) に相当する (Table 1). 野生型株においては, 13.5 mL 付近にも大きなピークが検出されたが, これは分解されたアルカリ可溶性グルカンに由来すると考えられる (Fig. 3A). すなわち, $agsA^{OE}$ 株および $agsB^{OE}$ 株の間のアルカリ可溶性グルカンの分子量の違いが菌糸凝集性の違いの主要な要因であることが示唆された.

$agsA^{OE}$ 株および $agsB^{OE}$ 株のアルカリ可溶性グルカンの間で, AG サブユニットの化学構造が異なる可能性が考えられた. そこで, AS2 画分に対して糖鎖中の 1,4-結合を選択的に加水分解する Smith 分解を行い, HPSEC による分子量計測を行った. $agsA^{OE}$ 株, $agsB^{OE}$ 株とも, Smith 分解によりピークが非分解時よりも大きな溶出時間に検出された (Fig. 3B). Smith 分解したアルカリ可溶性グルカンの分子量は 10,000–110,000 のデキストランのピーク保持時間から作成した標準曲線から求めた. その結果, Smith 分解により, $agsA^{OE}$ 株では 41,600, $agsB^{OE}$ 株では 38,300, 野生型株では 31,600 の M_p を示した (Table 1). これらの M_p はそれぞれ, DP として 257 ± 36 ($agsA^{OE}$), 237 ± 19 ($agsB^{OE}$), 195 ± 23 (野生型) に

相当する (Table 1). $agsA^{OE}$ 株と $agsB^{OE}$ 株の間で Smith 分解したアルカリ可溶性グルカンの分子量に顕著な差異は認められなかった.

糸状菌 *A. nidulans* の細胞壁の蛍光染色による α -1,3-グルカン (AG) の局在の解析

上述のように, $agsA^{OE}$ 株と $agsB^{OE}$ 株の液体振盪培養における表現型がアルカリ可溶性グルカンの分子量と関係していることが示唆された. 一方, AG の分子量の違いにより, 両高発現株の間で細胞壁中の AG の空間分布に違いが生じ, それが菌糸の凝集性の違いに寄与した可能性も考えられた. そこで, この仮説を検証するために, 野生株, $agsA^{OE}$, $agsB^{OE}$ 株の AG, β -1,3-グルカンおよびキチンを蛍光標識し観察した. 野生型株においては, AG が細胞の輪郭に沿って強く蛍光標識された一方, β -1,3-グルカンやキチンは弱く標識されたのみであった (Fig. 4). $\Delta agsA \Delta agsB$ 株においては, β -1,3-グルカンやキチンが強く蛍光標識された (Fig. 4). $agsB^{OE}$ 株においては AG が強く蛍光標識された一方, $agsA^{OE}$ 株の AG は弱く標識されたのみであった (Fig. 4). また, β -1,3-グルカンやキチンは $agsA^{OE}$ 株において明瞭に蛍光標識された一方, $agsB^{OE}$ 株ではほとんど標識されなかった (Fig. 4). これらのことは, 野生型株や $agsB^{OE}$ 株の AG は細胞壁の最外層に局在している一方, $agsA^{OE}$ 株の AG が β -1,3-グルカンやキチンに覆われている可能性を示唆している.

上述の結果をさらに検証するため, $agsA^{OE}$ 株および $agsB^{OE}$ 株の菌糸を α -1,3-グルカナーゼまたは β -1,3-グル

TABLE 1. Molecular mass and degree of polymerization of alkali-soluble glucans from α -1,3-glucan synthase-overexpressing strains

Sample	M_p^a	DP ^b
WT AS2 ^c	$147,000 \pm 52,000$	908 ± 319
WT AS2, Smith-degraded	$31,600 \pm 3,700$	195 ± 23
$agsA^{OE}$ AS2	$1,480,000 \pm 80,000$	$9,160 \pm 520$
$agsA^{OE}$ AS2, Smith-degraded	$41,600 \pm 5,800$	257 ± 36
$agsB^{OE}$ AS2	$372,000 \pm 47,000$	$2,230 \pm 290$
$agsB^{OE}$ AS2, Smith-degraded	$38,300 \pm 3,000$	237 ± 19

^a Molecular mass of the peak.

^b Degree of polymerization.

^c AS2, insoluble components after dialysis of the alkali-soluble fraction. Values represent the mean \pm standard deviation of three replicates.

(Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

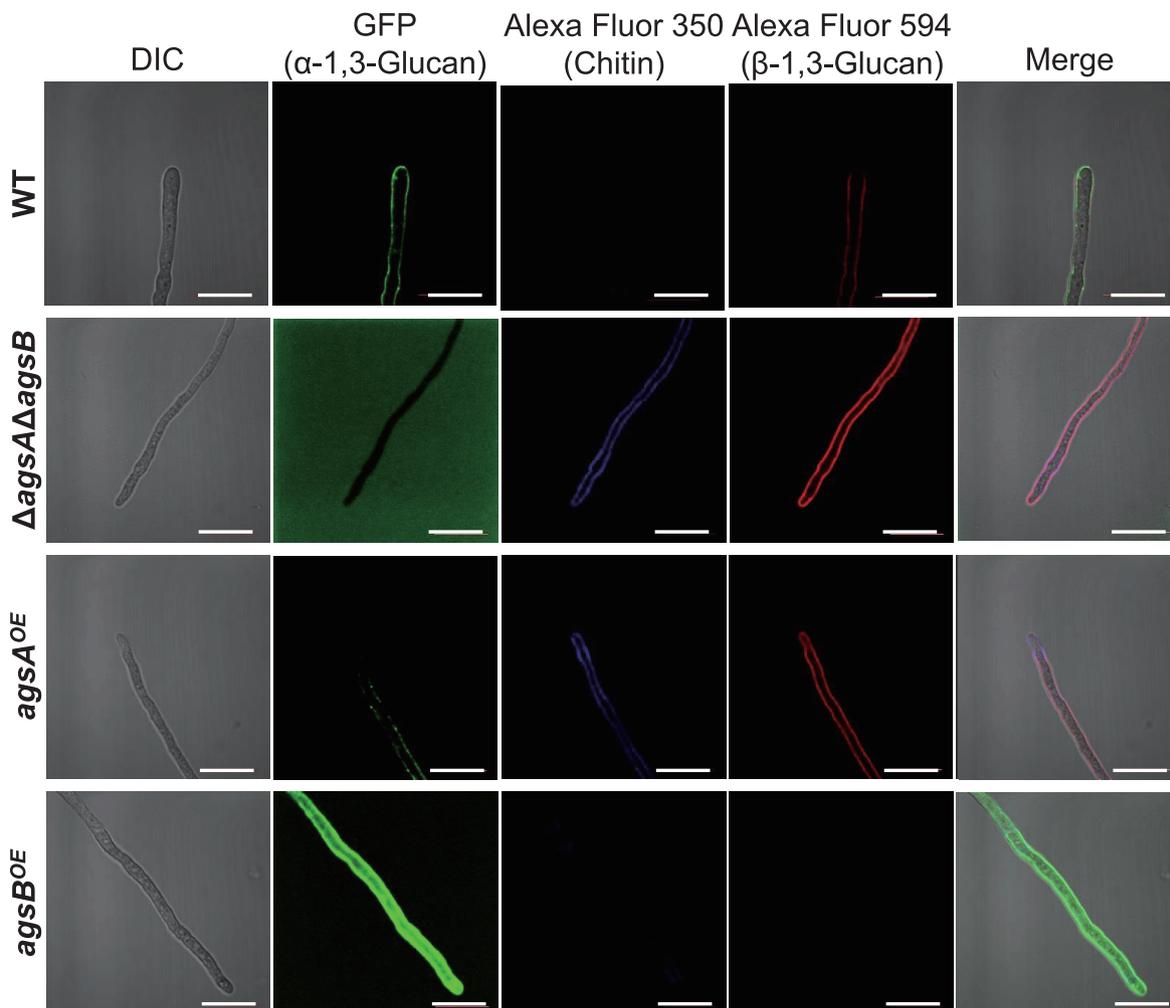


Fig. 4 Localization of cell wall polysaccharides of vegetative hyphae. Hyphae cultured in CD liquid medium for 12 h were fixed and stained with AGBD-GFP for α -1,3-glucan, fluorophore-labeled antibody for β -1,3-glucan, and fluorophore-labeled lectin for chitin. Scale bars are 10 μ m. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

カーナーゼで処理した後、蛍光標識して細胞壁成分を観察した。 α -1,3-グルカナーゼで処理した *agsA*^{OE} 株や β -1,3-グルカナーゼで処理した *agsB*^{OE} 株 (Fig. 5) では、酵素処理していない場合 (Fig. 4) と類似の結果であった。 β -1,3-グルカナーゼで処理した *agsA*^{OE} 株では、AG が細胞の外周およびドット状に蛍光標識され、 β -1,3-グルカンやキチンについても標識された (Fig. 5)。 α -1,3-グルカナーゼ処理した *agsB*^{OE} 株 (Fig. 5) では、AG の蛍光は酵素非処理時 (Fig. 4) と比べて弱くなった。それに対し、*agsB*^{OE} 株の菌糸の α -1,3-グルカナーゼ処理時 (Fig. 5) の β -1,3-グルカンの蛍光は、酵素非処理時 (Fig. 4) と比べて増大した。以上のことから、*agsB*^{OE} 株の AG はほとんど細胞壁の外層に局在している一方、

agsA^{OE} 株では β -1,3-グルカンに被覆されていることが示唆された。

麹菌 *A. oryzae* GAG 生合成遺伝子破壊株の液体振盪培養における表現型

これまでの解析から *A. nidulans* においては AG が菌糸接着因子であることが明らかとなっている (Yoshimi *et al.*, 2013)。一方、麹菌 *A. oryzae* において 3 種存在する AG 合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*, *agsC*) 全てを破壊した AG Δ 株の菌糸は野生型株よりも小さなペレットを形成したが、完全分散しなかった (Miyazawa *et al.*, 2016)。そのため *A. oryzae* においては、第 2 の菌糸接着因子の存在が想定された。ヒト感染性糸状菌 *A. fumigatus* では、

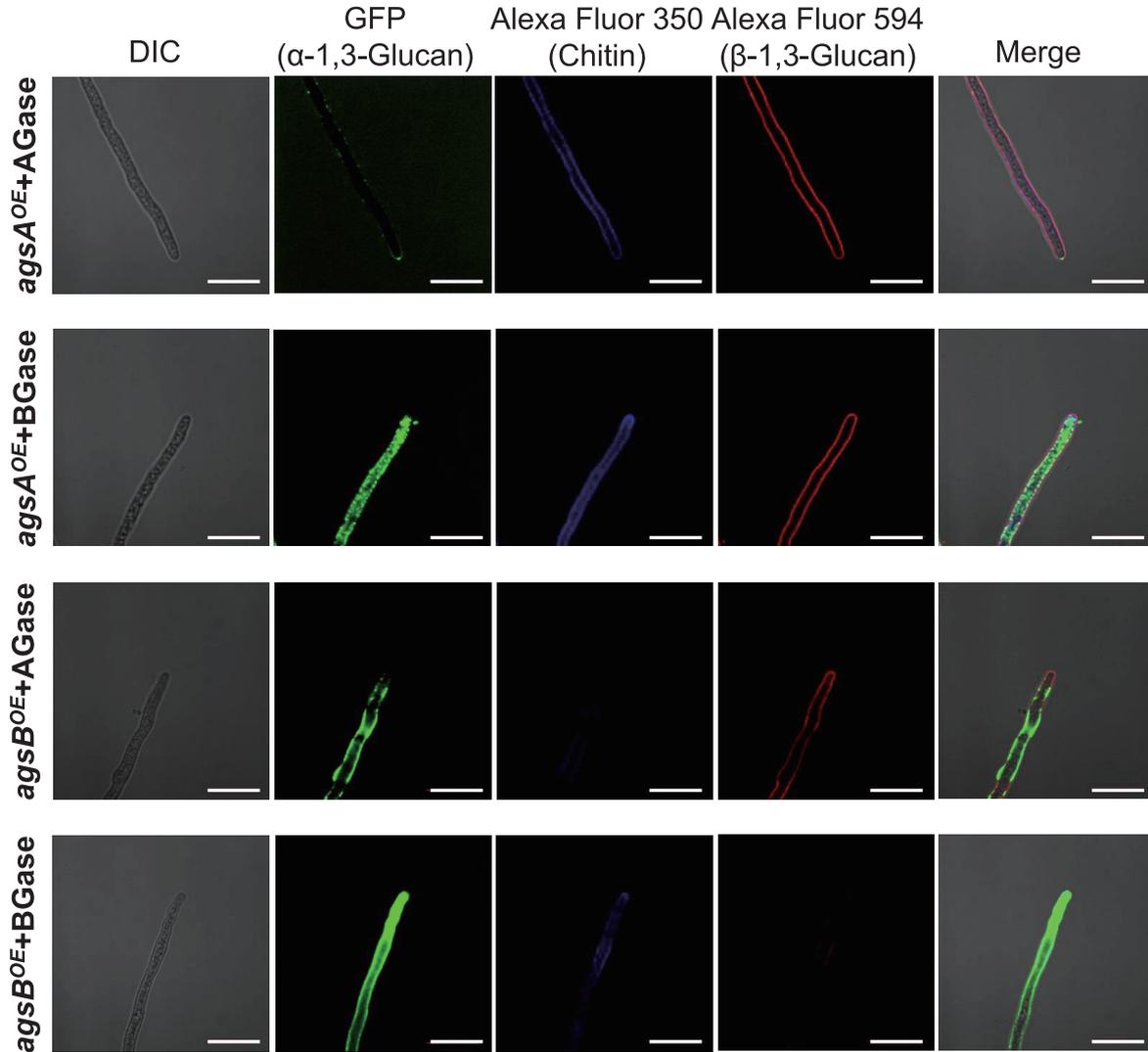


Fig. 5 Localization of cell wall polysaccharides after treatment with α -1,3-glucanase or β -1,3-glucanase. Vegetative hyphae cultured for 12 h were fixed and treated with α -1,3-glucanase (AGase) or β -1,3-glucanase (BGase) for 6 h. The hyphae were stained with AGBD-GFP for α -1,3-glucan, fluorophore-labeled antibody for β -1,3-glucan, and fluorophore-labeled lectin for chitin. Scale bars are 10 μ m. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2018)

感染因子となるバイオフィームとしてGAGが分泌生産されることが知られていた (Fontaine *et al.*, 2011). *A. oryzae* のゲノムにも GAG 生合成遺伝子クラスターが保存されていたことから GAG を第2の菌糸接着因子と仮定し, *A. oryzae* の野生型株および AG Δ 株を親株として GAG 生合成遺伝子のクラスター内の *sphZ* および *ugeZ* 遺伝子を破壊して, GAG Δ 株および AG-GAG Δ 株を取得した (Miyazawa *et al.*, 2019). 野生株, AG Δ 株, AG-GAG Δ 株および GAG Δ 株を CD 寒天平板培地上で 30 $^{\circ}$ C, 5 日間培養したところ, いずれもほとんど同等の菌糸生長と

分生子形成を示した. 次に, YPD 液体培地で 30 $^{\circ}$ C, 24 時間培養したところ, 野生株の菌糸塊は直径 3.7 \pm 0.2mm で, AG Δ 株 (2.7 \pm 0.3mm) に比べて, 顕著に大きかった (Figs. 6A, B). この結果は以前の結果とよく一致していた (Miyazawa *et al.*, 2016). また, AG-GAG Δ 株の菌糸は完全に分散した一方, GAG Δ 株は野生株よりも顕著に大きな菌糸塊 (6.2 \pm 0.0mm) を形成した (Figs. 6A, B). これらのことは, *A. oryzae* においては AG に加えて GAG も菌糸凝集に寄与しており, *A. oryzae* の菌糸完全分散には AG と GAG の生合成遺伝子両方の欠損が必要

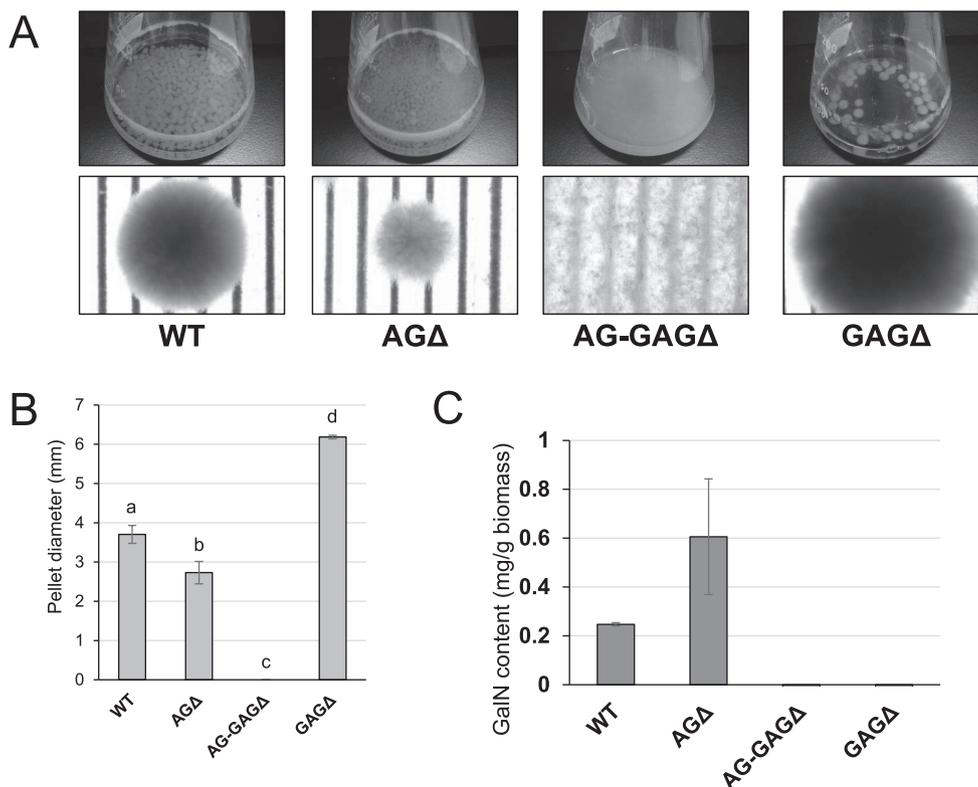


Fig. 6 Phenotypes of *Aspergillus oryzae* Δ agsA Δ agsB Δ agsC Δ sphZ Δ ugeZ (AG-GAG Δ) and Δ sphZ Δ ugeZ (GAG Δ) strains in liquid culture. (A) The wild-type (WT), Δ agsA Δ agsB Δ agsC (AG Δ), AG-GAG Δ , and GAG Δ strains were cultured in Erlenmeyer flasks (upper row), and images of hyphal pellets were taken under a stereomicroscope (bottom row; scale, 1 mm) at 24 h of culture. (B) The mean diameter of hyphal pellets was determined by measuring 10 randomly selected pellets per replicate under a stereomicroscope. Error bars represent standard deviations calculated from three replicates. Different letters indicate significant differences within each condition by Tukey's test ($p < 0.05$). (C) Galactosamine (GalN) content in the hot water-soluble fraction of the cell wall from the WT, AG Δ , AG-GAG Δ , and GAG Δ strains. Error bars represent standard error of the mean calculated from three replicates. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

であることを示唆している。

走査型電子顕微鏡観察により、*A. fumigatus* の菌糸には GAG 依存的な凹凸のある修飾が見られ、これは *sph3*, *uge3* および *agd3* 遺伝子の各破壊株において欠失することが報告されている (Lee *et al.*, 2016, Bamford *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2014)。そこで、*A. oryzae* の GAG Δ 株および AG-GAG Δ 株において菌糸の修飾が欠失するか否かを観察した。予想した通り、*A. oryzae* の野生株および AG Δ 株では菌糸表面の繊維状の修飾が観察されたのに対し、GAG Δ 株および AG-GAG Δ 株の菌糸は滑面であった (Miyazawa *et al.*, 2019)。これらのことは、*A. oryzae* において菌糸表面の繊維状の修飾が GAG 生合成遺伝子の存在に起因することを示唆している。また、GAG の欠損により固体表面上でのバイオフィーム形成が欠失することも観察された (Miyazawa *et al.*, 2019)。

(Gravelat *et al.*, 2013) は *A. fumigatus* の培養液から得

たエタノール沈殿物を完全加水分解し、そこに含まれるガラクトサミン (GalN) 量として GAG 量を定量した。この方法を *A. oryzae* にも適用し、各株の HW 画分の加水分解物に含まれる糖を陰イオン交換クロマトグラフィにより分析した。野生型株や AG Δ 株の熱水抽出 (HW) 画分には 1g バイオマス当たり 0.2-0.3mg の GalN が含まれていた一方、GAG Δ 株や AG-GAG Δ 株の HW 画分からは GalN はほとんど検出されなかった (Fig. 6C)。このことは、*A. oryzae* において *ugeZ* と *sphZ* の一方または両方が、GAG の生合成に必須であることを示している。

GAG Δ 株において菌糸が大きな塊を形成した要因について、GAG Δ 株の AG の化学構造の面から解析を行ったが野生型株との差異が認められず、GAG Δ 株が大きな菌糸塊を形成した理由について明らかにすることはできなかった (Miyazawa *et al.*, 2019)。

*In vitro*でのGAG依存的菌糸凝集の観察と凝集体形成のpH依存性

Fontaine *et al.* (2011) によって報告されたGAG精製法を参考にして, *A. oryzae* AG Δ 株の培養上清のエタノール沈殿物を150mM塩化ナトリウムで洗浄したところ, 沈殿物は150mM塩化ナトリウムに完全に溶解した. そ

こで, 培養上清からGAGを取得するためエタノール分別沈殿法を確立し, 六つの画分を得た. AG Δ 株由来0, 0.5, 1, 2, 2.5倍量エタノール画分にはいずれも約8%のガラクトースと5%のマンノースおよび少量のGalNが含まれていた (Fig.7A). AG Δ 株由来1.5倍量エタノール画分には16%のGalNと17%のガラクトースおよび4%

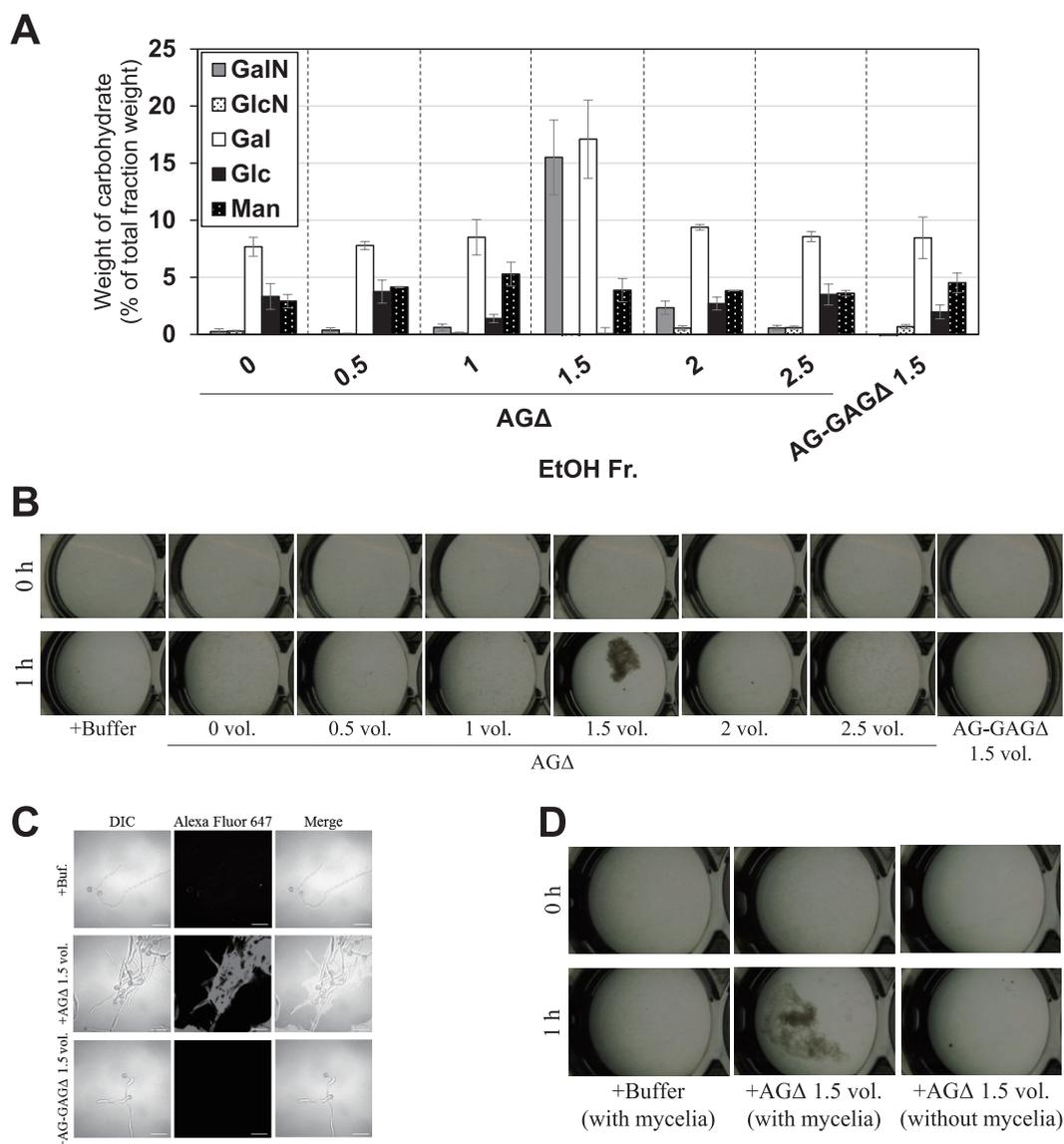


Fig. 7 Aggregation of mycelia of the AG-GAG Δ strain induced by ethanol-precipitated GAG. (A) Composition of the fractions obtained by ethanol precipitation. (B) Mycelial suspension of the AG-GAG Δ strain (25 μ L) was added into a mixture of 400 μ L of water, 50 μ L of 1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), and 25 μ L of 2 mg/mL of the fractions prepared from the AG Δ or AG-GAG Δ strains, as indicated. Samples were incubated at 30 $^{\circ}$ C for 1 h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification, \times 8). (C) Mycelia incubated for 1 h in the presence of EtOH-precipitated GAG were stained with soybean agglutinin–Alexa Fluor 647 conjugates and observed under a confocal laser-scanning microscope (\times 1000). Scale bars, 20 μ m. (D) Aggregation assay with the 1.5-vol. fraction from AG Δ was performed as in (A), with or without mycelial suspension of AG-GAG Δ . (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

TABLE 2. Degrees of deacetylation of *N*-acetylgalactosamine residues of galactosaminogalactan

Sample	Degree of deacetylation (%)
AGΔ 1.5-vol. EtOH Fr.	48.9 ± 4.6
AGΔ 1.5-vol. EtOH Fr. (acetylated)	2.0 ± 0.5*
AGΔ 1.5-vol. EtOH Fr. (non-acetylated)	43.6 ± 5.2

Values represent the mean ± standard error of the three replicates. Asterisk indicates significant difference ($P < 0.01$) with the AGΔ 1.5-vol. EtOH Fr. (non-acetylated).

(Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

のマンノースが含まれていた (Fig. 7A). すなわち、この画分に主に GAG とガラクトマンナンが含まれていると考えられた. AG-GAGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分には GalN が含まれておらず、8% のガラクトースと 5% のマンノースが含まれていた (Fig. 7A). AG-GAGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分の構成糖から推定すると、AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分には GAG が約 25% 含まれていると考えられる. 菌糸の凝集が *in vitro* で再現されるか否かを評価するため、各画分を AG-GAGΔ 株の菌糸と混合し、凝集体の形成を観察した. その結果、AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分を加えた場合にのみ凝集体が形成された (Fig. 7B). この凝集体は SBA-Alexa Fluor 647 により染色された (Fig. 7C). AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分では菌糸非存在下では凝集しなかった (Fig. 7D). コロイド滴定により決定した AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分に含まれる GAG 中の GalNAc の脱アセチル化度は 48.9 ± 4.6% であった (Table 2).

GAG 中の GalNAc 残基は *A. fumigatus* において部分的に脱アセチル化され、正電荷を持つことが報告されていたことから (Fontaine *et al.*, 2011), GAG 依存的凝集体形成の pH 依存性について評価を試みた. AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分を AG-GAGΔ 株の菌糸と混合した際、pH 6, 7 の場合には凝集が見られた一方、pH 4, 5, 8 ではほとんど凝集しなかった (Fig. 8A, B). AG-GAGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分を加えた場合、どの pH 条件でも菌糸は分散したままであった (Fig. 8A, B). また、GAG 非存在下において AG-GAGΔ 株の菌糸が pH 4, 5 において弱い凝集体が形成された (Fig. 8B). この理由については不明であるが、低 pH で機能する未知の凝集因子が AG-GAGΔ 株に残存しているのかもしれない. これらのことから、低 pH 条件下での GAG の正電荷の増加が GAG 間の静電反発を引き起こし、GAG 依存的な凝集体形成が妨げられたことが示唆された. 中性 pH 付近では正電荷が弱いいため、GAG が非静電的相互作用を

介して菌糸凝集に寄与したと推察される. pH 8 において凝集体が形成されなかった要因については不明である.

GAG 依存的菌糸凝集への水素結合の寄与と脱アセチル化の重要性

GAG 依存的な凝集体形成は GalN のアミノ基を介した水素結合に起因すると仮説を立てた. この仮説を検証するため、AGΔ 株由来 1.5 倍量エタノール画分を無水酢酸存在下 (アセチル化) および非存在下で処理し、凝集性を評価した. *N*-アセチル化されていない GAG は Fig. 7B と同様に AG-GAGΔ 株の菌糸を凝集させた一方、*N*-アセチル化により菌糸凝集は減衰した (Fig. 9A). *N*-アセチル化された 1.5 倍量エタノール画分の脱アセチル化度は 2.0 ± 0.5% であり、*N*-アセチル化されていない 1.5 倍量エタノール画分の脱アセチル化度 (43.6 ± 5.2%) に比べて顕著に減少した ($P < 0.01$; Table 2). これらのことから、GalN のアミノ基は GAG 依存的な凝集に寄与していることが示唆された.

GAG 依存的凝集が水素結合によるものか否かを検証するため、水素結合を破壊する尿素の存在下で菌糸凝集評価を行った. 尿素非存在下では菌糸が凝集した一方、尿素濃度依存的に凝集は弱まった (Miyazawa *et al.*, 2019). 以上のことから、GalN のアミノ基を介した水素結合の形成が GAG 依存的な凝集体形成に重要であることが強く示唆された.

AG-GAG 欠損株の組み換え酵素生産性の評価

菌糸の分散性が *A. oryzae* のバイオマスおよび酵素生産の増加に寄与するか否かを検証した. YPM 液体培地で培養したところ、AG-GAGΔ-cutL1 株は菌糸が分散し、AGΔ-cutL1 株では野生株に比べて小さな菌糸の塊を形成した (Fig. 10A). 24 時間培養後の培養上清を SDS-PAGE に供した結果、AG-GAGΔ-cutL1 株の分泌タンパク質プロファイルは WT-cutL1 株や AGΔ-cutL1 株に比べて増加

していた (Fig. 10B). また, バイオマスやクチナーゼの分泌生産量はいずれも, AG-GAG Δ -cutL1 株と AG Δ -cutL1 株で野生型株に比べてそれぞれ約 10 倍および約 4 倍に増加していた (Fig. 10C, D). これらのこと

から, AG や GAG をどちらか一方もしくは両方を有する糸状菌において, バイオマスや組換え酵素の生産性が AG や GAG の欠損による菌糸分散性によって増加する可能性が示唆された (Miyazawa *et al.*, 2019).

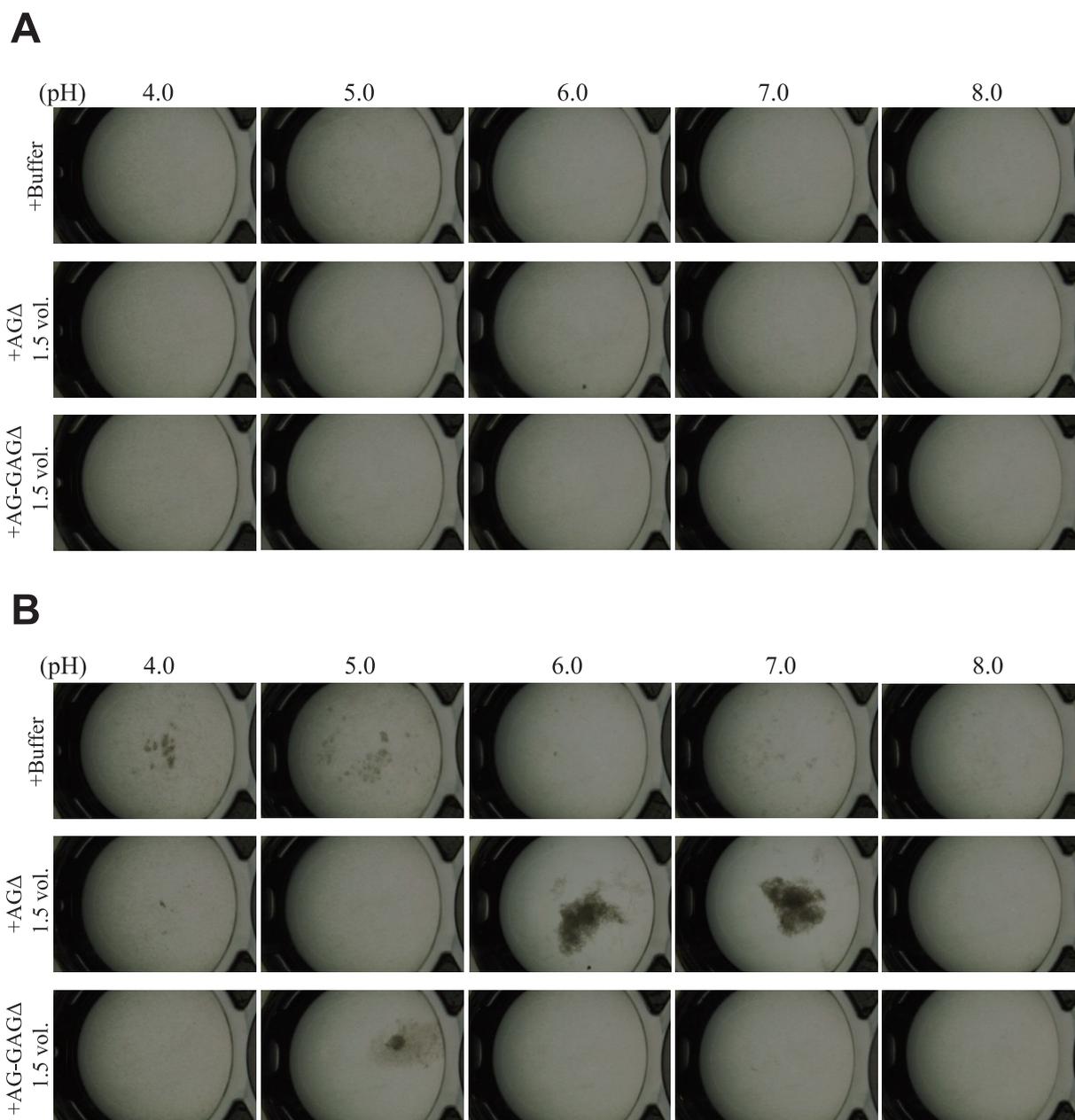


Fig. 8 pH-dependence of GAG aggregation. Mycelial suspension of the AG-GAG Δ strain (25 μ L) was added to 450 μ L of buffers with different pH and 25 μ L of the 1.5-vol. EtOH fraction prepared from the AG Δ or AG-GAG Δ strain as indicated. Samples were incubated at 30 $^{\circ}$ C for (A) 0 h and (B) 1 h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification, $\times 8$). (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

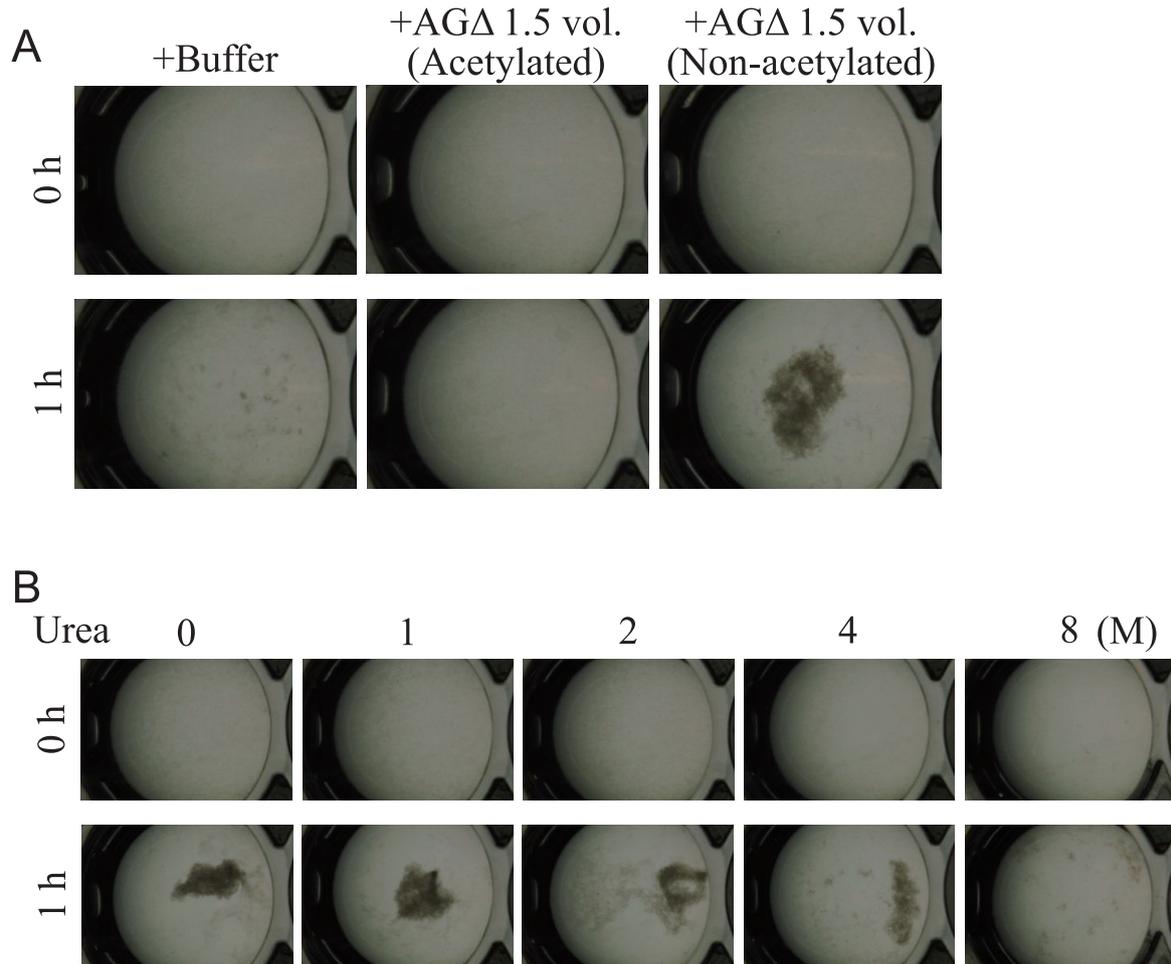


Fig.9 Mycelial aggregation in the presence of (A) acetylated GAG or (B) urea. (A) The amino groups of ethanol-precipitated GAG were acetylated with acetic anhydride. Mycelial suspension of the AG-GAG Δ strain (25 μ L) was added to a mixture of 450 μ L of 100mM sodium phosphate buffer (pH7.0) and 25 μ L of the 1.5-vol. EtOH fraction prepared from AG Δ (acetylated or not). (B) Mycelial suspension of the AG-GAG Δ strain (25 μ L) was added to a mixture of 450 μ L of 100mM sodium phosphate buffer (pH7.0) containing 0, 1, 2, 4, or 8M urea, and 25 μ L of the 1.5-vol. EtOH fraction prepared from the AG Δ strain. Samples were incubated at 30 $^{\circ}$ C for 1h with shaking and examined under a stereomicroscope (magnification, $\times 8$). (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

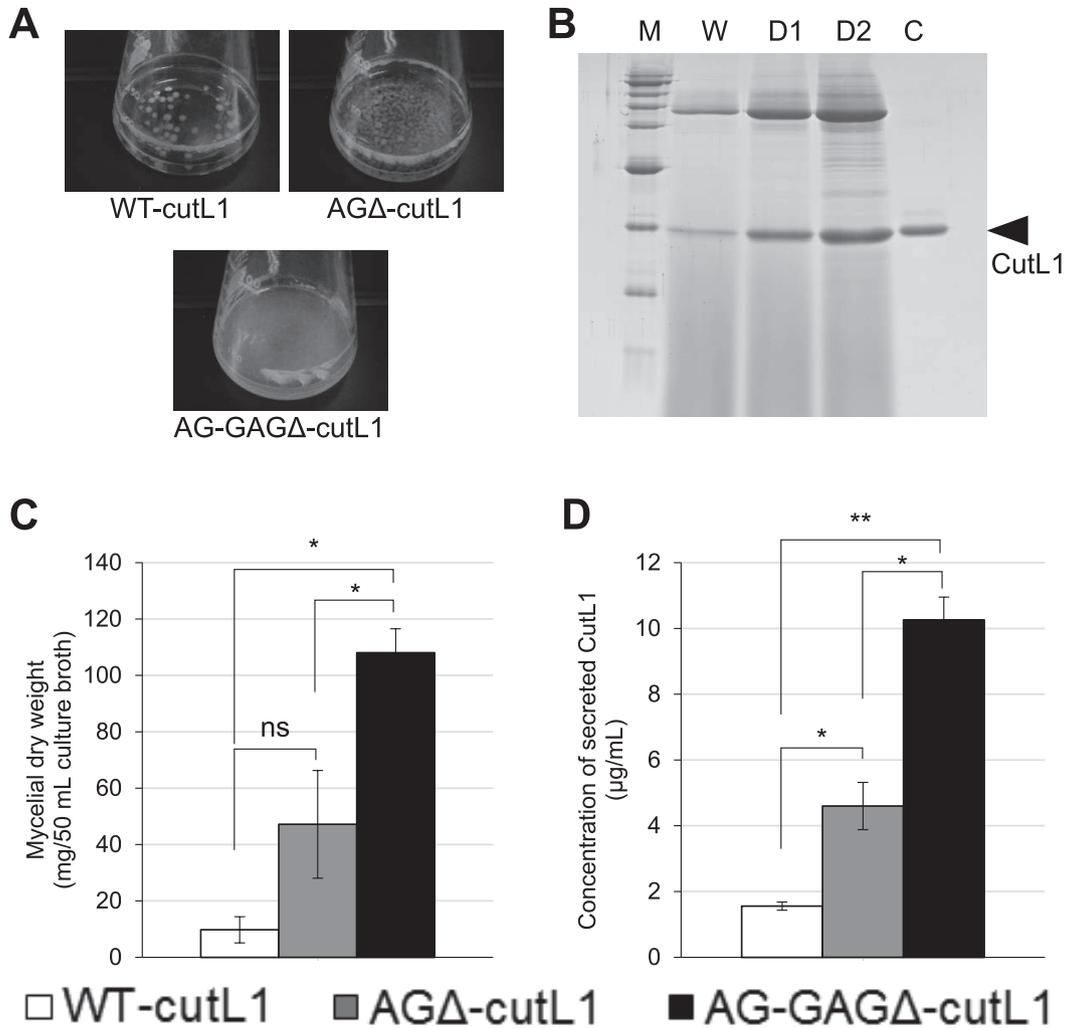


Fig. 10 Recombinant CutL1 production by the WT-cutL1, AG Δ -cutL1, and AG-GAG Δ -cutL1 strains in liquid culture. **(A)** Phenotypes of the WT-cutL1, AG Δ -cutL1, and AG-GAG Δ -cutL1 strains under liquid culture conditions. Conidia (final concentration, 1×10^4 /mL) of each strain were inoculated into YPM medium and rotated at 100rpm at 30 $^{\circ}$ C for 24 h. **(B)** Secreted protein profiles of each strain. Lanes W, D1, D2: proteins precipitated from culture supernatants (250 μ L) of wild-type-cutL1, AG Δ -cutL1, and AG-GAG Δ -cutL1 strains, respectively; lane C: 1 μ g of purified CutL1. **(C)** Mycelial dry weight of each strain. Mycelia grown for 24 h were collected by filtration through Miracloth, dried at 70 $^{\circ}$ C and weighed. **(D)** Concentration of secreted CutL1 in culture supernatants. In **(C)** and **(D)**, error bars represent the standard error of the mean calculated from three replicates ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). ns, not significant. (Reproduced from Miyazawa *et al.*, 2019)

菌糸分散麹菌 *A. oryzae* AG-GAG Δ 株と野生型株の培養液の流体特性解析

ジャー発酵槽 (3L) においても CutL1 生産量はこれまでの結果が再現され、菌糸完全分散性の AG-GAG Δ 株では野生型株に比べて約2倍高かった。CFD シミュレーション解析の結果、非ニュートン性の強い野生型株の培養液の流動は翼周りを中心としてその外側の培養液に対

してスリップしており培養槽上部まで培養液流動が形成されなかったが、同じ非ニュートン性流体でも粘性が低い菌糸完全分散性 AG-GAG Δ 株では培養槽内全域に渡る流動を形成することが推測された (Fig.11)。CFD シミュレーションの結果は、野生型株では培養液の下層に通気が留まるの対して、AG-GAG Δ 株では通気が培養液全体に拡散することを示している。

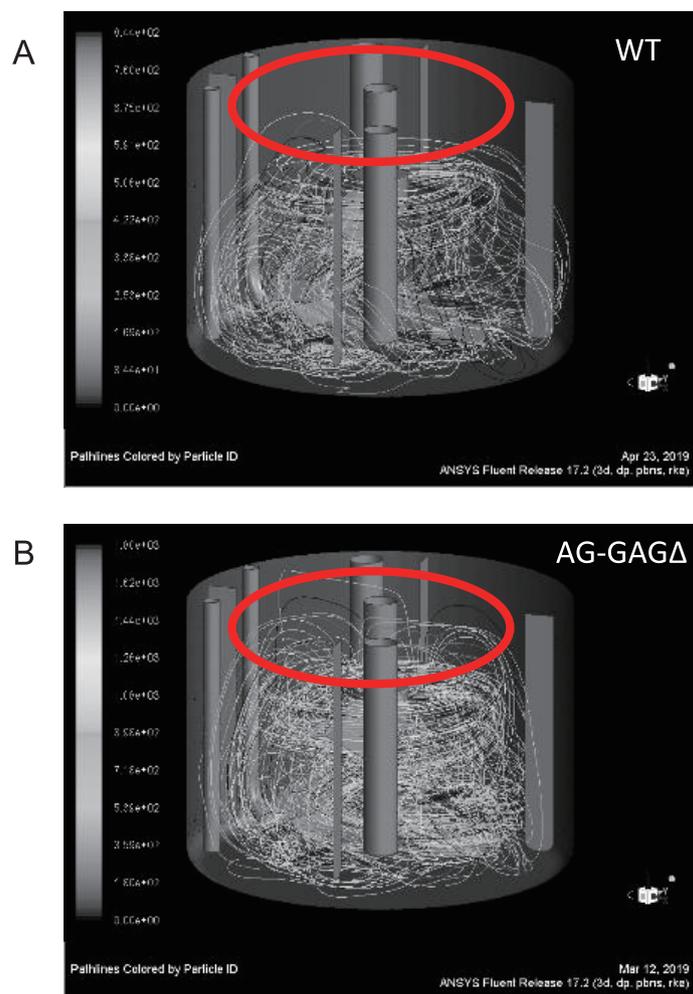


Fig. 11 CFD simulation results of WT and AG-GAG Δ strains in culture. (pass line)

WT and (B) AG-GAG Δ strains were grown in a jar fermenter (3L) with 1.5L YPD medium. Conidia (final concentration, 1×10^5 /mL) of each strain were inoculated into YPD medium and rotated at 660rpm at 30°C for 60h. The calculation model is the turbulence-model (Realizable k-e). Red circles indicate the reactor upper space, and the AG-GAG Δ strain has better flow than the WT strain in the reactor upper space.

考 察

α -1,3-グルカン (AG) の病原性に関する機能については *A. fumigatus* において (Beauvais *et al.*, 2013, Maubon *et al.*, 2006, Beauvais *et al.*, 2005), 菌糸接着における役割については *A. fumigatus* (Henry *et al.*, 2012, Fontaine *et al.*, 2010), *A. nidulans* (He *et al.*, 2014, Yoshimi *et al.*, 2013) および *A. oryzae* (Zhang *et al.*, 2017, Miyazawa *et al.*, 2016) において報告されてきたが, 糸状菌の AG の化学構造については Choma *et al.* (2013) による *A. wentii* におけるアルカリ可溶性グルカンの化学構造およびムタナーゼ (α -1,3-グルカナーゼ; *Streptococcus mutans* の繁殖を防ぐための歯磨き粉の成分として利用) の基質としての特性が解析されたのが唯一の例である. *A. nidulans* には二種の AG 合成酵素遺伝子 (*agsA*, *agsB*) が存在する. 栄養菌糸においては, 主に *AgsB* によって AG が合成されている (He *et al.*, 2014, Yoshimi *et al.*, 2013). また, *agsA* 遺伝子は分生子形成に関与すると考えられている (He *et al.*, 2014). しかしながら, *agsA* の詳細な機能や, *AgsA*, *AgsB* により合成される多糖の化学構造については不明であった.

本研究では, *agsA*, *agsB* の高発現 (*agsA*^{OE}, *agsB*^{OE}) 株を作製し, これらの株の細胞壁に含まれる多糖の化学構造を詳細に解析した. 野生型株や *agsB*^{OE} 株の菌糸は液体振盪培養において緊密な塊を形成した一方, *agsA*^{OE} 株では密度の低い菌糸塊を形成しながら生育した (Fig. 1). アルカリ可溶性グルカンの種々の化学構造解析により, 野生株, *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株のアルカリ可溶性グルカンは主に AG から成ること (Fig. 2; Miyazawa *et al.*, 2018), アルカリ可溶性グルカンの M_p は野生株や *agsB*^{OE} 株ではそれぞれ 150,000 および 370,000 であった一方, *agsA*^{OE} 株では 1,480,000 であることが示された (Fig. 3, Table 1). また, アルカリ可溶性グルカンの Smith 分解により, 野生株, *agsA*^{OE} 株および *agsB*^{OE} 株のアルカリ可溶性グルカンはいずれも, 約 200 残基の 1,3-結合の α -グルコースからなるサブユニット構造を有することが示された (Table 1). *agsA*^{OE} 株の AG サブユニットの数は *agsB*^{OE} 株の約 4 倍であった.

agsA^{OE} 株と *agsB*^{OE} 株の間でアルカリ可溶性グルカンの分子量が異なる要因については不明のままである. *S. pombe* の AG 合成酵素 *Ags1* は細胞外ドメイン, 細胞内ドメインおよび多重膜貫通ドメインの 3 つのドメインから成る (Hochstenbach *et al.*, 1998). *A. nidulans* の *AgsA*, *AgsB* にもこれらのドメインが保存されている (He *et al.*, 2014). 1,3-結合の α -グルカン鎖は細胞内ドメインにより合成され (1,4-結合の α -グルカンのプライマーを伴う可能性もある), 多重膜貫通ドメインを通して細胞外に

排出されると予想されている. 細胞外に出た AG 鎖は細胞外ドメインによって糖転移されて相互に連結し, 成熟 AG 鎖になると考えられる (Yoshimi *et al.*, 2017). *S. pombe* の温度感受性変異体 *ags1-1^{ts}* は細胞外ドメインの G696S に変異を有し, おそらく糖転移能の欠失により未成熟の短い α -グルカン鎖を合成する (Grün *et al.*, 2005). G696 は *A. nidulans* の *AgsA*, *AgsB* にも保存されているが, その周囲の残基の保存性高くない (unpublished data). *agsA*^{OE} 株と *agsB*^{OE} 株の間のアルカリ可溶性グルカンの分子量の違いは, 両合成酵素間の細胞外ドメインの機能の違いに起因するのかもしれない. この違いの要因を明らかにするためには, *AgsA* と *AgsB* のさらなる生化学的および酵素学的解析が必要である.

蛍光顕微鏡観察により, AG は野生型株や *agsB*^{OE} 株では細胞壁最外層に局在しているのに対し, *agsA*^{OE} 株では細胞壁内層に位置していることが示唆された (Fig. 4, 5). この違いは, (1)直接的に AG の空間分布に影響を与える *AgsA* と *AgsB* の酵素学的特性の違い, (2)水可溶性のような AG の分子量に影響される物理化学的特性の違い, のいずれかにより説明できると考えられる. 細胞壁多糖は一般的に菌糸の極性生長時に菌糸先端で合成される (Riquelme *et al.*, 2018). 細胞膜上で AG が生合成されると, 糖鎖は膜外空間に放出され, 不溶化および固定化されて細胞壁の一部になると考えられる (Latgè & Beauvais, 2014). 分子量の大きな多糖は一般的に水に対してより不溶性である (Guo *et al.*, 2017). そのため, 分子量の大きな AG は細胞壁の内層に局在した一方, 分子量が小さいと細胞壁の外層に分布したものと考えられる. *agsB*^{OE} 株の細胞中での低分子量のアルカリ可溶性グルカンが占める割合は, *agsA*^{OE} 株よりも多く, このことが *agsB*^{OE} 株の細胞壁において AG がより外層に呈示された要因である可能性が考えられる (Fig. 3). また, α -1,3-グルカナーゼ非処理時の *agsA*^{OE} 株の菌糸では, 細胞の輪郭に沿って弱い AGBD-GFP の蛍光が観察されたが (Fig. 4), これは低分子量で細胞表層に位置する AG が少量存在することに起因しており, その結果弱い菌糸凝集 (Fig. 1) を示した可能性が考えられる. $\Delta amyG$ 株の AGBD-GFP による AG の蛍光標識の結果も, この説明を支持している (Miyazawa *et al.*, 2018). 最近, *A. fumigatus* の細胞壁の分子構造が固相 NMR 法により解析され, AG が細胞壁の外殻と細胞内層に局在することが報告された (Kang *et al.*, 2018). *A. nidulans* の野生株において, 二つの酵素により合成される AG の細胞壁中の空間分布が異なることが想定されるが, これは AG の分子量の違いに起因するのかもしれない. 異なる分子量の AG の局在と物理化学的特性との関係性を明らかにするためには, さらなる解析が必要である.

真菌におけるAGの生合成には、AG合成酵素に加えて細胞内 α -アミラーゼとUTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferaseも必要である(He *et al.*, 2014, Camacho *et al.*, 2012, Marion *et al.*, 2006). 細胞内 α -アミラーゼはAG合成に必要な α -1,4-グルカノオリゴ糖プライマーを合成すると考えられている(Camacho *et al.*, 2012, van der Kaaij *et al.*, 2007, Marion *et al.*, 2006). *A. niger*の細胞内 α -アミラーゼAmyDはデンプンを加水分解して主にマルトトリオースを生成する(van der Kaaij *et al.*, 2007). *A. nidulans*のamyG遺伝子の破壊により、細胞壁AGは顕著に減少する(He *et al.*, 2014). *A. wentii*のアルカリ可溶性グルカンは1,4-結合の α -グルコース残基からなる短いスペーサーを有し、AGサブユニット同士を隔てている(Choma *et al.*, 2013). 本研究で、*A. nidulans*のアルカリ可溶性グルカンは約90%の1,3-結合の α -グルカんと少量のSmith分解可能なグルカン(おそらく1,4-結合の α -グルカン)からなり、AGサブユニットは1,4-結合のグルカンによって隔てられている可能性を示した(Table 1, Fig. 3; Miyazawa *et al.*, 2018). *A. nidulans*の Δ amyG株のアルカリ可溶性グルカンの分子量は93,500で、親株(ABPU1 Δ ligD)に比べて顕著に小さかった(Miyazawa *et al.*, 2018). AmyGはAGのスペーサーとして機能するオリゴ糖を合成すると考えられる。*A. nidulans* Δ amyG株のアルカリ可溶性グルカンはSmith分解によって、非分解時より分子量が減少した(unpublished data). このことは、AmyGに加えて未知の因子もスペーサー合成に関与する可能性が考えられる。

*A. oryzae*においてはAG欠損株で野生株に比べて小さな菌糸の塊を形成したが、*A. nidulans*とは異なり、菌糸分散には至らなかった(Miyazawa *et al.*, 2016). すなわち、*A. oryzae*にはAG以外の菌糸接着因子が残存していると考えられた。本研究では、残存する接着因子として細胞外分泌多糖の構成成分であるGAGに着目し解析を行った。(Lee *et al.*, 2016)は*A. fumigatus*においてGAGの生合成が遺伝子クラスターを成す5遺伝子(*gtb3*, *agd3*, *ega3*, *sph3*, *uge3*)によって制御されており、類似の遺伝子クラスターが*A. niger*, *A. nidulans*, *Botrytis cinerea*などいくつかの子囊菌にも保存されていることを報告している。本研究において、*A. oryzae*のゲノム上にもこのクラスターが保存されていることが明らかになった(Miyazawa *et al.*, 2019).

GAGは*A. fumigatus*においてプラスチックやフィブロネクチン、上皮細胞への接着に寄与し、病原性に関する機能を有することが知られている(Gravelat *et al.*, 2013). GAGはまた、プレート培養時のバイオフィーム形成にも関与する(Gravelat *et al.*, 2013). しかしながら、これまでGAGと菌糸凝集の関係性については全く報告

がなかった。本研究で*A. oryzae*においてGAG欠損(GAG Δ)株およびAGとGAGの両方が欠損したAG-GAG欠損(AG-GAG Δ)株を作製し、液体振盪培養時の表現型を観察した。その結果、AG-GAG Δ 株は菌糸が完全分散したのに対し、GAG Δ 株は野生株に比べて菌糸が大きなペレットを形成しながら生育したことから(Fig. 6)、*A. oryzae*においてはAGだけでなくGAGも菌糸のペレット形成に寄与することが明らかとなった。

AG-GAG Δ 株の菌糸と部分精製したGAGを混合することにより*in vitro*の凝集体形成の観察に成功した(Fig. 7). この*in vitro*の菌糸凝集解析から、GAG存在下において、pH6, 7ではAG-GAG Δ 株の菌糸はより凝集した一方、酸性pH条件下ではその凝集が弱まった(Fig. 8). GAG生合成遺伝子クラスターにおいて、*agd3*はN-アセチルガラクトサミン脱アセチル化酵素をコードしている(Lee *et al.*, 2016). また、*A. fumigatus*において、GAG中のGalNAc残基は一部が脱アセチル化されていることが報告されている(Fontaine *et al.*, 2011). *A. fumigatus*において、*agd3*遺伝子の破壊によりGAGの脱アセチル化が起こらなくなり、細胞壁へのGAGの結合が欠失したことが報告されている(Lee *et al.*, 2016). また、GalNAc残基の脱アセチル化により生じたアミノ基の正電荷は菌糸の負電荷表面への接着に必要で(Lee *et al.*, 2016). 酸性pH条件では静電反発を介して菌糸凝集を妨げていると考えられる。このアミノ基は中性pH付近(特にGAGの等電点付近)ではプロトンが付加されていない状態である。このことから、中性pH付近でGAGが接触することが、GAG中のGalNのアミノ基と、細胞壁表層のグルカンや細胞壁に接着しているGAG糖鎖中のヒドロキシ基との間の水素結合形成の引き金となっている可能性が考えられる。AG Δ 株由来のGAGの脱アセチル化度(DD)は約50%であった(Table 2). 無水酢酸によりアセチル化したAG Δ 株由来GAGはほとんど菌糸凝集を誘導せず(Fig. 9), DDも非アセチル化時と比べて顕著に減少した(Table 2). これらの結果は、GAGのGalNAc残基の脱アセチル化がGAG依存的菌糸凝集に重要であることを示唆している。さらに、GAG依存的な菌糸凝集は8M尿素存在下で阻害された(Miyazawa *et al.*, 2019). このことは、アミノ基のアセチル化により、GAGとグルカンおよび細胞壁に接着したGAGとの間の水素結合が形成されなくなったことを示唆している。水素結合は中性pH付近でのGAG依存的菌糸凝集の主要な力であると考えられる。中性pH付近でGAGを添加し凝集した菌糸は、酸性pH(pH4.0)に移しても凝集体は分散しなかったことから(data not shown), 一旦凝集体が形成されるとGAG間の接着が酸性pH条件に耐性であることを示唆している。

Aspergillus 属菌を含む糸状菌を用いた発酵産業において、菌糸ペレットの形成はその内部が不活性状態となることから (Driouch *et al.*, 2010), 生産性の制限要因となっていた。*A. niger* において、ペレットの大きさを最小化するためにチタン粒子が用いられた例がある (Driouch *et al.*, 2012)。このような物理的な手法は効果的であるが、培地の選択を制限してしまう。AG-GAG Δ 株はAG Δ 株や野生株に比べて菌体生育量やクチナーゼの生産量が顕著に増加した。すなわち、菌糸ペレット形成因子の制御が発酵産業への革新的なアプローチとなることが期待される。

要 約

糸状菌は液体培養によるタンパク質・化成品の工業生産に利用される。糸状菌を工業生産用に大量培養する場合、糸状に生育した菌糸が絡まり合い、塊を形成するために、その高密度培養が困難となっていた。我々はモデル糸状菌 *A. nidulans* において細胞壁多糖 α -1,3-グルカン (AG) が菌糸接着因子であることをすでに見出していた。本研究での成果をまとめると以下のようになる。(1) *A. nidulans* の *agsA* と *agsB* の単独高発現株の AG の分子量が夫々 140 万、40 万であることを発見した。(2) AG の細胞壁中の分布解析の結果、AgsA の合成する AG は細胞壁内層に AgsB の合成する AG は外層に分布し、主に外層に分布する AG が菌糸接着に寄与することが予想された。(3) 産業用糸状菌の麹菌 *A. oryzae* では細胞壁外層多糖の AG と細胞外マトリックス多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) の 2 種が菌糸接着因子であることを見出した。すなわち、麹菌野生型株が菌糸塊 (ペレット) を形成するのにに対し、AG と GAG の二重欠損株 (AG-GAG Δ 株) では菌糸が均一分散し、菌体量が増加して高密度培養に適することを発見した。(4) 麹菌精製 GAG と菌糸完全分散性の AG-GAG Δ 株の菌糸を用いて *in vitro* で GAG による菌糸接着能を解析した。その結果、精製 GAG を AG-GAG Δ 株菌糸に添加して菌糸凝集の再現に成功した。GAG 中のガラクトサミン (GalN) のアミノ基をアセチル化すると菌糸凝集能が低下し、GalN のアミノ基が水素結合を介して菌糸凝集に寄与することが示唆された。(5) 麹菌の野生型株、AG Δ 株及び AG-GAG Δ 株の酵素生産性をフラスコで評価し、AG-GAG Δ 株の高い酵素生産性が確認された。(6) 野生型株と AG-GAG Δ 株を 3L ジャーで 660 rpm, 60 時間培養した結果、AG-GAG Δ 株の酵素生産量が顕著に高かった。培養液の流体特性を解析したところ、AG-GAG Δ 株は野生株と比較して培養液の非ニュートン性が低下し、野生型株では培養槽内の回転翼の近傍の培養液とその外側の培養液の間でスリップが起こるために培養槽全体が攪拌

されないが、AG-GAG Δ 株ではスリップが起こらずに槽内全体が攪拌されることが示唆された。以上、我々は *Aspergillus* 属糸状菌の菌糸接着因子である細胞壁多糖の機能を明らかにし、菌糸ペレットの制御を行うことに成功した。AG および GAG は比較的広範に糸状菌に分布しており、本技術を適用することで種々の糸状菌のペレット形成を制御し、発酵生産の生産性を改善できるものと思われる。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 小泉亜未, 尾形慎, 矢野成和, 宮澤拳, 吉見啓, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2020. 麹菌の細胞壁 α -1,3-グルカン合成に関与する α -アミラーゼ AgtA の酵素学的性質の解明. 日本農芸化学会 2020 年度大会 3月25-28日, 福岡
- 2) 宮澤拳, 竹内歩, 小泉亜未, 吉見啓, 佐野元昭, 中島佑, 阿部敬悦. 2020. 糸状菌の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの合成における細胞内 α -アミラーゼ遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会 2020 年度大会 3月25-28日, 福岡
- 3) 織田隆太郎, 宮澤拳, 吉見啓, 阿部敬悦. 2019. 麹菌 *Aspergillus oryzae* における液体振盪培養時の菌体への刺激がもたらす α -1,3-グルカン合成量への影響の解析. 日本農芸化学会 2019 年度東北支部大会 11月9日, 弘前
- 4) 宮澤拳, 山下雄章, 小泉亜未, 吉見啓, 中島佑, 阿部敬悦. 2019. モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞壁 α -1,3-グルカン合成に対する α -amylase 遺伝子 *amyD*, *amyG* の寄与の解析. 日本農芸化学会 2019 年度東北支部大会 11月9日, 弘前
- 5) 宮澤拳. 2019. 糸状菌の液体培養時の菌糸凝集メカニズムの解明とその発酵生産への応用. 日本農芸化学会東北支部若手奨励賞受賞講演 11月8日, 弘前
- 6) 宮澤拳, 吉見啓, 中島佑, 阿部敬悦. 2019. 麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトンによる菌糸凝集メカニズムの解析. 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス 11月6-7日, 札幌
- 7) 市川暉, 宮澤拳, 吉見啓, 古明地敬介, 加藤好一, 阿部敬悦. 2019. 麹菌 *Aspergillus oryzae* 菌糸完全分散変異株の液体培養における流体特性の解析. 第71回日本生物工学会大会 9月16-18日, 岡山
- 8) 宮澤拳, 吉見啓, 中島佑, 阿部敬悦. 2019. 麹菌における細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトンを介した菌糸塊形成機構の解析. 第67回日本応用糖質科学会 2019 年度大会 9月11-13日, 岐阜
- 9) 阿部敬悦. 2019. 糸状菌の細胞表層を介した菌糸接着機構とその制御による酵素生産技術の開発. 第21回生体触媒化学シンポジウム 8月29-30日, 金沢
- 10) 山下雄章, 吉見啓, 宮澤拳, 小泉亜未, 矢野成和, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2019. モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の GPI アンカー型 α -アミラーゼ AgtA による細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量制御. 日本農芸化学会 2019 年度大会 3月24-27日, 東京
- 11) 宮澤拳, 吉見啓, 矢野成和, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2019. 麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体振盪培養における菌糸塊形成メカニズムの解析. 日本農芸化学会 2019 年度大会 3月24-27日, 東京

- 12) Miyazawa, K., Yoshimi, A., Yamashita, T., Koizumi, A., Yano, S. & Abe, K. 2019. Molecular mass of α -1,3-glucan affects the degree of hyphal aggregation and its localization in *Aspergillus nidulans*. The 16th International Aspergillus Meeting (Asperfest16) March 11-12, Pacific Grove, USA
- 13) 宮澤拳, 吉見啓, 山下雄章, 小泉亜未, 矢野成和, 笠原紳, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2018. 糸状菌*Aspergillus nidulans*の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの分子量は細胞壁中の局在と菌糸接着性に影響する. 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス 11月15-16日, 長岡
- 14) 小泉亜未, 矢野成和, 宮澤拳, 吉見啓, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2018. 麹菌*Aspergillus oryzae*のGPIアンカー型 α -アミラーゼAgtAの酵素学的性質の解明. 第67回日本応用糖質科学会平成30年度大会 9月10-12日, 秋田
- 15) 宮澤拳, 吉見啓, 小泉亜未, 笠原紳, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2018. モデル糸状菌*Aspergillus nidulans*の細胞壁多糖 α -1,3-グルカンの化学構造と菌糸接着性. 第67回日本応用糖質科学会平成30年度大会 9月10-12日, 秋田
- 16) 吉見啓. 2018. 糸状菌の細胞表層多糖解析による菌糸接着の理解と高密度培養への応用. 第7回応用糖質フレッシュシンポジウム. 9月9日, 秋田
- 17) 宮澤拳, 吉見啓, 古明地敬介, 田畑風華, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2018. 麹菌*Aspergillus oryzae*の液体培養における菌糸完全分散株の作製とその酵素生産への応用. 第70回日本生物工学会大会 9月5-7日, 大阪
- 18) 古明地敬介, 宮澤拳, 吉見啓, 市川暉, 佐野元昭, 阿部敬悦. 2018. 麹菌*Aspergillus oryzae*菌糸完全分散変異株の液体培養における酵素高生産性の評価. 第70回日本生物工学会大会 9月5-7日, 大阪

原著論文

- 1) Miyazawa, K., Yoshimi, A., Sano, M., Tabata, F., Sugahara, A., Kasahara, S., Koizumi, A., Yano, S., Nakajima, T. & Abe, K. 2019. Both galactosaminogalactan and α -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Front. Microbiol.* **10**: 2090.
- 2) Sugahara, A., Yoshimi, A., Shoji, F., Fujioka, T., Kawai, K., Umeyama, H., Komatsu, K., Enomoto, M., Kuwahara, S., Hagiwara, D., Katayama, T., Horiuchi, H., Miyazawa, K., Nakayama, M. & Abe, K. 2019. A novel antifungal compound Z-705 specifically inhibits protein kinase C of filamentous fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**: e02923-18.
- 3) Miyazawa, K., Yoshimi, A., Kasahara, S., Sugahara, A., Koizumi, A., Yano, S., Kimura, S., Iwata, T., Sano, M. & Abe, K. 2018. Molecular mass and localization of α -1,3-glucan in cell wall control the degree of hyphal aggregation in liquid culture of *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* **9**: 2623.
- 4) Chang, P.-K., Zhang, Qi., Schafenstein, L., Mack, B., Yoshimi, Y., Miyazawa, K. & Abe, K. 2018. *Aspergillus flavus* GPI-anchored protein-encoding *ecm33* has a role in growth, development, aflatoxin biosynthesis and maize infection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**: 5209-5220.

その他 (総説・書籍)

- 1) Miyazawa, K., Yoshimi, A. & Abe, K. 2020. The mechanisms of hyphal pellet formation mediated by polysaccharides, α -1,3-glucan and galactosaminogalactan, in *Aspergillus* species. *Fungal Biol. Biotechnol.* **7**(10) <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00101-4>

- 2) 吉見啓, 寺内裕貴, 宮澤拳, 阿部敬悦. 2019. 発酵が生み出す世界を化学する. *化学と教育*. **67**: 580-583.
- 3) 吉見啓, 宮澤拳, 小泉亜未, 阿部敬悦. 2019. 糸状菌の細胞表層多糖解析による菌糸接着の理解と高密度培養への応用. *応用糖質化学*. **9**: 177-183.
- 4) 吉見啓, 宮澤拳, 張斯来. 2018. 麹菌の細胞壁 α -1,3-グルカン欠損株による高密度培養と物質高生産への利用. 五味勝也, 阿部敬悦(編), 酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開, p. 162-167, CMC出版, 東京

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心よりお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力をいただいた金沢工業大学ゲノム生物学センター 佐野元昭 教授、山形大学工学部 矢野成和 准教授、宮城大学食産業学部 笠原紳 教授、佐竹機械化学工業株式会社 加藤好一 攪拌技術研究所長、東北大学大学院農学研究科学生諸氏に感謝いたします。

文 献

- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., & Machida, M. 2006. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* **162**: 143-153.
- Ahamed, A., & Vermette, P. 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresour. Technol.* **100**: 5979-5987.
- Antecka, A., Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. 2016. Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 193.
- Bamford, N.C., Snarr, B.D., Gravelat, F.N., Little, D.J., Lee, M.J., Zacharias, C.A., Chabot, J.C., Geller, A.M., Baptista, S.D., Baker, P., *et al.* 2015. Sph3 is a glycoside hydrolase required for the biosynthesis of galactosaminogalactan in *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **290**: 27438-27450.
- Beauvais, A., Bozza, S., Knemeyer, O., Formosa, C., Balloy, V., Henry, C., Roberson, R.W., Dague, E., Chignard, M., Brakhage, A.A., *et al.* 2013. Deletion of the α -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **9**: e1003716.
- Beauvais, A., Fontaine, T., Aïmanianda, V., & Latgé, J.P. 2014. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia* **178**: 371-377.
- Beauvais, A., Maubon, D., Park, S., Morelle, W., Tanguy, M., Huerre, M., Perlin, D.S., & Latgé, J.P. 2005. Two α (1-3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1531-1538.
- Beauvais, A., Schmidt, C., Guadagnini, S., Roux, P., Perret, E., Henry, C., Paris, S., Mallet, A., Prévost, M.-C., & Latgé, J.P. 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* **9**: 1588-1600.
- Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. 2010. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the

- submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 41-54.
- Cairns, T.C., Zheng, X.M., Zheng, P., Sun, J.B., & Meyer, V. 2019. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnol. Biofuels* **12**: 77.
- Camacho, E., Sepulveda, V.E., Goldman, W.E., San-Blas, G., & Nino-Vega, G.A. 2012. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* *AMY1* in a *Histoplasma capsulatum amy1* mutant, relates an α -(1,4)-amylase to cell wall α -(1,3)-glucan synthesis. *PLoS One* **7**: e50201.
- Choma, A., Wiater, A., Komaniecka, I., Paduch, R., Pleszczynska, M., & Szczodrak, J. 2013. Chemical characterization of a water insoluble (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydr. Polym.* **91**: 603-608.
- Cronenberg, C.C.H., Ottengraf, S.P.P., Vandenheuvel, J.C., Pottel, F., Ziele, D., Schugerl, K., & Bellgardt, K.H. 1994. Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles. *Bioprocess Eng.* **10**: 209-216.
- Driouch, H., Hansch, R., Wucherpfennig, T., Krull, R., & Wittmann, C. 2012. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **109**: 462-471.
- Driouch, H., Sommer, B., & Wittmann, C. 2010. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol. Bioeng.* **105**: 1058-1068.
- Fontaine, T., Beauvais, A., Loussert, C., Thevenard, B., Fulgsang, C.C., Ohno, N., Clavaud, C., Prevost, M.C., & Latgè, J.P. 2010. Cell wall α 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 707-712.
- Fontaine, T., Delangle, A., Simenel, C., Coddeville, B., Van Vliet, S.J., Van Kooyk, Y., Bozza, S., Moretti, S., Schwarz, F., Trichot, C., *et al.* 2011. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **7**: e1002372.
- Gomi, K., Iimura, Y., & Hara, S. 1987. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2549-2555.
- Gonciarz, J., & Bizukojc, M. 2014. Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. *Eng. Life Sci.* **14**: 190-200.
- Gow, N.A.R., Latge, J.P., & Munro, C.A. 2017. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* **5**: FUNK-0035-2016.
- Grün, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., Sietsma, J.H., Klis, F.M., Kamerling, J.P., & Vliegthart, J.F. 2005. The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**: 245-257.
- Gravelat, F.N., Beauvais, A., Liu, H., Lee, M.J., Snarr, B.D., Chen, D., Xu, W., Kravtsov, I., Hoareau, C.M., Vanier, G., *et al.* 2013. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal beta-glucan from the immune system. *PLoS Pathog.* **9**: e1003575.
- Guo, M.Q., Hu, X., Wang, C., & Ai, L., (2017) Polysaccharides: structure and solubility. In: *Solubility of Polysaccharides*. Z. Xu (ed). London: IntechOpen, pp. 7–21.
- Hattori, T., Munezane, S., Kato, R., & Kawauchi, T. 2009. Evaluation of colloidal titration with potassium poly(vinylsulfate) to determine the degree of chitosan deacetylation. *Chitin Chitosan Res.* **15**: 13-19.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* **95**: 641-655.
- He, X.X., Li, S.N., & Kaminskyj, S.G.W. 2014. Characterization of *Aspergillus nidulans* α -glucan synthesis: roles for two synthases and two amylases. *Mol. Microbiol.* **91**: 579-595.
- Henry, C., Latgè, J.P., & Beauvais, A. 2012. α 1,3 Glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **11**: 26-29.
- Henry, C., Li, J., Danion, F., Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Beau, R., Jouvion, G., Latgè, J.P., & Fontaine, T. 2019. Two KTR mannosyltransferases are responsible for the biosynthesis of cell wall mannans and control polarized growth in *Aspergillus fumigatus*. *mBio* **10**: e02647-02618.
- Hochstenbach, F., Klis, F.M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P.J., & Klausner, R.D. 1998. Identification of a putative α -glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9161-9166.
- Hotop, S., Moller, J., Niehoff, J., & Schugerl, K. 1993. Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivation. *Process Biochem.* **28**: 99-104.
- Jeenor, S., Anantayanon, J., Panchanawaporn, S., Chutrakul, C., & Laoteng, K. 2019. Morphologically engineered strain of *Aspergillus oryzae* as a cell chassis for production development of functional lipids. *Gene* **718**: 144073.
- Johnson, A.R. 1971. Improved method of hexosamine determination. *Anal. Biochem.* **44**: 628-635.
- Kang, X., Kirui, A., Muszynski, A., Widanage, M.C.D., Chen, A., Azadi, P., Wang, P., Mentink-Vigier, F., & Wang, T. 2018. Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nat. Commun.* **9**: 2747.
- Kelly, S., Grimm, L.H., Hengstler, J., Schultheis, E., Krull, R., & Hempel, D.C. 2004. Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **26**: 315-323.
- Krull, R., Wucherpfennig, T., Esfandabadi, M.E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D.C., Kampen, I., Kwade, A., & Wittmann, C. 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J. Biotechnol.* **163**: 112-123.
- Latgè, J.P. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**: 863-872.
- Latgè, J.P., & Beauvais, A. 2014. Functional duality of the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 111-117.
- Lee, M.J., Geller, A.M., Bamford, N.C., Liu, H., Gravelat, F.N., Snarr, B.D., Le Mauff, F., Chabot, J., Ralph, B., Ostapska, H., *et al.* 2016. Deacetylation of fungal exopolysaccharide mediates adhesion and biofilm formation. *mBio* **7**: e00252-00216.
- Lee, M.J., Gravelat, F.N., Cerone, R.P., Baptista, S.D., Campoli, P.V., Choe, S.I., Kravtsov, I., Vinogradov, E., Creuzenet, C., Liu, H., *et al.* 2014. Overlapping and distinct roles of *Aspergillus fumigatus* UDP-glucose 4-epimerases in galactose metabolism and the synthesis of galactose-containing cell wall polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **289**: 1243-1256.
- Liao, W., Liu, Y., & Chen, S. 2007a. Studying pellet formation of a filamentous fungus *Rhizopus oryzae* to enhance organic acid production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **137-140**: 689-701.
- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. 2007b. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*.

- Bioresour. Technol. **98**: 3415-3423.
- Limón, M.C., Pakula, T., Saloheimo, M., & Penttilä, M. 2011. The effects of disruption of phosphoglucose isomerase gene on carbon utilisation and cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Microb. Cell Fact.* **10**: 40.
- Liu, Y., Liao, W., & Chen, S. 2008. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnol. Bioeng.* **99**: 117-128.
- Lopez, J.L.C., Perez, J.A.S., Sevilla, J.M.F., Porcel, E.M.R., & Chisti, Y. 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* **116**: 61-77.
- Loussert, C., Schmitt, C., Prevost, M.C., Balloy, V., Fadel, E., Philippe, B., Kauffmann-Lacroix, C., Latge, J.P., & Beauvais, A. 2010. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* **12**: 405-410.
- Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K., & Nakajima, T. 2005. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 778-788.
- Marion, C.L., Rappleye, C.A., Engle, J.T., & Goldman, W.E. 2006. An α -(1,4)-amylase is essential for α -(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Microbiol.* **62**: 970-983.
- Maubon, D., Park, S., Tanguy, M., Huerre, M., Schmitt, C., Prevost, M.C., Perlin, D.S., Latgè, J.P., & Beauvais, A. 2006. *AGS3*, an α (1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genet. Biol.* **43**: 366-375.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., Zhang, S., Sano, M., Nakayama, M., Gomi, K., & Abe, K. 2016. Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall α -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1853-1863.
- Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., & Gomi, K. 2008. A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 878-889.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., & Takagi, M. 1996. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 442-450.
- Nair, R.B., Lennartsson, P.R., & Taherzadeh, M.J. 2016. Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. *AMB Express* **6**: 31.
- Nielsen, J., Johansen, C.L., Jacobsen, M., Krabben, P., & Villadsen, J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol. Prog.* **11**: 93-98.
- Nielsen, J., & Krabben, P. 1995. Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 588-598.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* **22**: 189-259.
- Porcel, E.M.R., Lopez, J.L.C., Perez, J.A.S., Sevilla, J.M.F., & Chisti, Y. 2005. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochem. Eng. J.* **26**: 139-144.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-Garcia, S., Braus, G.H., Feldbrugge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kamper, J., Kuck, U., *et al.* 2018. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82**: e00068-00017.
- Shih, T.-H., Liou, W.W., Shabbir, A., Yang, Z., & Zhu, J. 1995. A new k - ϵ eddy viscosity model for high reynolds number turbulent flows. *Comput. Fluids* **24**: 227-238.
- Takahashi, J., & Yamada, K. 1959. Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture. Part II. On the two types of pellet formation in the shaking culture. *J. Agr. Chem. Soc.* **33**: 707-710.
- Terayama, H. 1952. Method of colloid titration (a new titration between polymer ions). *J. Polym. Sci.* **8**: 243-253.
- Tokashiki, J., Hayashi, R., Yano, S., Watanabe, T., Yamada, O., Toyama, H., & Mizutani, O. 2019. Influence of α -1,3-glucan synthase gene *agsE* on protoplast formation for transformation of *Aspergillus luchuensis*. *J. Biosci. Bioeng.* **128**: 129-134.
- van der Kaaij, R.M., Janecek, S., van der Maarel, M.J., & Dijkhuizen, L. 2007. Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal α -amylase enzymes. *Microbiology* **153**: 4003-4015.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., & Herwig, C. 2018. The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**: 2997-3006.
- Wucherpfennig, T., Hestler, T., & Krull, R. 2011. Morphology engineering-osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb. Cell Fact.* **10**: 58.
- Yoshimi, A., Miyazawa, K., & Abe, K. 2016. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1700-1711.
- Yoshimi, A., Miyazawa, K., & Abe, K. 2017. Function and biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in fungi. *J. Fungi* **3**: 63.
- Yoshimi, A., Sano, M., Inaba, A., Kokubun, Y., Fujioka, T., Mizutani, O., Hagiwara, D., Fujikawa, T., Nishimura, M., Yano, S., *et al.* 2013. Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: *AgsB* is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One* **8**: e54893.
- Zhang, J., & Zhang, J. 2016. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**: 1066-1077.
- Zhang, S., Sato, H., Ichinose, S., Tanaka, M., Miyazawa, K., Yoshimi, A., Abe, K., Shintani, T., & Gomi, K. 2017. Cell wall α -1,3-glucan prevents α -amylase adsorption onto fungal cell in submerged culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* **124**: 47-53.
- Zhou, Y., Du, J., & Tsao, G.T. 2000. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**: 779-790.

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

小林 哲夫

名古屋大学大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Elucidation of signal transduction and gene regulation mechanisms related to priority determination of polysaccharide utilization in filamentous fungi

Tetsuo Kobayashi

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601

Production of polysaccharide degrading enzymes in filamentous fungi is generally under regulation of carbon catabolite repression (CCR), however, sensitivity to CCR differs depending on the enzyme type; for example, cellulases are more sensitive than amylases. Strength of CCR also differs depending on the repressing carbon source. Thus, the production is finely regulated although the mechanisms underlying the complex regulation remains to be elucidated. CCR is mediated by the transcription factor CreA as well as by PkaA (cAMP-dependent protein kinase) and GanB (*Gα*; α -subunit of trimeric G protein) in *Aspergillus nidulans*. The deubiquitinase CreB is also required for CCR. To further understand mechanisms of CCR, we compared the effects of *creA* deletion with deletion of *pkaA* and *ganB* genes as well as *creB*. This study revealed that PkaA and GanB participate in CreA-independent CCR and that contribution of CreA, PkaA, and GanB in CCR differs depending on the inducers, repressing carbon sources, the enzyme types and culture conditions (plate or submerged). It also revealed that CreB functions independently of GanB. In addition, we identified a promising candidate of PkaA substrate that regulates CCR.

Key words: *Aspergillus*, polysaccharide degrading enzyme, carbon catabolite repression, cAMP signaling

緒 言

微生物は一般的にカーボンカタボライト抑制 (carbon catabolite repression, CCR) というシステムを持っており、これにより容易に代謝できる炭素源の存在下では、ほかの炭素源の資化が抑制される。従って、CCRは代謝の容易さに基づいて炭素源資化の優先順位を決定するシステムである。糸状菌は極めて多種の炭素源を利用可能であるため、CCRも複雑であることが予想される。糸状菌のCCRシステムを構成する因子として最初に同定されたのは、*Aspergillus nidulans*の転写抑制因子 CreAであり (Dowzer & Kelly, 1989)、その後ほかの糸状菌においても本因子のオルソログがCCRに関わるこ

とが報告された (Ebbole, 1998; Tonukari *et al.*, 2003; Tudzynski *et al.*, 2000)。CreAが転写抑制するのは多数の炭素源代謝に関わる遺伝子であり、その中には産業上重要なアミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼなどの多糖分解酵素も含まれる。CreAの活性は細胞質と核の間の移動により制御されており、抑制炭素源の存在下では核に局在するが、非存在下では核から排出されて分解される (Brown *et al.*, 2013; de Assis *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2018)。この核からの排出にはプロテインキナーゼの SnfA や SchA が関与している (Brown *et al.*, 2013)。一方、cAMP 依存性プロテインキナーゼ PkaA は SnfA の機能を阻害すると報告されている (de Assis *et al.*, 2015)。

CreA 依存的システムが CCR の唯一のシステムではない。脱ユビキチン化酵素 CreB やこれと相互作用する CreC をコードする遺伝子の機能欠損で CCR からの脱抑

E-mail: koba@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp
共同研究者：國武絵美 (三重大学大学院生物資源学研究所)

制が起こり (Boase *et al.*, 2003; Lockington & Kelly, 2002), これらは当初は CreA の安定性を制御すると考えられていた。しかし, 最近の報告では CreA のユビキチン化が見られないことや (Alam *et al.*, 2017), *creB* の変異や破壊が CreA の安定性に影響を与えないこと (Ries *et al.*, 2016; Tanaka, *et al.*, 2018), *creA* と *creB* の二重破壊株で単独破壊株より高いアミラーゼ, キシラナーゼ, β -グルコシダーゼ生産が見られることなどから (Ichinose *et al.*, 2014, 2018), CreA と CreB は独立して CCR に関与すると考えられている。 *creB* や *creC* 変異のサプレッサー変異株から同定されたアレクチン様タンパク質 CreD とユビキチン化酵素 HulA も CCR に関わっている (Boase & Kelly, 2004)。

これまでに糸状菌における CCR に関して数多の報告があるが, ほとんどがグルコースを代表的な抑制炭素源として用いている。しかし, ほかに多くの炭素源が CCR を引き起こし, その程度は抑制炭素源の種類や標的遺伝子によって変化する。なぜ, このようなことが起こるかについては, CCR に関する知見が十分でないため明らかでない。我々は, PkaA が明らかに CreA とは独立して CCR に関わることを見出したため, 本研究では cAMP シグナリングと CreA による CCR との違いや CreB との関係について, 複数の抑制炭素源や複数の多糖分解酵素を対象として検討した。

実験方法

CCR 関連因子の遺伝子破壊

Aspergillus nidulans ABPU1 株 (*biA1 pyrG89; wA3; argB2; pyroA4*) を親株として遺伝子破壊を行った (Motoyama *et al.*, 1997)。本株は, ビオチン, ウリジン, アルギニン, ピリドキシン要求性の変異株である。 *A. nidulans* ABU 株は ABPU1 株の *pyroA4* を野生型 *pyroA* と交換した株である。遺伝子破壊用のプラスミド作製は以下のように行った。まず, *Aspergillus* genome database (AspGD, <http://www.aspgd.org>) 上の配列データをもとにプライマーを設計し, 候補遺伝子の構造遺伝子部分の上流約 1kb と下流約 1kb, およびマーカー遺伝子を KOD Fx Neo DNA ポリメラーゼ (東洋紡(株), 大阪) をもちいて PCR で増幅し, これらを制限酵素で 1カ所切断した pBluescript II KS(+) と混合し, GeneArt Seamless Cloning and Assembly (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) あるいは In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ(株), 滋賀) で処理した。これを用いて *E. coli* XL1-Blue あるいは DH5 α を形質転換して, 破壊カセットを持つプラスミド (破壊用プラスミド) を得た。破壊カセットは上流断片と下流断片の間にマーカー遺伝子が挿入された構造を持っている。ただし, *pkaA* 破壊株については従来の制限酵素とリガーゼを用いた方法で破壊用プラスミドを得た。マーカー遺伝子としては *A. nidulans* の *pyroA* あるいは *A. oryzae* の *pyrG* 遺伝子を用いた。

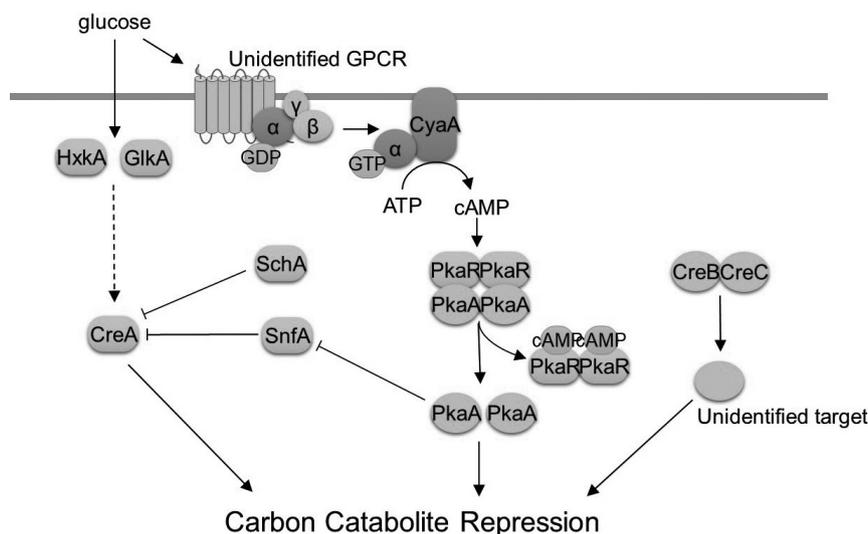


Fig. 1 CCR mechanism in *A. nidulans*. HxkA; hexokinase, GlkA; glucokinase, GPCR; G-protein coupled receptor, PkaR; regulatory subunit of PkaA. α , β , and γ denote α , β , and γ , subunits of trimeric G protein, namely GanB, SfaD, and GpgA, respectively.

破壊用プラスミドを制限酵素で一カ所切断し、これをプロトプラスト法により *A. nidulans* に導入した。ピリドキシン要求性あるいはウリジン要求性が回復した形質転換株の中から、相同組み換えにより標的遺伝子が破壊された株をPCRにより選択し、最終的にサザンブロッティングにより目的部位以外に破壊カセットの挿入がないことを確認した。なお、*creA/pkaA* 二重破壊株、および *ganA*, *ganB*, *fadA* 破壊株の作製にはマーカーリサイクリング法を用いた (Kunitake *et al.*, 2019)。マーカーリサイクリング用に特別に設計した破壊株カセットは、上流、*AopyrG*, 上流、下流と順次連結した構造を有している。これを用いてウリジン要求性の回復により第一段階の破壊株を取得し、フルオロオロチン酸耐性を指標として二つの上流配列間の相同組み換えで *AopyrG* が脱落した破壊株を取得した。すなわち、上記の破壊株はウリジン要求性である。*creA/ganB* 二重破壊株は、このように作製した *ganB* 遺伝子破壊株を親株とし、*AopyrG* をマーカーとして *creA* 遺伝子を破壊することによって作製した。

プレートアッセイ

多糖と抑制炭素源を含む最少培地に各菌株の分生子懸濁液 (分生子数 10^4) をスポットし、37°C で3日間培養した。抑制炭素源の濃度は1%とした。また、コロニーの巨大化を防ぐために0.1%のTritonX-100を培地に添加した。アミラーゼでは1%デンプンを用い、培養後にデンプンの分解をヨードデンプン反応により検出した。セルラーゼでは、多糖として1%のカルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose, CMC) を用い、培養後にプレートを0.1%のコンゴレッド (Congo Red) で染色、その後0.8M NaCl溶液で脱色し、CMC分解の指標となるハローを可視化した。キシラナーゼでは、0.05% AZCL-キシランを用い誘導物質として10mM キシロースを添加した。AZCL-キシランの分解により青色のハローとしてキシラナーゼ活性が可視化される。マンナナーゼでは、ガラクトマンナンを主成分とする locust bean gum を0.5%の濃度で用い、培養後にエタノールを重層して高分子の多糖を沈殿させることにより、マンナナーゼ活性を可視化した。なお、プロテアーゼでは1%のカゼインプレートを用いて37°Cで5日間培養し、不溶性のカゼインの分解消失を指標として活性を検出した。

セルラーゼのザイモグラフィ

培養上清を0.1% CMCを含有したゲルを用いた native-PAGE に供し、プレートアッセイと同様にコンゴレッド染色を行って活性バンドを可視化した。

酵素活性測定

前培養した菌体を誘導物質、抑制物質を含む最少培地に植菌し、37°Cで6時間および12時間培養後の培養上清の酵素活性を測定した。キシラナーゼでは誘導物質として1%キシロース、抑制物質として1%グルコースを用い、マンナナーゼでは誘導物質として0.5% locust bean gum、抑制物質として1%グルコースを用いた。活性測定の基質としてはキシラナーゼでは0.5% Azo-Xylan、マンナナーゼでは0.5% Azo-Carob Galactomannan を用い、50mM コハク酸緩衝液 (pH5.5) 中40°Cで反応させた。1単位の活性を595nmの吸光度を一分間に0.1上昇させる酵素量と定義した。

転写解析

前培養した *A. nidulans* の菌体をフィルターろ過により集菌し、炭素源を含まない最少培地でよく洗浄した後、湿重量0.4gの菌体を最少培地40mLに懸濁し、37°Cで本培養した。その後フィルターろ過で菌体を回収し、液体窒素で凍結した。凍結菌体を凍結破砕器具SK-ミル (フナコシ株, 東京) を用いて粉碎し、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて total RNA を抽出した。cDNA合成のための逆転写反応には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株) を使用した。RT-qPCRの機器には StepOne (Thermo Fisher Scientific Inc.)、反応試薬には THUNDERBIRD SYBR qPCR (東洋紡株) を使用した。内部標準遺伝子として *actin* 遺伝子 (*actA*) を用い、定量対象遺伝子の *actA* に対する相対量を算出した。

結果および考察

cAMP シグナリング経路による CreA 非依存的な CCR

CreA は CCR に関与する転写抑制因子であり、グルコースのような易資化性の炭素源の存在下で他の炭素源資化に関わる多様な遺伝子の発現抑制に関与する。しかし、*creA* 遺伝子破壊株ではプレート培養においてアミラーゼ生産のグルコース抑制は解除されるものの、セルラーゼ生産は解除されない (Fig.2)。このような違いは CreA に依存しない CCR システムの存在を示している。一方、我々はセルラーゼ遺伝子の CCR に関わるプロテインキナーゼが存在するのではないかと考え、約100株からなるプロテインキナーゼ遺伝子破壊株ライブラリーを探索したところ、*pkaA* 破壊株においてセルラーゼ生産抑制が大きく解除されることを見出した (de Souza *et al.*, 2013)。破壊株ライブラリーで用いている親株の遺伝型が、我々が通常用いている菌株と異なるため、

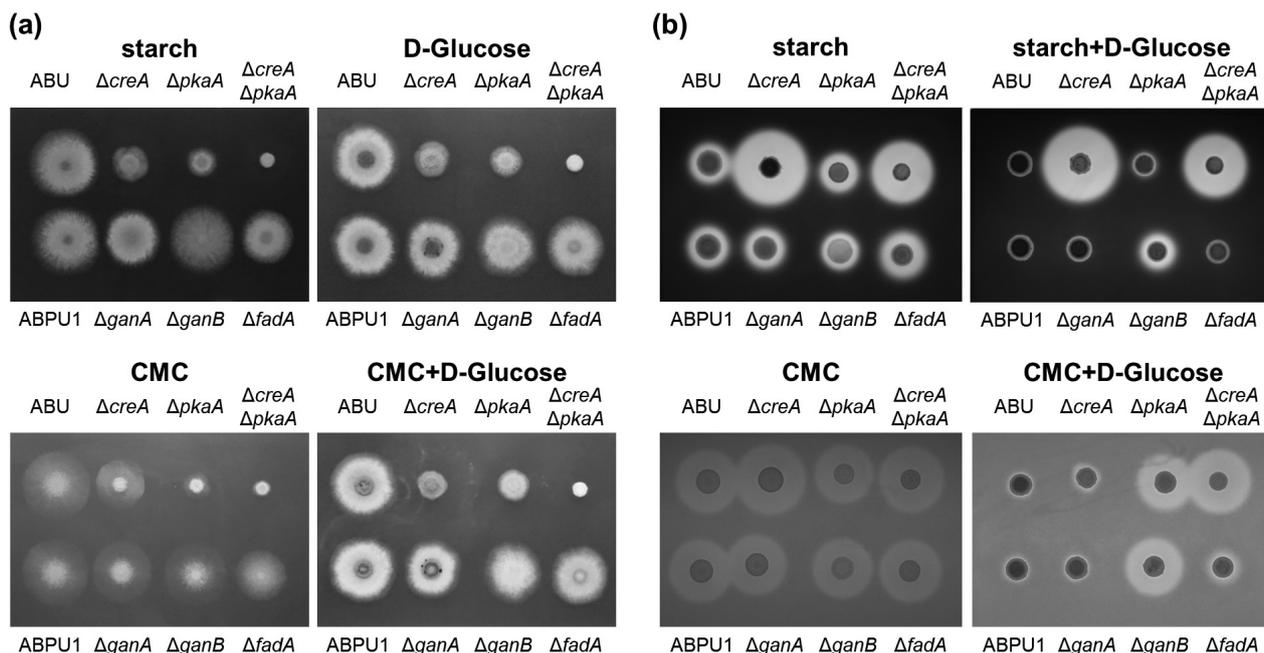


Fig. 2 Growth (a) and amylase and cellulase production (b) of the deletion strains on agar plates containing starch or CMC with D-glucose.

pkaA 破壊株を新たに作製して *creA* 破壊株と比較した (Fig. 2). 図に示すようにグルコースを炭素源としたプレートにおいて, *pkaA* 破壊株は *creA* 破壊株と同様に著しい生育低下を示した. 一方, *creA* 破壊株とは逆に *pkaA* 破壊株ではアミラーゼ生産抑制は解除されないのに対し, セルラーゼ生産抑制は大きく解除された. PkaA は CreA の核局在を部分的に制御すると報告されていたが (de Assis *et al.*, 2015), Fig. 2 の結果はむしろ CreA と PkaA が独立して CCR に関与することを示している. *pkaA* と *creA* の二重破壊株では, *pkaA* 破壊株と比較してセルラーゼ生産の指標であるハローの直径が大きくなっているため, 弱いながら CreA もセルラーゼの CCR に関与していると示唆された.

cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ (CyaA) の活性は三量体 G タンパク質により制御されている. そこで, 三量体 G タンパク質の α サブユニット (Ga) をコードする 3 種の遺伝子, *ganA*, *ganB*, *fadA* の破壊による生育と CCR への影響を解析した (Fig. 2). グルコースを単一炭素源としての生育への影響はいずれの破壊株においても微弱であった. また, アミラーゼ生産抑制は *pkaA* 破壊株と同様にいずれの破壊でもほとんど解除されなかったが, セルラーゼ生産抑制の明らかな解除が *ganB* 破壊株で認められた. すなわち, グルコース存

在下で GanB が CyaA を活性化して cAMP が生成し, その結果, PkaA が調節サブユニットの PkaR から解離して活性化するとセルラーゼの CCR が引き起こされると考えられた. なお, *cyaA* 破壊株は著しい生育低下を示すものの致死ではないとされている (Fillinger *et al.*, 2002). そこで我々も取得を試みたが成功に至っていない.

三量体 G タンパク質は G プロテイン共役受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) によりその活性が制御される. *A. nidulans* のゲノムには 16 種の GPCR とされる遺伝子がコードされている. この中で CCR に関与するものを同定するため, これまで 8 種 (*gprA*, *B*, *C*, *D*, *F*, *H*, *I*, *M*) の遺伝子破壊株を作製したが未だ同定に至っていない. 最近, グルコースに応答した cAMP レベルの上昇に関わるのは *gprH*, *I*, *M* であると報告とされている (dos Reis *et al.*, 2019). 本報告によるとこれら遺伝子の単独破壊でグルコース応答性の cAMP レベルの上昇がほぼ消失する. しかし, 我々が取得した *gprH* と *gprI* 破壊株では CCR の解除は起こらなかった. CCR 関連 GPCR が同定できないのは機能重複のためと考えていたが, 不思議なことに上記報告では二重破壊株, 三重破壊株でグルコース応答が復帰するとされており, 破壊株中心の現在のアプローチでは CCR に関わる GPCR の同定は困難と考えられた.

cAMP シグナリングを介したセルラーゼ遺伝子発現のグルコース抑制

cAMP シグナリングがセルラーゼ生産の抑制に関与することが明らかとなったが、定量性に乏しいプレートアッセイの結果であるため、液体培養でのセルラーゼ遺伝子のCCRについてRT-qPCRを用いて定量的に解析した。セルラーゼ遺伝子発現の誘導物質としてはセロビオースを用い、その分解を抑えるために β -グルコシダーゼ阻害剤の2-デオキシノジリマイシン (DNJ) を添加してある。また、抑制物質としてはグルコースアナログの2-デオキシグルコースを用いた。誘導物質、抑制物質添加から90分後のエンドグルカナーゼA遺伝子 (*eglA*) とセロビオヒドロラーゼA遺伝子 (*cbhA*) の転写量を Fig.3 に示す。いずれの遺伝子についても遺伝子破壊による脱抑制のプロファイルはほぼ同じであった。プレートアッセイと異なり、両遺伝子とも *creA* 破壊株で脱抑制が観察された。転写量は対数正規分布に近いとされているため図の縦軸は対数値であるが、アクチン遺伝子 (*actA*) で標準化した相対転写量そのものに換算すると、*eglA* の抑制条件下の転写量は *creA* 破壊株で親株 (WT) の34倍、*cbhA* では24倍である。しかし、非抑制条件の転写量と比べると例えば *eglA* で14分の1、*cbhA* で18分の1に過ぎなかった。一方、*pkaA* 破壊株では *eglA* の抑制条件下の転写量は (WT) の59倍、*cbhA* では50倍と脱抑制の程度は *creA* 破壊株より大きい。非抑制条件と比較するとそれぞれ7分の1と5分の1で

あり、こちらも部分的脱抑制に過ぎなかった。プレートアッセイの結果と比較して考えると、以上の結果は培養条件の違いによって *CreA* と *PkaA* のCCRへの関与の程度が変わってくる可能性を示している。二重破壊株における抑制条件下の *eglA* 転写量は親株 (WT) の135倍、*ganB* 破壊株では89倍であり、*cbhA* はそれぞれ155倍と123倍であった。しかし、いずれの破壊株においても完全な脱抑制は見られず、最も脱抑制の程度が大きい二重破壊株でも抑制条件の転写量はどちらの遺伝子についても非抑制条件の3分の1程度にとどまった。これはほかにも独立してCCRを引き起こすシステムが存在することを示唆している。

誘導物質をボールミル粉碎セルロース (Ball Milled Cellulose; BMC)、抑制物質をグルコースとして、液体培養でのエンドグルカナーゼ生産と *eglA*、*cbhA* 発現を解析した結果を Fig.4 に示す。エンドグルカナーゼ活性の検出はザイモグラフィにより行った。図の下の活性バンドが *EglA*、上の複数のバンドが糖鎖修飾の程度が異なる *EglB* である (Endo *et al.*, 2008)。プレート培養と大きく異なり、セルラーゼ生産への各破壊の影響はほぼ逆となった。すなわち、非抑制条件下では対象株 ABU と各破壊株の間に大きな違いはないが、抑制条件下においては *creA* 破壊株で遅延しながらも *EglA*、*EglB* の生産が認められた。これに対し *pkaA* 破壊株と *ganB* 破壊株では生産は認められなかった。一方、*creA* と *pkaA* の二重破壊株では抑制条件での *EglA* と *EglB* の生

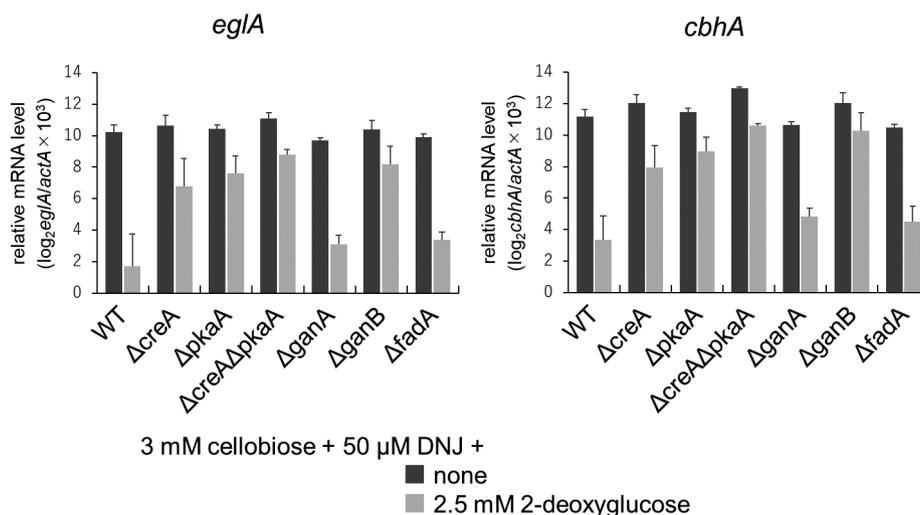


Fig. 3 Expression of *eglA* and *cbhA*, evaluated by RT-qPCR, under 3mM cellobiose-induced conditions with or without 2.5mM 2-deoxyglucose (2-DG). 2-Deoxynojirimycin (DNJ) was added to prevent cellobiose hydrolysis by β -glucosidase. Relative expression levels of the genes normalized with *actA* are shown by a logarithmic scale. Error bars indicate the standard errors of more than three independent experiments.

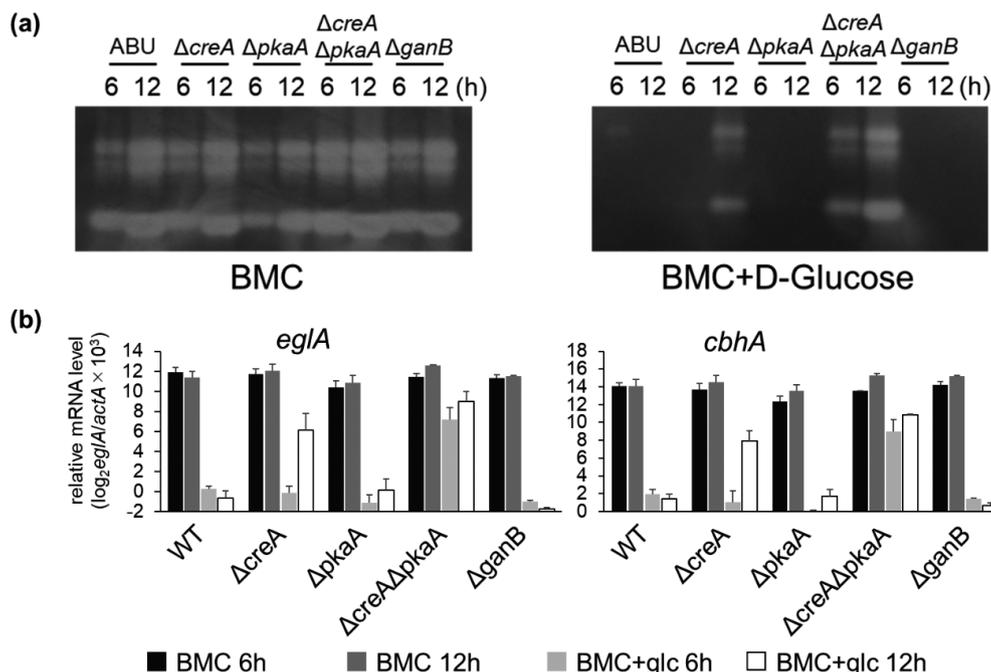


Fig. 4 Cellulase production and *egIA* and *cbhA* expression under 0.5% BMC (ball milled cellulose)-induced conditions with or without 1% D-glucose. Each strain was cultivated in the minimal medium containing BMC with or without D-glucose for 6 h and 12 h. Culture supernatant (15 μ L) of each deletion strain was subjected to zymography (a), and total RNA extracted from the mycelia was subjected to RT-qPCR analysis (b).

産が6時間で認められているため、両者は協調的かつ独立して生産抑制に関与していることは確認された。転写解析の結果も全く同様である。この結果は、プレート培養や液体培養という違いだけでなく、誘導物質の違いによっても CreA と PkaA の関与の程度が異なることを示している。セロビオースと BMC という誘導物質間での決定的な違いは、前者は直接の誘導物質であるのに対して、後者はセルロースが分解されないという点にある。セルロースからのセロビオース生成速度について各破壊株間で比較すれば、CreA による CCR と cAMP シグナリングによる CCR の違いの一端が明らかになると考えられる。

グルコース以外の単糖によるセルラーゼ遺伝子発現抑制への cAMP シグナリングの関わり

そもそも CCR とは炭素源のランキングに働くシステムであり、グルコース以外の様々な炭素源が抑制を引き起こすが、その程度は抑制炭素源の種類により異なる。そこで、*creA*, *pkaA*, *ganA*, *ganB*, *fadA* の破壊が各種単糖存在下での生育と CCR に与える影響をプレートアッセイにより解析した (Fig. 5)。生育への影響はガ

ラクトースを除いてグルコースの場合と同様であったが、ガラクトース単一炭素源では *pkaA* と *ganB* の破壊株で極端な生育低下が見られた。これはガラクトース資化に cAMP シグナリングが関わることを示唆している。また、キシロース単一炭素源での生育も不安定であり、植菌した分子数が少ないと著しい生育低下がたびたび見られた。CCR については、まず親株の ABPU1 や対象株の ABU でわかるようにフルクトース、マンノース、キシロースが強い抑制、ガラクトースとアラビノースが弱い抑制を引き起こした。フルクトースとマンノース抑制は *creA* と *pkaA* 破壊株でわずかに、二重破壊株で大きく解除され、*ganB* 破壊株ではその中間となった。キシロースとアラビノース抑制からの CCR 解除は *pkaA* 破壊により *creA* 破壊で大きく、キシロースの場合では *ganB* 破壊株は中間的であった。これはペントースによる抑制では CreA の役割が非常に大きいことを示唆している。興味深いことに、キシロースによる抑制は *fadA* 破壊株でもわずかに解除されていた。

セロビオースを誘導物質、各種単糖を抑制物質として転写解析を行った結果を Fig. 6 に示した。プレートアッセイと同じように、グルコース、フルクトース、マンノース

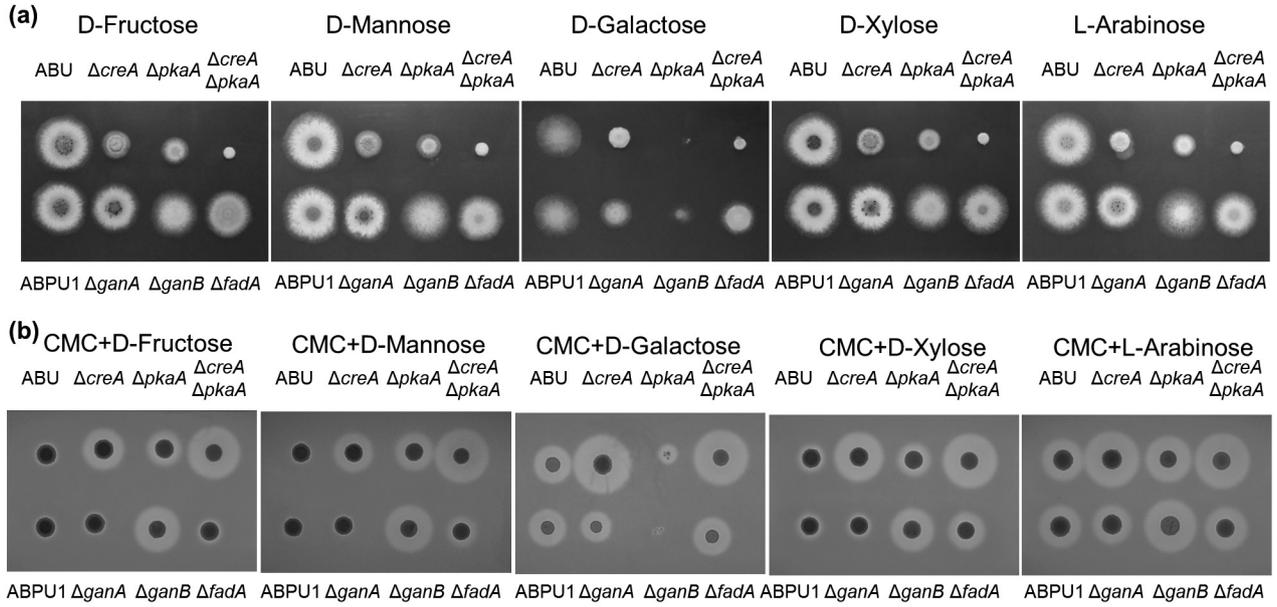
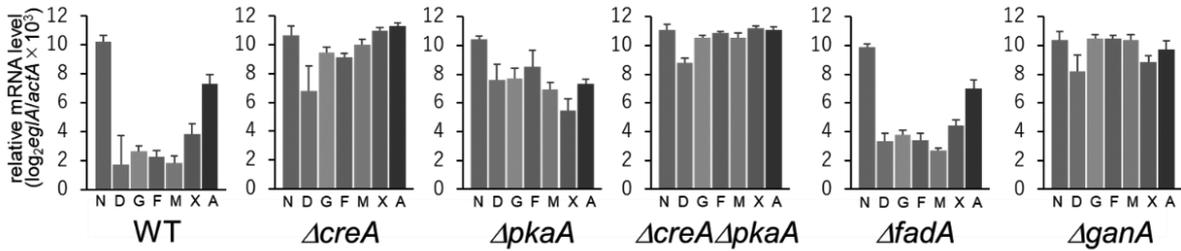
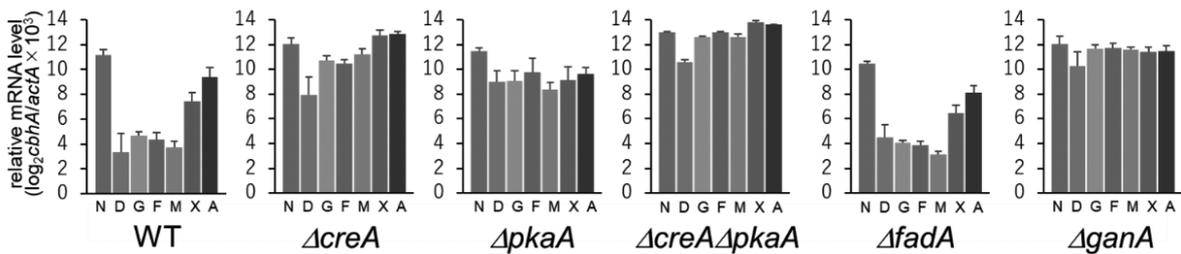


Fig. 5 Growth (a) on and repression of cellulase production (b) by various monosaccharides. Strains were cultured on minimal medium agar plates containing indicated sugars as carbon sources.

eglA



cbhA



3 mM cellobiose + 50 μ M DNJ +

N: none D: 2.5 mM 2-deoxyglucose

G: 30 mM glucose

F: 30 mM fructose

M: 30 mM mannose

X: 30 mM xylose

A: 30 mM arabinose

Fig. 6 Transcriptional analysis of *eglA* and *cbhA* under 3mM cellobiose-induced conditions in the presence of various repressing monosaccharides (30mM). 2-Deoxynojirimycin (DNJ) was added to prevent cellobiose hydrolysis by β -glucosidase. The data without the repressing carbon sources are the same as those used in Fig. 2. Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

スは強い抑制物質で、これらに比べてキシロースは弱く、アラビノースはより弱いことが示された。 *creA* 破壊株ではキシロースとアラビノースによる抑制は完全に解除され、グルコース、フルクトース、マンノースの抑制は部分的解除にとどまった。 *pkaA* 破壊株ではいずれの単糖の場合も部分的解除で、二重破壊株では全てについてほぼ完全に解除された。興味深いのは *ganB* 破壊株で、PkaAの上流因子と考えられるにも関わらずいずれの抑制単糖でも *pkaA* 破壊株を超える脱抑制を引き起こした。なお、2-デオキシグルコースはいずれの株でも抑制が強くて出ているが、これはほかの単糖が代謝されるのに対し、代謝されないアナログであるためと考えられる。

ganB 破壊株での脱抑制が *pkaA* 破壊株より強いという事実は、 *pkaA* の上流でシグナル伝達経路が分岐している可能性を示している。ほかの生物の情報を参考にするとホスホリパーゼCの可能性があったため、これをコードする *plcA*, *plcB* 破壊株の取得を試みたが成功していない。一方、cAMP結合タンパク質がほかにもあるのではと考えゲノム情報を探索したところ、FbxAがcAMP結合モチーフを持つことが明らかとなった。FbxAはF-box proteinに分類される。この一群のタンパク質はユビキチン化に関わるSCF複合体の構成因子で基質と結合する。 *fbxA* の破壊株ではキシラナーゼ発現が低下することが示されるとともに、CCRへの関与も示唆されていた (Colabardini *et al.*, 2012)。そこで *fbxA* 破壊株および本因子のcAMP結合モチーフを欠失した変異体の発現株を作製し、キシラナーゼ発現およびCCRについて解析したが有意な結果は得られないだけでなく、既報の結果の再現性も得られなかった。おそらく、実験条件に微妙な違いがあるものと思われる。

キシラナーゼ遺伝子のCCR

creA, *pkaA*, *ganA*, *ganB*, *fadA* の破壊がグルコースとキシロース存在下でのキシラナーゼのCCRに与える影響をプレートアッセイにより比較解析した (Fig.7)。抑制炭素源の非存在下やキシロース存在下で *pkaA* 破壊株でのキシラナーゼ生産が低下しているのは、前述したように本破壊株の生育がキシロース単一炭素源で不安定で、しばしば著しい生育低下を示すためと思われる。グルコース存在下では、 *ganA* 以外の全ての破壊株で脱抑制が認められた。キシロースはキシラナーゼ発現の誘導物質であるが、 *A. niger* で高濃度ではCreA依存的な抑制物質として働くことが報告されている (de Vries *et al.*, 1999)。従って、結果の解釈は難しいが、高濃度キシロース存在下で *A. nidulans* でも *creA* 破壊株だけでなく *ganB* 破壊株でも脱抑制が認められ、さらに興味深いことに *fadA* 破壊株で特に著しい脱抑制が観察された。この結果は、FadAが特にキシロースへの応答に重要な役割を持っていることを示唆している。 *fadA* 破壊株におけるキシロースからの脱抑制はセルラーゼ生産抑制でもプレートアッセイでわずかながら認められていた (Fig.5)。

1%キシロースを誘導物質とし、1%グルコースを抑制物質とした時の液体培養でのキシラナーゼ生産解析結果を Fig.8に示す。後述する転写解析と異なり誘導物質濃度が高いが、これは培養時間が6時間や12時間と長く、誘導物質の枯渇が起こるからである。実際に培養12時間においてキシロースの枯渇によると考えられるキシラナーゼ生産の低下が認められている。しかし、高濃度キシロースを誘導物質としたために、親株において誘導と抑制が同時に起こっている可能性がある。というのは親株 (ABPU1) と比較して全ての破壊株でグルコース非存在下でも非常に高いキシラナーゼ生産が認められるた

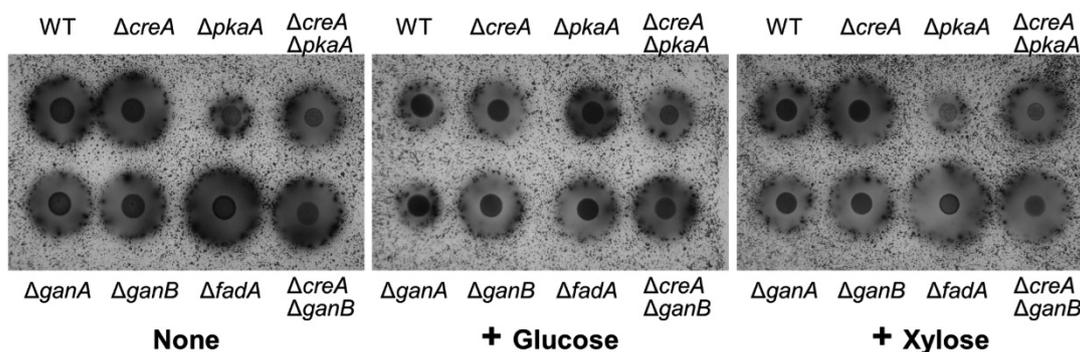


Fig. 7 Xylanase production on minimal medium agar plate containing 0.05 % AZCL-Xylan and 10mM xylose with or without 1 % of D-glucose or D-xylose.

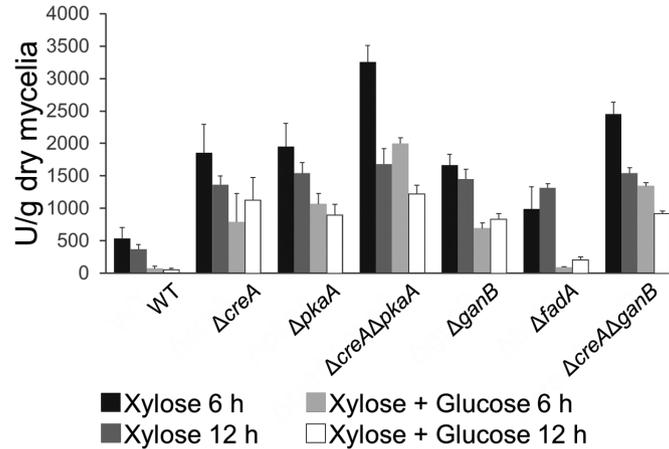


Fig. 8 Xylanase production of the deletion strains in submerged culture containing 1 % D-xylose with or without 1 % D-glucose.

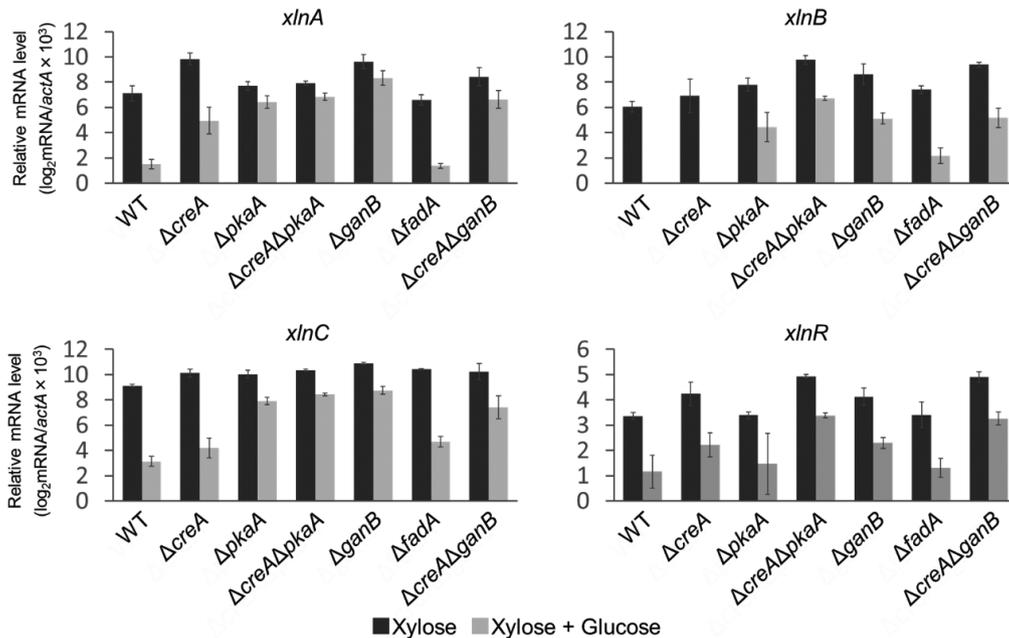


Fig. 9 Transcriptional analysis of *xlnA-C* and *xlnR* under 3 mM D-xylose-induced conditions in the presence of 30 mM D-glucose. Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

めである。グルコース添加条件ではプレートアッセイと異なり *fadA* 破壊株での脱抑制が大きく低下したが、ほかの破壊株では明瞭な脱抑制が認められた。 *creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊の効果はほぼ同等であり、 *creA* と *pkaA* や *creA* と *ganB* の二重破壊株においてさらに高い生産性が見られた。

転写解析の結果を Fig. 9 に示す。 *xlnA-C* はいずれもエンドキシラナーゼ遺伝子である。各遺伝子破壊の影響は遺伝子ごとに異なり、 *xlnA* は CreA と PkaA による協調的な制御、 *xlnB* と *xlnC* は主として PkaA に制御されていると考えられた。図では *xlnB* の CCR は全く *creA* に依存しないように見えるが、 *creA* 破壊株では親株 (WT)

の2倍程度の転写量であり, *xlnC*とほとんど変わらない。*fadA*破壊の影響が明確に見られたのは*xlnB*だけであった。XlnRはキシロースに応答したキシラーゼ遺伝子誘導を担う転写因子であり, *xlnA*と*xlnB*のCCRはCreA依存的な*xlnR*の転写抑制の結果であると報告されている (Tamayo *et al.*, 2008)。しかし, 我々の実験条件では破壊株ごとに2-4倍程度の発現変動はあるものの, 抑制条件での転写量はどの株においても非抑制条件の3分の1から4分の1であり, *creA*を含まないどの破壊においても明確な*xlnR*発現の脱抑制は認められなかった。

マンナーゼ遺伝子のCCR

creA, *pkaA*, *ganA*, *ganB*, *fadA*の破壊がマンナーゼ生産のCCRに与える影響をプレートアッセイにより解析した結果をFig.10(a)に示した。グルコース存在下では, *ganA*, *fadA*以外の全ての破壊株で明瞭な脱抑制

が認められた。一方, キシロース存在下では*pkaA*破壊株で脱抑制は認められず, むしろ親株(ABPU1)よりも低い生産量となった。*fadA*破壊株に関してはわずかな脱抑制が認められるようであるが, 定量性に乏しいプレートアッセイでは有意とは言い切れない。液体培養では, Fig.4のセルラーゼ生産と極めて類似したプロファイルを示した (Fig.10(b))。すなわち, 多糖のローカストビーンガム(LBG, ガラクトマンナンが主成分)を誘導物質, グルコースを抑制物質とした場合に, *creA*破壊株で生産が遅延しながらも脱抑制が見られるが, *pkaA*や*ganB*の破壊では脱抑制効果はなく, *creA*と*pkaA*の二重破壊でグルコース存在下での生産が早期に起こるといふ点である。

転写解析では, エンドマンナーゼをコードする*manB*と*manC*のグルコース抑制にはCreAとPkaAがセルラーゼと同様に独立的に関与し, キシロースによる

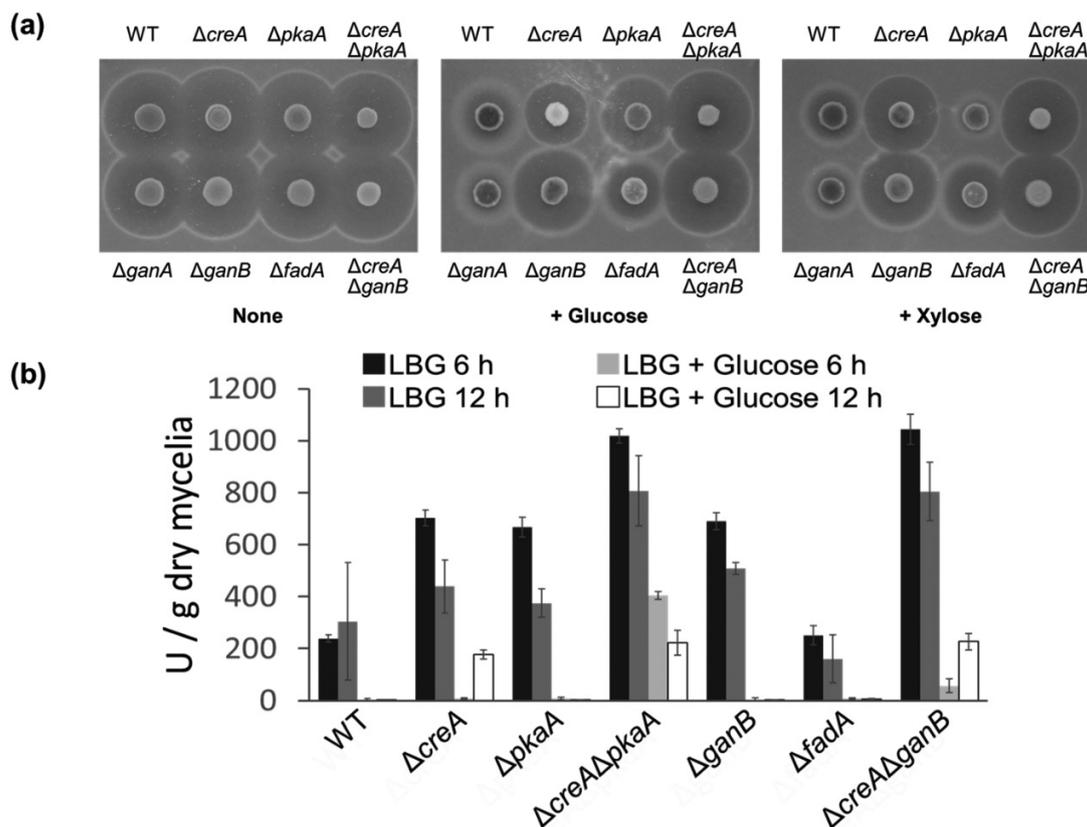


Fig. 10 Mannanase production on minimal medium agar plate containing 0.5% locust bean gum (LBG) with or without 1% of glucose or xylose (a) and in submerged culture containing 0.5% locust bean gum with or without 1% of D-glucose.

抑制はCreAが主要因子でPkaAは補助的に働くと考えられる結果となった (Fig. 11). これもセルラーゼ遺伝子の場合と類似している. なお, β -マンノシダーゼ遺伝子 *mndB* やマンナーゼ遺伝子の主要転写因子をコードする *manS* (未発表) では, 各株での多少の発現変動はあるものの, そもそも親株 (ABPU1) でのCCRがほとんど観察されなかった. 液体培養における酵素生産や転写解析において, 親株 (ABPU1) と *fadA* 破壊株以外の破壊株で非抑制条件下でも高い酵素生産や転写が起こったが, これは分解産物のマンノースによりCCRが引き起こされるためと思われる.

CCRに関わるPkaAの標的

上記のように, 実験条件や標的遺伝子によってCCR関連各因子遺伝子の破壊の影響が異なる. これはCCRのシステム自体の複雑性に加えて, 誘導物質や抑制物質の資化による濃度変化の影響も大きく受けているためと考えられる. しかし, 後者は自然界で常に起こっていることであり, だからこそ複雑なCCRシステムに至ったのだと考えざるを得ない. この複雑なシステムを理解す

るためには, 制御系をしっかりと理解しなければならない.

CCRに関わるPkaAの基質を同定するため, 出芽酵母におけるプロテインキナーゼA (PKA) の直接の基質とされるプロテインキナーゼであるYak1, Rim15のホモログ (YakA, SrrB) や酵母の凝集に関わる遺伝子の転写抑制因子Sfl1pホモログ (SflAと命名) の遺伝子破壊株, グルコーストランスポーターの転写抑制因子Rgt1 (必須遺伝子) ホモログ (AN1927) の高発現株などの解析を行ったが, いずれについても明確なCCRへの関与は認められなかった. そこで, cAMPシグナリングで制御されると考えられるCCR以外の表現型に着目した. プロテアーゼ生産である.

A. nidulans における主要菌体外プロテアーゼはPrtAで, その遺伝子発現は炭素源飢餓や窒素源飢餓で起こる (Katz *et al.*, 2008.). さらに, *prtA* の発現はGanBにより正に制御されると報告されている (Molnár *et al.*, 2006). グルコース応答に関わるGanBが炭素源飢餓条件下でのプロテアーゼの発現誘導に必要であるという点が奇異に感じられたため, 再現性を取るためにプロテアーゼ生産に与える *ganB* 破壊と *pkaA* 破壊の影響を確認し

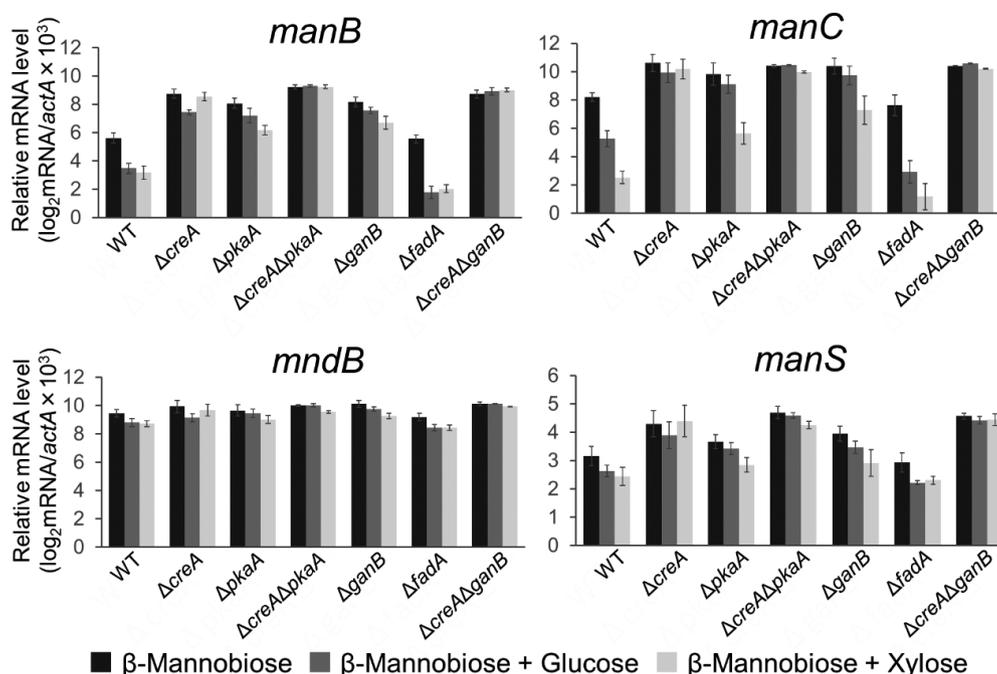


Fig. 11 Transcriptional analysis of *manB*, *manC*, *mndB*, and *manS* under 3mM mannobiose-induced conditions in the presence of 30mM D-glucose or D-xylose. Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

た (Fig.12 (a)). カゼインプレート上で親株 (ABPU1) ではプロテアーゼ生産を示すハローをわずかながら形成したが、確かに *ganB* 破壊株では消失し、さらには *pkaA* 破壊株でも消失していた。そこで、*sflA* 破壊株でのプロテアーゼ生産をプレートアッセイにより確認したところ、親株 (ABPU1) よりも生産性が向上していることが明らかとなった。*prtA* の発現解析を行ったところ、*ganB* と *pkaA* 破壊株ではほとんど発現が起こらないのに対し、*sflA* 破壊株では飢餓条件とカゼイン存在下で親株 (ABPU1) より発現量が大幅に増加していた (Fig.12 (b)). グルコース存在下での発現上昇は認められなかった。*prtA* の発現は CreA 依存的な CCR により制御されていることが報告されており (Katz *et al.*, 2008.), 我々もこれを確認している。したがって、これがグルコース存在下で発現上昇が起こらなかった原因と考えられる。飢餓条件下での cAMP レベルの上昇は報告されているので (dos Reis *et al.*, 2019), 飢餓条件において細胞壁の α -グルカンや β -グルカンの分解が起こって少量のグルコースが生成され、これにより GanB の活性化が起こるのではないかと考えている。

出芽酵母の Sfl1 は PKA である Tpk2 によりリン酸化されると DNA 結合を失うと報告されている (Conlan & Tzamarias, 2001). SflA は Sfl1 との全体の相同性は低い

がアミノ末端の DNA 結合ドメインは極めて相同性が高く、その直後に PKA のリン酸化部位と考えられる RRXS モチーフが存在する。SflA も同様な制御を受けていると仮定すると、PrtA によりリン酸化された SflA が DNA から解離し *prtA* の脱抑制が起こることになる。

イモチ病菌 *Magnaporthe oryzae* において、PKA 遺伝子の破壊による著しい生育阻害や病原性の消失が復帰した変異株の原因遺伝子が、*sfl1* ホモログの *Mosfl1* であることが明らかにされた (Li *et al.*, 2017). そこで、我々は *ganB* と *sflA* の二重破壊株の表現型も検討することとした。プレートアッセイの結果、*sflA* の破壊はセルラーゼ生産や生産抑制に全く影響を与えなかったが、二重破壊では *ganB* 破壊株で認められていた CCR の解除が完全に消失した (Fig.13 (a)). 転写解析においても、*ganB* 破壊株で脱抑制されていた *eglA* と *cbhA* の発現が、二重破壊株では再度 CCR の制御下となった。なお、このグラフの縦軸は対数ではなく対アクチン遺伝子あたりの相対発現量そのものである (Fig.13 (b)).

以上の結果を総合して考えられるモデルとしては、抑制炭素源の非存在下では SflA により抑制されていた未知遺伝子が、存在下では PkaA によるリン酸化で SflA が不活性化して脱抑制が起こり、CCR が引き起こされるというものである。しかし、この未知遺伝子の産物は

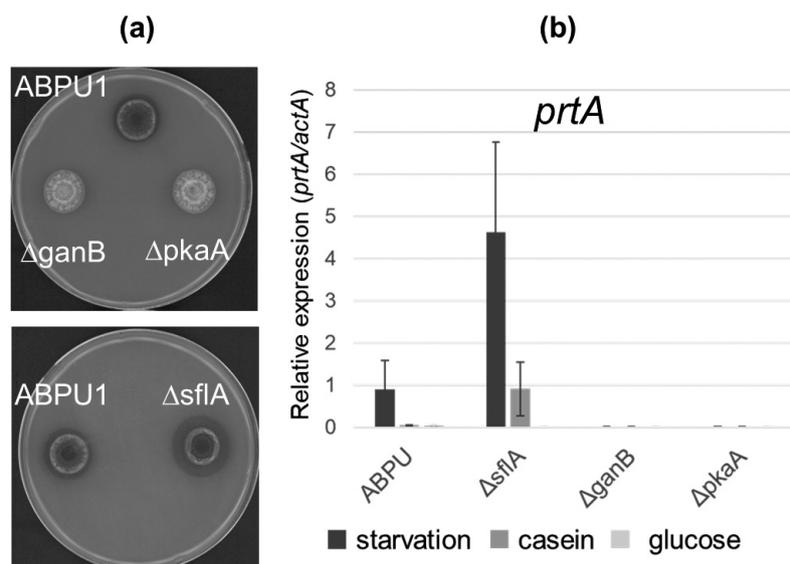


Fig. 12 Protease production of the deletion strains on agar plates containing casein (a), and transcriptional analysis of *prtA* without carbon source (starvation) and with casein or D-glucose (b). Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

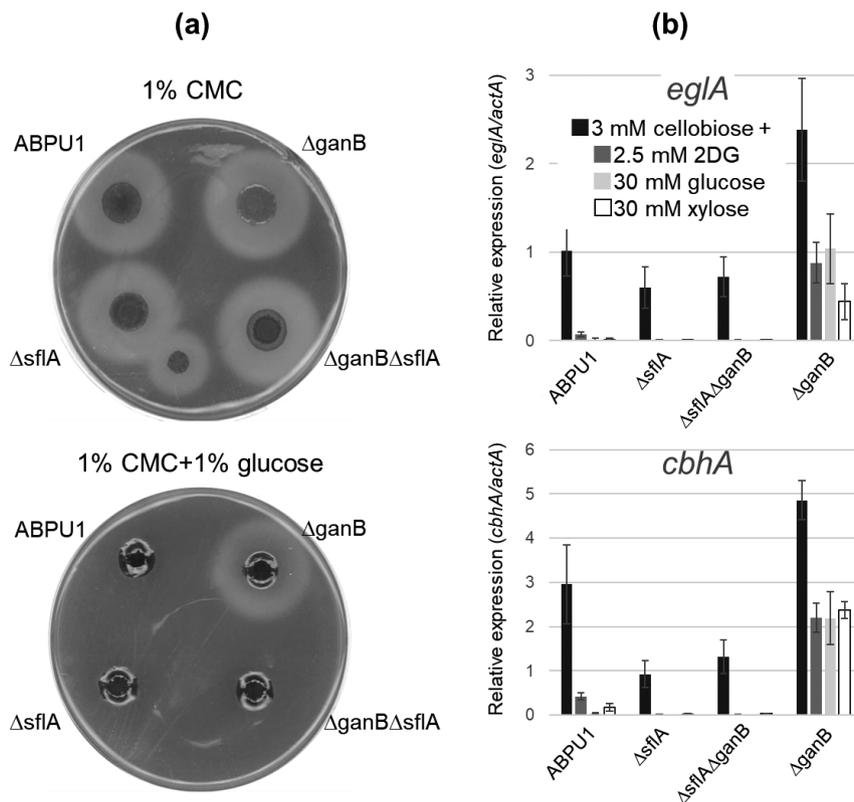


Fig. 13 Cellulase production of the deletion strains on agar plates containing CMC and CMC+D-glucose (a), and transcriptional analysis of *eglA* and *cbhA* under 3mM cellobiose-induced conditions with or without 2.5mM 2-DG, 30mM D-glucose or 30mM D-xylose (b). Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

翻訳されれば活性を持つとは考えられない。 *sflA* 破壊株や *sflA/ganB* 二重破壊株において抑制炭素源の非存在下におけるセルラーゼ遺伝子発現量低下は認められるとは言え、その低下の程度は2分の1から3分の1に過ぎないためである。未知遺伝子の産物が完全な活性を持つためには抑制炭素源の存在が必要であると考えられる。cAMP シグナリングによるCCRを理解するためにはこの未知の因子の同定が極めて重要であると考えられる。

脱ユビキチン化酵素 CreB と CCR

変異や破壊によってCCRが解除されると報告されている遺伝子の一つに *creB* がある。緒言に述べたように CreB は脱ユビキチン化酵素に分類されるタンパク質であり、CreC との複合体として機能する (Boase *et al.*, 2003; Lockington & Kelly, 2002)。当初 CreB は脱ユビキチン化により CreA を安定化するとのモデルが提唱されていたが、近年 CreA と CreB は独立してCCRに関わる

ことが示された (Alam *et al.*, 2017; Ichinose *et al.*, 2014, 2018; Ries *et al.*, 2016; Tanaka, *et al.*, 2018)。各種多糖分解酵素への関与を俯瞰的に見ようとする我々に類似した研究が見当たらなかったため、*creB* 破壊株についても解析を行った。グルコースを抑制炭素源としたプレートアッセイの結果、*creB* 破壊株ではアミラーゼとセルラーゼ生産の抑制解除が起こった (Fig.14 (a))。これは *creA*, *pkaA*, *ganB* の破壊株では認められなかった表現型である。これにより、CreA と CreB が独立してCCRに関わることが確認されるとともに、CreB が PkaA や GanB とともに独立して機能することが明らかとなった。さらに転写解析では、*creB* と *ganB* の二重破壊株で特にヘキソースによる転写抑制が相加的に解除されることも認められた (Fig.14 (b))。

CreB は真核生物に幅広く保存された脱ユビキチン化酵素であり、トランスポーターなどの膜タンパク質のエンドサイトーシスと分解に関わる。また、*A. nidulans* で

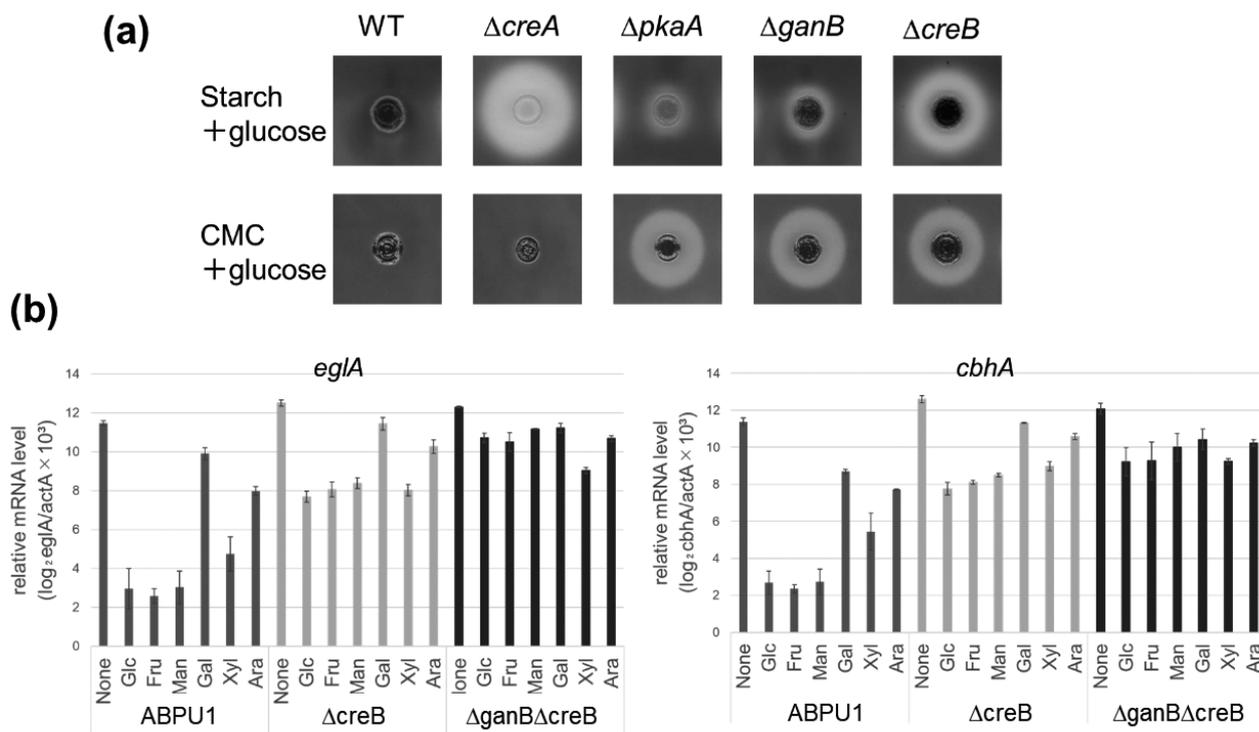


Fig. 14 Amylase and cellulase production of the deletion strains on starch or CMC agar plates in the presence of D-glucose (a), and transcriptional analysis of *eglA* and *cbhA* under 3mM cellobiose-induced conditions with or without various repressing monosaccharides (b). Error bars indicate the standard errors of three independent experiments.

はCreBとCreCのヘテロ二量体と考えられているが、動物や分裂酵母ではUSP46 (CreB), WDR48, WDR20 (CreC)のヘテロ三量体である (Hodul *et al.*, 2017). そこで、WDR48にあたる遺伝子をAspGDで探索したところ、AN10017が該当した。本遺伝子の破壊株では明らかにアミラーゼとともにセルラーゼのCCRが解除されており、*creB*破壊株と類似した表現型であった (data not shown). 従って、CreBはCreCとともにAN10017とも複合体を形成していると考えられる。CreBの機能としては他生物の情報からトランスポーターの維持が重要と思われる、CCR関連で考慮するとグルコーストランスポーターの安定化が考えられた。そこで、グルコースの消費を親株と*creB*破壊株で比較したところ、グルコース特異的な消費遅延が確認された。しかし、わずかな遅延であることから、これがCCR解除を引き起こすとは考えられず、CCRに関わるCreBの標的はほかに存在すると思われる。

要 約

糸状菌における多糖分解酵素の生産は、一般にカーボンカタボライト抑制 (CCR) の制御下にあるが、CCRに対する感受性は酵素の種類によって異なり、たとえば、セルラーゼはアミラーゼよりも敏感である。CCRの強さも抑制炭素源によって異なるため、生産は複雑に制御されているが、そのメカニズムの詳細が十分に解明されているとは言えない。CCRのメカニズムをさらに理解するため、*creA*の破壊の影響をプロテインキナーゼA (*pkaA*) および *Ga* (*ganB*) 遺伝子や*creB*の破壊の影響と比較した。その結果、PkaAおよびGanBがCreA非依存性のCCRに関与すること、CCRにおけるCreA, PkaA, およびGanBの寄与の程度が、インデューサーや抑制炭素源、酵素の種類、培養条件によって異なることが明らかとなった。また、CreBがGanBとは独立して機能することも明らかとなった。さらに、CCRを制御するPkaA基質の有望な候補を特定した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 國武絵美, 木村哲哉, 小林哲夫. 2020. *Aspergillus nidulans*におけるcAMPシグナリング関連因子のヘミセルラーゼ発現抑制への関与. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 2) 柴山智洋, 浅野圭祐, 金丸京子, 木村真, 國武絵美, 小林哲夫. 2020. 糸状菌*Aspergillus nidulans*におけるプロテアーゼの生産制御. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 3) 上條順也, 木村哲哉, 小林哲夫, 國武絵美. 2019. *Aspergillus nidulans*における出芽酵母Rgt1類似因子のカーボンカタボライト抑制への関与. 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月6-7日, 札幌)
- 4) 國武絵美, 木村哲哉, 小林哲夫. 2019. *Aspergillus nidulans*におけるヘミセルラーゼ遺伝子のカーボンカタボライト抑制機構. 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月6-7日, 札幌)
- 5) 小林哲夫. 2019. 糸状菌における多糖分解酵素遺伝子群の発現制御に関する研究. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 6) Kunitake, E., Li, Y., Uchida, R., Nohara, T., Asano, K., Hattori, A., Kimura, T., Kanamaru, K., Kimura, M. & Kobayashi, T. 2019. Carbon catabolite repression of cellulase genes via protein kinase A pathway in *Aspergillus nidulans*. 30th Fungal Genetics Conference (March 12-17, Pacific Grove, CA)

原著論文

- 1) Kunitake, E., Li, Y., Uchida, R., Nohara, T., Asano, K., Hattori, A., Kimura, T., Kanamaru, K., Kimura, M. & Kobayashi, T. 2019. CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **65**: 941-952.

その他 (総説・書籍)

- 1) 國武絵美, 小林哲夫. 2019. 転写制御からみる糸状菌の多糖資化戦略. *化学と生物*. **57**: 532-540.

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名古屋大学大学院生命農学研究科と三重大学大学院生物資源学研究科の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Alam, M.A., Kamlangdee, N. & Kelly, J.M. 2017. The CreB deubiquitinating enzyme does not directly target the CreA repressor protein in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **63**: 647-667.
- Boase, N.A. & Kelly, J.M. 2004. A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination.

- Mol. Microbiol.* **53**: 929-940.
- Boase, N.A., Lockington, R.A., Adams, J.R., Rodbourn, L. & Kelly, J.M. 2003. Molecular characterization and analysis of the *acrB* gene of *Aspergillus nidulans*: a gene identified by genetic interaction as a component of the regulatory network that includes the CreB deubiquitination enzyme. *Genetics* **164**: 95-104.
- Brown, N.A., de Gouvea, P.F., Krohn, N.G., Savoldi, M. & Goldman, G.H. 2013. Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Biofuels* **6**: 91.
- Colabardini, A.C., Humanes, A.C., Gouvea, P.F. *et al.* 2012. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans fbxA* encoding an F-box protein involved in xylanase induction. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 130-140.
- Conlan, R.S. & Tzamarias, D. 2001. Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J. Mol. Biol.* **309**: 1007 - 1015.
- de Assis, L.J., Ries, L.N., Savoldi, M., Dos Reis, T.F., Brown, N.A. & Goldman, G.H. 2015. *Aspergillus nidulans* protein kinase A plays an important role in cellulase production. *Biotechnol. Biofuels* **8**: 213.
- de Souza, C.P., Hashmi, S.B., Osmani, A.H., Andrews, P., Ringelberg, C.S., Dunlap, J.C. & Osmani, S.A. 2013. Functional analysis of the *Aspergillus nidulans* kinome. *PLoS One* **8**: e58008.
- de Vries, R.P., Visser, J. & de Graaff, L.H. 1999. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* **150**: 281-285.
- dos Reis, T.F., Mellado, L., Lohmar, J.M., Silva, L.P., Zhou, J.J., Calvo, A.M., Goldman, G.H. & Brown, N.A. 2019. GPCR-mediated glucose sensing system regulates light-dependent fungal development and mycotoxin production. *PLoS Genet.* **15**: e1008419.
- Dowzer, C.E. & Kelly, J.M. 1989. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **15**: 457-459.
- Ebbole, D.J. 1998. Carbon catabolite repression of gene expression and conidiation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **25**: 15-21.
- Endo, Y., Yokoyama, M., Morimoto, M., Shirai, K., Chikamatsu, G., Kato, N., Tsukagoshi, N., Kato, M. & Kobayashi, T. 2008. Novel promoter sequence required for inductive expression of the *Aspergillus nidulans* endoglucanase gene *eglA*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 312-320.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.K., Shimizu, K., Keller, N. & D'Enfert, C. 2002. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **44**: 1001-1016.
- Hodul, M., Dahlberg, C.L. & Juo, P. 2017. Function of the deubiquitinating enzyme USP46 in the nervous system and its regulation by WD40-repeat proteins. *Front. Synaptic Neurosci.* **9**: 16.
- Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T. & Gomi, K. 2014. Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 335-343.
- Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T. & Gomi, K. 2018. Increased production of biomass-degrading enzymes by double deletion

- of *creA* and *creB* genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* **125**: 141-147.
- Katz, M.E., Bernardo, S.M. & Cheetham, B.F. 2008. The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr. Genet.* **54**: 47 - 55.
- Kunitake, E., Li, Y., Uchida, R., Nohara, T., Asano, K., Hattori, A., Kimura, T., Kanamaru, K., Kimura, M. & Kobayashi, T. 2019. CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **65**: 941-952.
- Li, Y., Zhang, X., Hu, S., Liu, H. & Xu, J-R. 2017. PKA activity is essential for relieving the suppression of hyphal growth and appressorium formation by MoSf11 in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genet.* **13**: e1006954.
- Lockington, R.A. & Kelly, J.M. 2002. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB *in vivo* in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **43**: 1173-1182.
- Molnár, Z., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T. & Pócsi, I. 2006. Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* **46**: 495 - 503.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. 1997. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 520-528.
- Ries, L.N., Beattie, S.R., Espeso, E.A., Cramer, R.A. & Goldman, G.H. 2016. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **203**: 335-352.
- Tamayo, E.N., Villanueva, A., Hasper, A.A., de Graaff, L.H., Ramón, D. & Orejas, M. 2008. CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 984-993.
- Tanaka, M., Ichinose, S., Shintani, T. & Gomi, K. 2018. Nuclear export-dependent degradation of the carbon catabolite repressor CreA is regulated by a region located near the C-terminus in *Aspergillus oryzae*. *Mol. Microbiol.* **110**: 176-190.
- Tonukari, N.J., Scott-Craig, J.S. & Walton, J.D. 2003. Isolation of the carbon catabolite repressor (CREA) gene from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *DNA Seq.* **14**: 103-107.
- Tudzynski, B., Liu, S. & Kelly, J.M. 2000. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: Isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* creA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 9-15.

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

池 道 彦

大阪大学大学院工学研究科
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

Establishment of technologies for green production of semi-conductors by biosynthesis:
elucidation of mechanisms of bacterial chalcogen-metabolism and their application

Michihiko Ike

Graduate School of Engineering, Osaka University
2-1, Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871

The existing physico-chemical processes for production of semiconductor materials commonly possess shortcomings like use of hazardous chemicals and huge energy consumption, i.e., high environmental burden. Biological synthesis can be the eco-friendly and energy-saving alternative to overcome such shortcomings, and may turn the semiconductor production processes to be “green” in future. To establish the basis for developing semiconductor biosynthesis technologies, a variety of chalcogen-metabolizing bacteria were extensively and intensively examined for their potential to synthesize chalcogenide semiconductors (ChSCs), an important category of semiconductor material. Attempts were made to produce ChSC nanoparticles using the bacterial strains capable of reduce sulfur (S), selenium (Se) and/or tellurium (Te) oxyanions under aerobic conditions, resulted in the success in biosynthesis of CdS, CuS, ZnS, CdSe and Bi₂Se₃ nanoparticles as binary (two elements) ChSCs. Further, production of CdS_xSe_(1-x) and Bi₂S_xSe_(3-x) nanoparticles, ternary (three elements) ChSCs, was also observed. On the other hand, efficient synthesis of Te-containing semiconductors could not be confirmed within this study. From the study on Bi₂Se₃ synthesis properties by chalcogen-metabolizing bacteria including a versatile Se-metabolizing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I, it was suggested that efficient biosynthesis of Se-containing semiconductors was attributed to high Se-volatilizing activities of the bacterial strains. Selenol-containing compounds as intermediates of Se-volatilizing metabolic pathways, such as methane selenol and selenocysteine, may play an important role in biosynthesis of Se-containing semiconductors.

Key words: Chalcogenide semiconductors, chalcogen-metabolizing bacteria, green production, selenium volatilization

緒 言

半導体素子は先端産業に欠かせない電子部品であり、特に、構成元素の組合せにより独特な性質を示す化合物半導体ナノ粒子の利用が急拡大してきている。現在、化合物半導体ナノ粒子の合成・製造は物理化学的プロセス

によって行われているが (Gao *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2008), これらの方法では、有害な薬品の利用、高温・高圧下の反応、多大なエネルギーの投入など、環境負荷が高くなるという問題を抱えており、より環境調和型の合成・製造技術への転換 (グリーン化) が求められている。半導体ナノ粒子合成をグリーン化する手段として、近年、微生物の持つ金属・非金属元素の特殊な代謝を利用する“バイオ合成”が提案されている (Mal *et al.*, 2016)。微生物反応は常温・常圧下で進行し、有害な薬品を用いる必要もないため、本来省エネルギー・省資源かつ低環境負荷型であり、バイオ合成は半導体ナノ粒子

E-mail: ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

共同研究者：井上大介 (大阪大学大学院工学研究科),

黒田真史 (大阪大学大学院工学研究科);

現 常葉大学社会環境学部)

合成の抱える多くの問題を解決できる十分なポテンシャルを有している。また、マイクロファクトリーともいわれる微生物細胞レベルでの合成系は、ナノサイズの粒子の製造に適しているといえ (Klaus *et al.*, 1999), さらに、微生物により合成された金属ナノ粒子は、表層がタンパク質等で覆われることで生物への適合性が高くなるといった応用上有用な特性を持つことも知られるなど (Li *et al.*, 2014), 付加的なメリットも大きいと考えられる。

硫黄 (S), セレン (Se), テルル (Te) 等のカルコゲンを含むカルコゲン系半導体 (ChSCs: Chalcogenide Semi-Conductors) は、光学的・電氣的に他の材料にない特性を有し、発光素子, 熱電変換材料, フォトニクス, バイオイメージングなどで広範に利用されている重要な化合物半導体の一カテゴリーであり, 細菌や酵母等の微生物によって, そのナノ粒子がバイオ合成可能であることが明らかにされている (Mal *et al.*, 2016). 概括的には, ChSCs のバイオ合成は Fig.1 に示す反応で行われる。すなわち, 微生物代謝により, +VI 価, +IV 価などのカルコゲン酸化物を -II 価にまで還元し, これと別途与えた金属イオンが化合することにより ChSCs が生じる。しかし, 現状ではバイオ合成可能な ChSCs の種類は限定されており, 合成メカニズムについても必ずしも十分に解明されていないことから, 合理的な合成技術が確立されているとはいえない。特に, これまでに ChSCs 合成に用いられてきた微生物の多くは, *Escherichia coli*

(Sweeney *et al.*, 2004) や *Saccharomyces cerevisiae* (Cui *et al.*, 2009) 等カルコゲン代謝に優れたものとはいえないモデル微生物であり, 産業利用可能なレベルの効率的バイオ合成に適用し得る微生物触媒が獲得・整備されていないことが, バイオ合成を実現するうえでの大きなボトルネックとなっている。

本研究は, ChSCs 合成に活用できる有効なカルコゲン代謝微生物を探索し, その ChSCs ナノ粒子合成の特性を詳細に把握することを通じて, 実用的な ChSCs バイオ合成の材料・知識基盤を構築することを目的としたものである。ここでは, 好気条件下においてチオ硫酸塩 ($S_2O_3^{2-}$), 亜セレン酸塩 (SeO_3^{2-}), 亜テルル酸塩 (TeO_3^{2-}) 等のカルコゲン酸化物イオンを効率的に還元する能力を有する細菌株に焦点を当てて, ChSCs 合成微生物を探索した。我々の研究グループでは, 廃水中のセレンやテルルを無害化・除去する目的でカルコゲン酸化物イオンを効率的に還元することのできる細菌株を探索・取得してきたが, 研究を進めるなかで, 好氣的にカルコゲンの還元を行う細菌株が, 嫌気下で還元を行う既存の細菌株には類を見ない非常に効率的な還元を行うことが明らかになってきたことから (Kuroda *et al.*, 2011; Kagami *et al.*, 2012, 2013), この研究の戦略を構想した。

実験方法

使用菌株および培地

本研究に用いた菌株とそれらが代謝可能なカルコゲンを Table 1 に示す。これらは, 研究室でカルコゲンの酸化物イオンを好気培養において還元する細菌株として分離したものであり, 特に効率的な還元能を有するものを今回の検討に用いた。ここでは, チオ硫酸塩, セレン酸塩または亜セレン酸塩, および亜テルル酸塩を還元するものとして分離された菌株をそれぞれ, S 代謝菌, Se 代謝菌, Te 代謝菌と分類している。

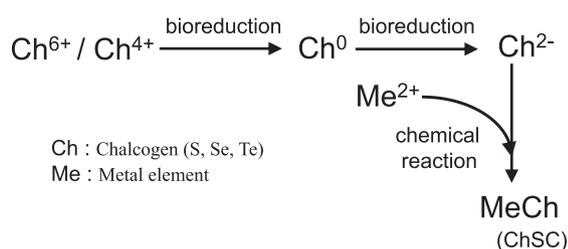


Fig. 1 Schematic of ChSCs biosynthesis process.

Table 1 Bacterial strains used in this study

Strains	Metabolizable chalcogens	References
<i>Lysinibacillus</i> sp. HM1	$S_2O_3^{2-}$	JP 2020-054302
<i>Stenotrophomonas</i> sp. HM2	$S_2O_3^{2-}$	JP 2020-054302
<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-1	SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , TeO_3^{2-}	Kuroda <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RB	SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-}	Ayano <i>et al.</i> , 2014
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TI-1	SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-}	Kagami <i>et al.</i> , 2012
<i>Ochrobactrum anthropi</i> TI-2	SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-}	Kagami <i>et al.</i> , 2012
<i>Ochrobactrum anthropi</i> TI-3	SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-}	Kagami <i>et al.</i> , 2012

これら菌株の培養には基本的にTSB培地 (Bacto™ Tryptic Soy Broth) を用い、必要に応じて1mM, 1.5mM, 2mM, または6mMのカルコゲン(チオ硫酸塩($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 亜セレン酸塩 (Na_2SeO_3), 亜テルル酸塩 (Na_2TeO_3)) を添加した。平板培養を行う際には、液体培地に18g/Lの寒天を加えることで固化させて用いた。また、ChSCs合成試験には、カルコゲンを含むTSB培地に、カルコゲンと化合物を形成する可能性のある金属類を1mMの濃度で添加し、十分に溶解させるためキレート剤として2mMまたは20mMのニトリロ三酢酸を添加した培地を用いた。ここで金属類は、Bi(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Ga(III), In(II), Mn(II), Ni(II), Sc(III), V(III), およびZn(II)については塩酸塩、Pb(II)については硝酸塩として添加した。また、HM1株およびHM2株を用いたChSCs合成試験においては、試験培地に100mMの2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH6.0)を添加することによりpHを安定化させた。

ChSCs合成試験

Table 1のカルコゲン代謝細菌株を培養した寒天培地から1コロニーを釣菌し、50mL容バイアルに分注した20mLのTSB培地に接種して、好氣的に24時間の回転振盪培養(28℃, 120rpm)を行った。その後、培養液の5%を同組成の培地に接種し、同様の条件で12時間培養した培養液を前培養液として試験に供した。続いて、カルコゲン(チオ硫酸塩:2mM, 亜セレン酸塩:1mM, 亜テルル酸塩:1mM, ただし Bi_2Se_3 および Bi_2Te_3 合成試験においては亜セレン酸塩, 亜テルル酸塩:1.5mM), および金属類(各1mM), ニトリロ三酢酸(2mM, ただし Bi_2Se_3 および Bi_2Te_3 合成試験では20mM), さらにHM1株およびHM2株の培養時にはMES 100mMを加えた20mLのTSB培地を50mL容バイアルに分注した試験系に、前培養液を OD_{600} が0.02 (NT-I株, RB株, TI-1株, TI-2株, TI-3株)または0.1 (HM1株, HM2株)になるように接種し、好氣的に回転振盪培養(28℃, 120rpm)を行いChSCs合成試験とした。培養開始後、経時的に培養液を採取し、各種分析に供した。

セレン代謝試験

NT-I株, RB株, TI-1株, TI-2株, およびTI-3株に対しては、そのセレン代謝能を詳細に検討する試験を行った。これらの菌株を前項と同様に前培養し、50mL容バイアル中に分注した1.5mMの亜セレン酸塩を含むTSB培地に OD_{600} が0.02になるように植菌した。これを好氣的に回転振盪培養(28℃, 120rpm)し、経時的に培養液を採取して各種分析に供した。

分析方法

採取した培養液を、4℃, 21,900×gで5分間遠心分離した後、得られた上清を孔径0.20μmのフィルターでろ過したものを液相試料とした。また、同様に得られた沈殿物を超純水で洗浄したものを固相試料とした。液相試料を5%硝酸で10倍希釈し、誘導結合プラズマ発光分光分析(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry; ICP-AES; SPS7800 SII Nano Technology)に供することで液相中のカルコゲンおよび金属類の濃度を測定した。固相試料は濃硝酸中で100℃, 10分間処理することで消化し、超純水で適宜希釈した後にICP-AESに供することで、カルコゲンおよび金属類の含量を測定した。

セレン代謝試験において、細胞内のセレンを含む代謝物の検出は、高速液体クロマトグラフ(HPLC; HIC-SP, Shimadzu)-水素化物発生原子蛍光分析(HG-AFS; Millennium Excalibur, PS analytical)により行った。培養液を4℃, 6,000×gで10分間遠心分離することにより回収した菌体を生理食塩水で2度洗浄し、適量の生理食塩水に懸濁した後、超音波処理により破碎し、遠心分離(4℃, 6,000×g, 10min)後の上清をHPLC-HG-AFSに供した。標準試料として5μMのセレン酸塩, 亜セレン酸塩, セレノシステイン, セレノメチオニンを用いて、保持時間を比較することにより試料中のセレン化合物の定性分析を行った。

ChSCsナノ粒子の観察

ChSCs合成試験で得られた固相試料を超純水に懸濁し、その10μLをエラスチックカーボン支持膜付きの銅メッシュグリッド(ELS-C10, 応研商事)上に滴下し、自然乾燥により固着させた。この試料を透過型電子顕微鏡(TEM; JEM-2100F, 日本電子)およびエネルギー分散型X線分析(EDS; EX-24063JGT, 日本電子)に供し、加速電圧200kVにて観察および元素分析を行った。

結果および考察

カルコゲン代謝細菌株のChSCs合成能

カルコゲン代謝細菌を用いて、3種のカルコゲン(S, Se, Te)と様々な金属類(Bi(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Ga(III), In(II), Mn(II), Ni(II), Sc(III), V(III), Zn(II), Pb(II))の組み合わせによるChSCs合成を試みた。ここでChSCs試験において、カルコゲンと金属類の水相からの有意な除去が認められた系に対して、TEMによる固相の観察を行うことでChSCsの合成を確認した。ChSCs合成が確認されたカルコゲンと金属の組み合わせの一覧をTable 2に、ま

た菌株ごとに合成することのできた ChSCs を Table 3 に示している。S 代謝菌である HM1 株または HM2 株を用いることにより、Cd(II), Bi(III), Cu(II), Zn(II), および Pb(II) の硫化物半導体の合成に成功した。また、Se および Te 代謝菌である NT-I 株, RB 株, TI-1 株, TI-2 株, TI-3 株のいずれもがセレン化物半導体である Bi_2Se_3 を合成できることが確認された。加えて、NT-I 株および RB 株は CdSe も合成可能であることが確認された。合成が確認された 2 元素系のセレン化物半導体 Bi_2Se_3 および CdSe については、別途の合成試験を行い生成した粒子を詳細に解析したところ、培養条件や培養時間によって、TSB 培地に由来すると考えられる S を含む粒子であることが明らかとなり、 Bi_2Se_3 および CdSe の合成細菌は、3 元素系の ChSCs である $\text{CdS}_x\text{Se}_{(1-x)}$ および $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ の合成も行えることが示唆された。3 元素系の ChSCs がバイオ合成され得ることが明確に示されたのは初の報告である。一方、テルル化物半導体については、いずれの金属と組み合わせの場合も明確な半導体合成は認められなかった。また、試験に用いた金属類のうち、Co(II), Cr(III), Fe(III), Ga(III), In(II), Mn(II), Ni(II), Sc(III), V(III) については、試験したいずれのカルコゲンとも半導体合成が確認できなかった。

ここではカルコゲンと化合し ChSCs を合成し得る金属類として 14 種の元素を用いた試験を行ったが、明確

な ChSCs 合成が認められたものは Cd(II), Bi(III), Cu(II), Zn(II), Pb(II) の 5 種のみであり、かなり限定的であった。また、硫化物半導体がこれら 5 種類の金属類から合成できたのに対して、セレン化物半導体は Cd(II) と Bi(III) のみから合成できたのにとどまり、テルル化物半導体について全ての金属と合成は確認できず、硫化物系、セレン化物系、テルル化物系の順に半導体のバイオ合成の難易度は高くなることが明らかとなった。これらのことは、Fig.1 に示した ChSCs バイオ合成のスキームにおいて、カルコゲン代謝細菌によって生成される -II 価のカルコゲン (図中 Ch^{2-}) と金属イオン (図中 +2 価の Me^{2+} として例示) の化合物は無条件で進行するものでなく、その組み合わせによってある種の反応性の差、あるいは選択性のある反応であることを示している。ここでは S 代謝菌により、比較的幅広い金属種に対して硫化物半導体が合成されたが、容易に難溶性の硫化物塩を形成する Fe(II), Ni(II), Sn(II) からの合成は確認されなかったことから、単純に -II 価の S として硫化物イオン (S^{2-}) が生じ、金属イオンと化合する反応を想定することはできない。S 代謝によって生じた S^{2-} 以外の含 S 化合物が、何らかの複雑な生化学的あるいは化学的メカニズムにより金属イオンと化合物を生成したのと考えるのが妥当であるといえる。また、セレン化物半導体の合成についても同様な議論を行うことができる。

Table 2 ChSCs synthesized in this study

Metals	Chalcogens		
	S	Se	Te
Cd(II)	+	+	-
Bi(III)	+	+	-
Cu(II)	+	-	-
Zn(II)	+	-	-
Pb(II)	+	-	-

+, synthesized; -, not synthesized

Table 3 ChSCs synthesis capabilities of the bacterial strains

Strains	ChSCs synthesized
<i>Lysinibacillus</i> sp. HM1	CdS, CuS, ZnS
<i>Stenotrophomonas</i> sp. HM2	CdS, BiS, CuS, PbS
<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I	CdSe, Bi_2Se_3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RB	CdSe, Bi_2Se_3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> TI-1	Bi_2Se_3
<i>Ochrobactrum anthropi</i> TI-2	Bi_2Se_3
<i>Ochrobactrum anthropi</i> TI-3	Bi_2Se_3

カルコゲン代謝細菌による Bi_2Se_3 の合成

これまで、いくつかの ChSCs のバイオ合成が報告されてきているが (Mal *et al.*, 2016), その多くは硫化物系であり、セレン化物系半導体の合成に関する報告は限られている。特に、 Bi_2Se_3 の合成については、唯一 Zhou ら (2018) が *Lysinibacillus* sp. ZYM-1 を用いて合成した Bi_2Se_3 ナノシートの工学的特性を評価した報告があるのみで、 Bi_2Se_3 バイオ合成そのものについては詳細な記述がなく、その特性は定性的・定量的両側で評価がなされていない。そこで、セレン化物半導体のバイオ合成の特徴を明らかにし、そのメカニズム解明の手掛かりとするため、Se および Te 代謝細菌株による Bi_2Se_3 の合成特性を詳細に調べた (Kuroda *et al.*, 2019)。

Se(IV) および Bi(III) を含む培地中で NT-I 株, RB 株, TI-1 株, TI-2 株, および TI-3 株を培養した際の液相の Se および Bi 濃度の経時変化を Fig.2 に示す。全ての菌株が 48 時間以内にほとんどの Se と Bi を同調的に除去し、この時、培養液は Bi_2Se_3 に特徴的な黒色を呈した。さらに培養を継続したところ、192 時間以降、RB 株, TI-1 株, TI-2 株, および TI-3 株の 4 菌株において Bi 濃度の上昇が確認された。これは、何らかの作用により生成した Bi_2Se_3 から Bi が脱離し再溶解したものと推測さ

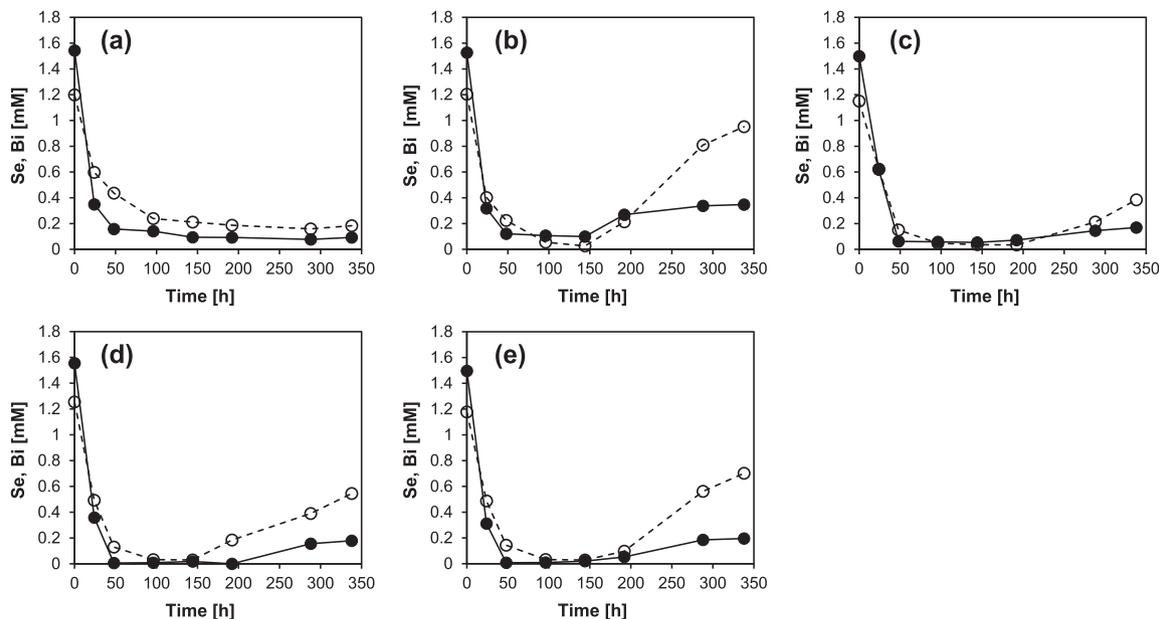


Fig. 2 Time courses of the soluble Se and Bi in liquid phase.
 (a) *P. stutzeri* NT-I; (b) *P. aeruginosa* RB; (c) *S. maltophilia* TI-1; (d) *O. anthropi* TI-2; (e) *O. anthropi* TI-3.
 Closed circles, Se in liquid phase; open circles, Bi in liquid phase. (Reproduced from Kuroda *et al.*, 2019)

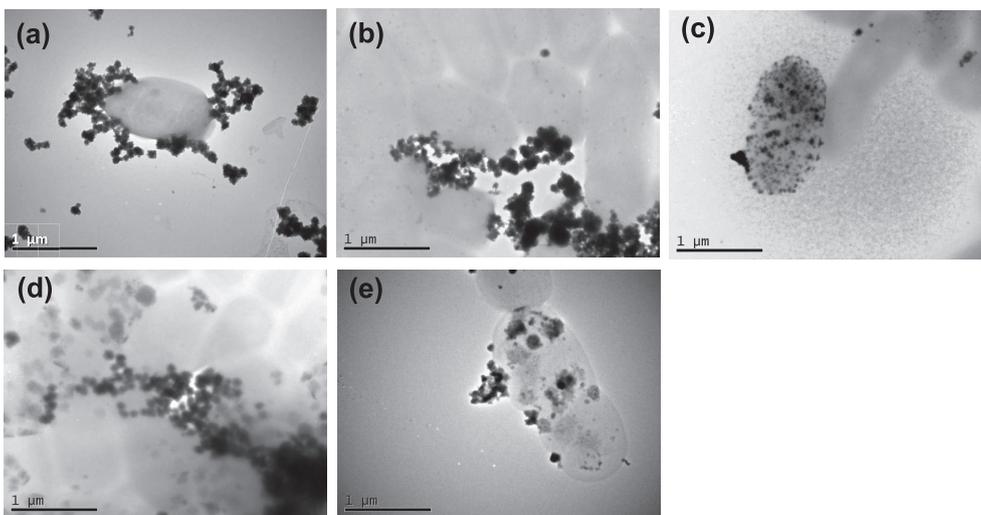


Fig. 3 Morphologies of synthesized particles at 48h cultivation.
 (a) *P. stutzeri* NT-I; (b) *P. aeruginosa* RB; (c) *S. maltophilia* TI-1; (d) *O. anthropi* TI-2; (e) *O. anthropi* TI-3.
 (Reproduced from Kuroda *et al.*, 2019)

れ、これらの菌株による効率的な Bi_2Se_3 合成には適切に培養時間を制御する必要があるものと考えられた。一方、NT-I 株においては培養時間が長くなっても Bi 濃度の上昇は確認されず、合成された Bi_2Se_3 粒子が安定に維持されたものと考えられた。

全ての菌株で液相の Bi と Se がほぼ全て除去され、

Bi_2Se_3 の合成が完了したと考えられた 48 時間時点の固相試料を TEM により観察した結果を Fig. 3 に示す。NT-I 株、RB 株、TI-2 株、および TI-3 株では、細胞外に直径 50–100 nm 程の粒子を形成していたのに対して、TI-1 株は細胞内または表面に直径数 nm の粒子を多数形成していた。続いて、EDS による観察された粒子の元

素分析の結果を Table 4 に示す。RB 株, TI-1 株, TI-2 株, および TI-3 株の 4 菌株が生成した粒子はカルコゲンとして Se のみならず S を含んでいたが, NT-I 株が生成した粒子はほぼ Se のみを含んでいた。カルコゲンと Bi の存在比 (S+Se)/Bi は, いずれの場合も Bi_2Se_3 または $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ の理論値である 1.5 に近い値を示したことから, NT-I 株は純度の高い 2 元素系半導体 Bi_2Se_3 を生成し, その他の菌株については Bi-S-Se の 3 元素系半導体粒子を生成したことが確認された。ここで, $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ 中の S は TSB 培地の成分に由来するものといえ, 培地中の S 成分の濃度を低下させることで, NT-I 株以外の菌株によっても純度の高い Bi_2Se_3 を合成させることが可能であるとも考えられる。なお, TI-1 株については Bi, S, Se に加えて Na, P, Cl も検出されたが, これは粒子が細胞表面に形成されていたために, EDS 分析の際に細胞成分が検出されたためだと考えられた。

以上より, NT-I 株, RB 株, TI-1 株, TI-2 株, および TI-3 株の 5 種の Se・Te 代謝菌は効率的に Bi_2Se_3 が合成可能であることが明らかになった。特に NT-I 株が生成した Bi_2Se_3 は純度が高く, また長時間の培養においても Bi の再溶解が生じず安定していたことから, NT-I 株は特に有望な Bi_2Se_3 合成細菌であると考えられた。

好気性カルコゲン代謝細菌による ChSCs 合成メカニズムの推定

NT-I 株, RB 株, TI-1 株, TI-2 株, および TI-3 株が効率的に Bi_2Se_3 を合成するメカニズムを探るために, これら菌株によるセレン代謝を経時的に調べた。結果を Fig. 4 に示している。いずれの菌株も, 24 時間までに添加した亜セレン酸塩のほとんどを元素態セレンへと還元し, 液相から固相へと移行させた。生成した元素態セレンは 24 時間以降に減少に転じ, 96-288 時間にかけて除去された。この時, 液相および固相に含まれるセレンの

マスバランスから, 代謝によってセレンは揮発化し培養系から失われたものと考えられた。多くの微生物においてセレンの揮発化はごくわずかに生じる反応であり, 著量のセレンを揮発化させる細菌は NT-I 株を含めたごくわずかな種であると考えられていることから (Kagami *et al.*, 2013), 本研究によって NT-I 株以外の 4 菌株も極めて高い Se 揮発化能を持つことが明らかになったことは驚くべきことである。NT-I 株におけるこれまでの研究において, 揮発化したセレンの化学形態はジメチルセレンド ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$), ジメチルジセレンド ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$) 等のメチル化物であることが明らかになっている。細菌のセレン代謝経路の詳細は未だ明らかになっていないものの, 硫黄代謝と類似したものであると考えられ, メチル化物生成の過程でメタンセレンオール (CH_3SeH) やセレンシステイン (Se-Cys) 等のセレンオール基を持つ化合物が中間体として生成することが推測されている。

ここで, セレンを含む化合物を分離し特異的に検出できる HPLC-HG-AFS により NT-I 株の菌体内セレン化合物の検出を試みた結果を Fig. 5 に示す。培養開始 12 時間後には多数のセレンを含む代謝物が検出された。培養 12-24 時間にかけては Se-Cys と推定されるピークがわずかに存在しており, また, 培養 12 時間以降, 保持時間 3.5-4 分に未知セレン化合物の顕著なピークが検出された。これらより, NT-I 株は, 亜セレン酸塩還元の過程で細胞内にセレンを含む代謝物を蓄積していることが明らかになり, これらが関与して半導体が合成されるものと推測された。

以上の考察に基づいて, Fig. 6 に本研究から推定された Bi_2Se_3 のバイオ合成メカニズムの模式図を示している。Se 代謝菌は, 好気条件下で亜セレン酸塩を同化的に還元し, セレンオール化合物 (-II 価の Se 化合物) を經由して $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ 等の揮発性セレン化合物を生成する能力を持つ。セレンオール化合物は酸素の存在化では不安定

Table 4 Elemental compositions of synthesized particles at 48 h of cultivation

		(a) NT-I	(b) RB	(c) TI-1	(d) TI-2	(e) TI-3
Elemental composition (%)	Na	-	-	5.0	-	-
	P	-	-	0.9	-	-
	Cl	-	-	2.3	-	-
	S	0.0	1.4	3.3	3.1	2.6
	Se	60.6	58.9	52.8	59.4	57.6
	Bi	39.4	39.7	35.7	37.5	39.8
	(S+Se)/Bi	1.54	1.52	1.57	1.67	1.51

(Reproduced from Kuroda *et al.*, 2019)

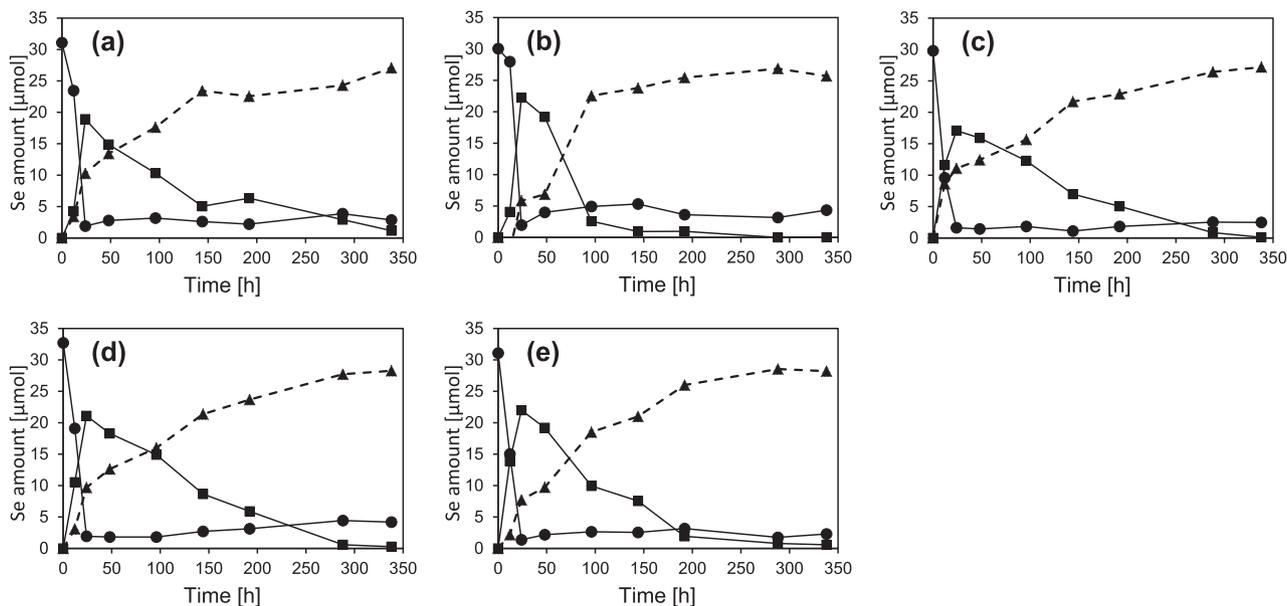


Fig. 4 Time courses of the Se species amounts in the cultures of the bacterial strains. (a) *P. stutzeri* NT-I; (b) *P. aeruginosa* RB; (c) *S. maltophilia* TI-1; (d) *O. anthropi* TI-2; (e) *O. anthropi* TI-3. Closed circles, Se in liquid phase; closed squares, Se in solid phase; closed triangles, volatilized Se (estimated). (Reproduced from Kuroda *et al.*, 2019)

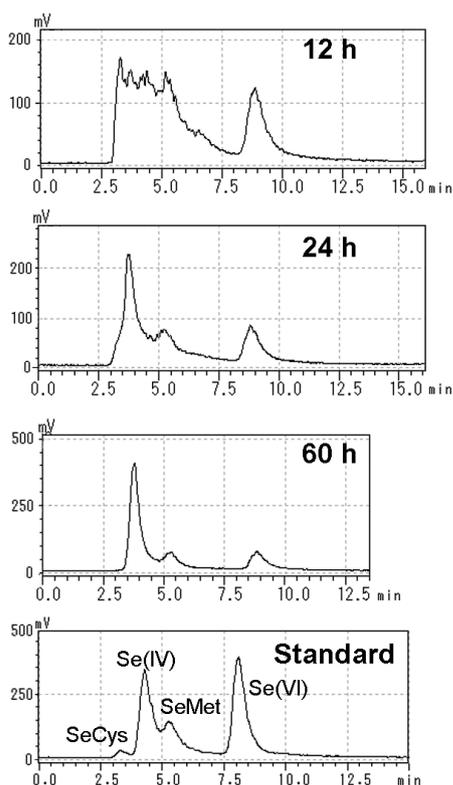


Fig. 5 Detection of Se-containing metabolites in strain NT-I cultivated in TSB medium containing selenite by HPLC-HG-AFS.

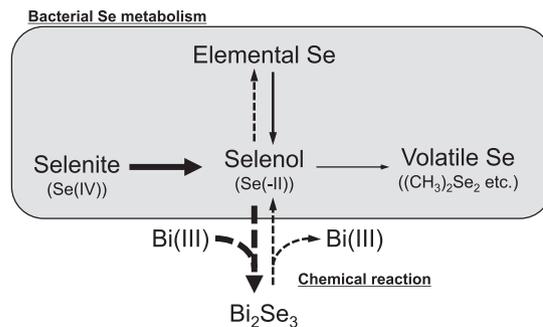


Fig. 6 Potential pathway of Se metabolism and Bi₂Se₃ production. Solid and dashed arrows represent biological and spontaneous reactions, respectively. (Reproduced from Kuroda *et al.*, 2019)

であり、自然酸化により元素態セレンに酸化されるが、高いセレン代謝能力を持つ菌株はこの元素態セレンを再度還元してセレノール化合物に戻すことができるものと推定している。ここで培養液中に Bi(III) イオンが存在する場合には、反応性の高いセレノール化合物は Bi(III) と結合し Bi₂Se₃ ナノ粒子を形成するものと考えられる。TI-1 株は細胞内または表面で Bi₂Se₃ ナノ粒子を形成し、その他の菌株は細胞外に形成することが観察

されたが、これは、これら菌株のセレノール化合物の細胞外への排出機構に違いがあることに起因するのではないかと推測される。水中に Bi_2Se_3 ナノ粒子を長時間放置すると、ナノ粒子特有の反応性の高さによって一部は分解し、 Bi(III) が再溶解するとともにセレノール化合物は酸化されて元素態セレンに変換されるが、NT-I 株については、高いセレン代謝活性により元素態セレンを還元し続け、 Bi_2Se_3 ナノ粒子を安定に維持し得るものと推測された。

推定された Bi_2Se_3 合成のメカニズムは、好気性の Se 代謝菌を利用した CdSe 等の他のセレン化物半導体合成にも共通するものと考えられる。また、NT-I 株は Se の揮発化試験において、ジメチルセレノスルフィド ($(\text{CH}_3)_2\text{SeS}$) やジメチルジスルフィド ($(\text{CH}_3)_2\text{S}_2$) など S を含む揮発化物をも生成することから、Se の揮発化作用は S 代謝と関連していることが推定されている (Kagami *et al.*, 2013)。このことから、Fig.6 と類似したメカニズムで硫化物半導体のバイオ合成が行われ得るものとも考えられる。

ChSCs バイオ合成実用化へ向けての課題

本研究においては、好気条件下でカルコゲン還元能を示す微生物から、これまでにない高い効率で硫化物、およびセレン化物半導体を合成することのできる複数のカルコゲン代謝細菌株を選抜し、ChSCs 製造に用いる微生物材料のライブラリとして整備することができた。今回得ることのできなかつたテルル化物半導体の合成微生物については、今後さらに探索していく必要がある。本研究ではまた、セレン化物半導体が、合成微生物が生成するセレノール化合物が金属イオンと化学的に反応することで合成されるという合成経路を提案することができ、硫化物半導体合成も類似の経路（チオールと金属イオンの化学反応）によって行われることが推測された。このことから、好気性カルコゲン代謝菌を用いた ChSCs 合成においては、微生物によるセレノール、チオールの生成を促進する培養条件を選定するのみでなく、これらの生成物が金属イオンと化学反応を生じやすい条件についても考慮することが重要であるといえる。すなわち、生物反応と化学反応をバランスよく制御することによって ChSCs 合成の最適化を図るといふ ChSCs バイオ合成技術開発の基本的な方向性を示すことができた。今後、カルコゲン代謝菌が生成するチオール、セレノール化合物を同定し、その合成経路の詳細を明らかにするとともに、各種金属イオンと化合物を形成する条件を明確にすることによって、より効率的に、より多様な ChSCs を製造することのできる技術の確立が期待される。以上のように ChSCs バイオ合成技術確立の基盤と

なる材料・知識を得ることができたが、実用化のためにはさらに、バイオ反応によって生じる ChSCs ナノ粒子の回収・精製法を確立し、生成ナノ粒子の特性を明確にしていく必要がある。

要 約

化合物半導体ナノ粒子の合成に係る環境負荷を大幅に低減し、グリーン化する手段として、微生物の代謝作用を利用するバイオ合成が提案されているが、現状では実用化のために必要な生物触媒や合成技術の基盤が十分に整備されているとはいえない。本研究では、細菌によるカルコゲンの代謝を利用して重要な化合物半導体の一カテゴリーである ChSCs ナノ粒子をバイオ合成する技術基盤の確立を目的として一連の研究を行った。

好気条件下において効率的にカルコゲン酸化物 ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-}) の還元能を示す多様な細菌株に対して、 Cd^{2+} 等金属イオンを添加した培養を行い、ChSCs の合成ポテンシャルを調べた結果、2 元素系 ChSCs として CdS, CuS, ZnS, CdSe, Bi_2Se_3 の含 S および含 Se ナノ粒子の合成が確認された。また、3 元素系の ChSCs として、 $\text{CdS}_x\text{Se}_{(1-x)}$ および $\text{Bi}_2\text{S}_x\text{Se}_{(3-x)}$ の合成も行えることも初めて明らかとなった。一方、何れのカルコゲン代謝細菌を用いた場合にも、Te を含む ChSCs の明確な合成は確認することができず、効率的なバイオ合成が困難であることが示唆された。バイオ合成に関する知見が極めて少ない Bi_2Se_3 合成については、その詳細を明らかにする試みを行い、複数の Se 代謝細菌および Te 代謝細菌により合成が可能であることが示されたが、特に、多様な Se 代謝を極めて効率的に行う *P. stutzeri* NT-I により安定した合成が行われた。ここで、 Bi_2Se_3 を含む Se 含有 ChSCs の合成は、Se 代謝細菌による Se の揮発化能 ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$ 等の Se メチル化物の生成) と関連付けられることが示唆された。すなわち、CdSe や Bi_2Se_3 合成は、Se の揮発化につながる同化型還元過程で中間体として生じる CH_3SeH や Se-Cys などの含セレノール化合物が、添加された Cd(II) や Bi(II) と反応することで行われたものと推測された。

本研究で ChSCs の合成能が確認された好氣的カルコゲン代謝細菌株、特に Se 代謝菌株は、ChSCs ナノ粒子バイオ合成の実用化を進めるうえで有望な微生物触媒であるといえる。また、本研究で Se を含む ChSCs 合成のメカニズムの一端が明らかになったことにより、より合理的な ChSCs のバイオ合成技術が開発されていくことが期待される。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 黒田真史, 畠中玄彦, 井上大介, 池道彦. 2018. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによる水相からのテルルの揮発化除去と回収. 第70回日本生物工学会大会 (9月5-7日, 吹田)
- 2) 黒田真史, 惣田訓, 池道彦. 2018. *Pseudomonas*属細菌のセレン・テルル代謝の解析と半導体ナノ粒子合成への応用 (シンポジウム『半金属元素のバイオテクノロジー』). 第70回日本生物工学会大会 (9月5-7日, 吹田)
- 3) 畠中玄彦, 黒田真史, 井上大介, 池道彦. 2018. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによるテルル揮発化に影響を及ぼす因子の検討. 日本水処理生物学会第55回大会 (11月2-4日, 郡山)
- 4) 末神悠人, 畠中玄彦, 黒田真史, 井上大介, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iの揮発化作用による水相からのテルルの除去と回収. 第53回日本水環境学会年会 (3月7-9日, 甲府)
- 5) 黒田真史, 畠中玄彦, 末神悠人, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによる水相からのテルルの揮発化と回収. 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会 (6月15-16日, 吹田)
- 6) 佐藤守, 黒田真史, 井上大介, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによるセレン化物半導体ナノ粒子の合成. 環境技術学会第19回年次大会 (6月29日, 京都)
- 7) Kuroda, M., Hatanaka, H., Suegami, Y., Inoue, D. & Ike, M. 2019. Efficient biovolatilization of tellurium from water phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Federation of European Microbiological Societies 2019 (July, 7-11, Glasgow, UK)
- 8) Ikeda, M., Kuroda, M., Inoue, D. & Ike, M. 2019. Nutrients accelerating selenium removal by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Water and Environment Technology Conference 2019 (July, 13-14, Suita, Japan)
- 9) 池田美紗希, 黒田真史, 井上大介, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iのセレン代謝を促進する培地成分の検討. 第71回日本生物工学会大会 (9月16-18日, 岡山)
- 10) 黒田真史, 小林慎, 高山一也, 池道彦. 2019. 好気的硫黄代謝細菌を活用した重金属除去. 第71回日本生物工学会大会 (9月16-18日, 岡山)
- 11) 佐藤守, 黒田真史, 井上大介, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによるセレン化物半導体ナノ粒子の合成. 第71回日本生物工学会大会 (9月16-18日, 岡山)
- 12) Kuroda, M. & Ike, M. 2019. Removal and recovery of selenium from wastewater utilizing biovolatilization by selenium-metabolizing bacteria. 23rd International Biohydrometallurgy Symposium (October, 20-23, Fukuoka, Japan)
- 13) 黒田真史, 池田美紗希, 池道彦. 2019. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iのセレン代謝に及ぼす培地成分の影響. 日本水処理生物学会第56回大会 (11月8-10日, 野々市)

原著論文

- 1) Kuroda, M., Suda, S., Ayano, H., Ohishi, Y., Nishikawa, H., Soda, S. & Ike, M. 2019. Biosynthesis of bismuth selenide nanoparticles using chalcogen-metabolizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**: 8853-8861.

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、予備的段階を含め、本研究の遂行においてご協力をいただいた県立広島大学生命環境学部の阪口利文教授、大阪大学接合科学研究所の西川宏教授、大阪大学大学院工学研究科の大石佑治准教授、立命館大学理工学部の惣田訓教授に感謝の意を表します。実験研究に直接・間接に貢献いただいた多数の学生諸氏にも感謝いたします。

文 献

- Ayano, H., Miyake, M., Terasawa, K., Kuroda, M., Soda, S., Sakaguchi, T. & Ike, M. 2014. Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. Strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **117**: 570-581.
- Cui, R., Liu, H.H., Xie, H.Y., Zhang, Z.L., Yang, Y.R., Pang, D.W., Xie, Z.X. & Shen, P. 2009. Living yeast cells as a controllable biosynthesizer for fluorescent quantum dots. *Adv. Funct. Mater.* **19**: 2359-2364.
- Gao, M.R., Xu, Y.F., Jiang, J. & Yu, S.H. 2013. Nanostructured metal chalcogenides: synthesis, modification, and application in energy conversion and storage devices. *Chem. Soc. Rev.* **42**: 2986-3017.
- Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Kuroda, M., Soda, S., Yamashita, M. & Ike, M. 2012. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste Biomass Valorization* **3**: 409-418.
- Kagami, T., Narita, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S. & Ike, M. 2013. Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Res.* **47**: 1361-1368.
- Klaus, T., Joergler, R., Olsson, E. & Granqvist, C.G. 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 13611-13614.
- Kuroda, M., Notaguchi, E., Ike, M. *et al.* 2011. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 259-264.
- Li, Y., Bhalli, J.A., Ding, W. *et al.* 2014. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* **8**: 36-45.
- Ma, Y., Hao, Q., Poudel B., Lan, Y., Yu, B., Wang, D., Chen, G. & Ren, Z. 2008. Enhanced thermoelectric figure-of-merit in *p*-type nanostructured bismuth antimony tellurium alloys made from elemental chunks. *Nano Lett.* **8**: 2580-2584.
- Mal, J., Nancharaiyah, Y.V., van Hullebusch, E.D. & Lens, P.N.L. 2016. Metal chalcogenide quantum dots: biotechnological synthesis and applications. *RSC Adv.* **6**: 41477-41495.
- Sweeney, R.Y., Mao, C., Gao, X., Bart, J.L., Belcher, A.M., Georgiou, G. & Iverson, B.L. 2004. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem. Biol.* **11**: 1553-1559.
- Zhou, H., Che, L., Guo, Z., Wu, M., Li, W., Xu, W. & Liu, L. 2018. Bacteria-mediated ultrathin Bi₂Se₃ nanosheets fabrication and their application in photothermal cancer therapy. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**: 4863-4870.

2014 年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：2014 年 10 月～2020 年 3 月

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

中 島 琢 自

北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

Search for new compounds using physicochemical screening focused on physicochemical properties of microbial secondary metabolites

Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

Global public health faces a desperate situation, due to the lack of effective antibiotics. Coordinated steps need to be taken, worldwide, to rectify this situation and protect the advances in modern medicine made over the last 100 years. Japanese work has been in the vanguard of many such advances, and work is being proactively tailored to promote the discovery of urgently needed antimicrobials. Numerous research group has isolated multiple microorganisms for a long time ago. The resulting collection comprises a broad spectrum of microorganisms, including strains producing novel and diverse compounds with biological activities. A bioassay-guided fractionation of microbial culture broths has been employed to screen the microbial collection due to searching for new biological active compounds. And many novel natural products have been discovered among the microbial metabolites produced by members of the collection. However, there has been a decline in the pace of new compounds discovery from microbial metabolites. One of the problems in the field of natural product is the high rate of re-discovery of known compounds. Recently, it has become easy to acquire the ultraviolet (UV) and mass spectrometry (MS) spectra of many single components of microbial culture broths in combination with high-performance liquid chromatography (HPLC). New compounds from microbial culture broths were investigated by employing an approach based on the physico-chemical properties using spectral analyses such as UV and MS, collectively designated as physicochemical (PC) screening. As a result of physicochemical screening, eighty new compounds were identified among the secondary metabolites of fresh isolates and stock strains producing known compounds.

第一章 はじめに

1929年のフレミング博士によるペニシリンの発見 (Fleming, 1929), 1940年のフローリー博士とチェン博士によるペニシリンの精製単離 (Chain *et al.*, 1940), そして1943年にペニシリンは欧米において実用化され

た。その後、ワックスマン博士が初めて放線菌から網羅的抗生物質の探索を行い, *Streptomyces antibioticus* からアクチノマイシン (Waksman & Tishler, 1942), *S. lavendulae* からストレプトスリシン (Waksman & Woodruff, 1942), そして1944年に *S. griseus* からストレプトマイシン (Schatz *et al.*, 1944) を発見した。これらの抗生物質の発見を機に, 多く研究機関や製薬企業は微生物が生産する二次代謝産物に焦点をあて, 新規物質の探索研究を進めてきた。一般的な生物活性物質探索の方法では, ある特定の生物活性を指標に微生物培養液抽出物を評価し, 活性を示した抽出物をクロマトグラフィーなどで分画し, その分画試料の活性を再評価する。これを繰り返すことで目的の活性物質を精製する。精製後, NMR や

E-mail:

中島琢自 (takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp) (現, 早稲田大学リサーチイノベーションセンター 〒162-0041 東京都新宿区鶴巻町 513)

教員

松尾洋孝 (現, 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所),

稲橋祐起 (現, 北里大学大村智記念研究所),

須賀拓弥 (現, 日本マイクロバイオファーマ株式会社)

MSなどを用いて構造解析を行う。この方法で、微生物代謝産物から多くの医薬品が発見された。しかし、微生物が生産する天然物そのものが抗生物質として利用されたのは、1987年に発見され、2003年に上市されたりボペプチド系抗生物質ダプトマイシンが最後である (Silver, 2011)。Baltz (2006) は、環境から 10^7 株の放線菌を分離すればダプトマイシンを発見できると報告している。多くの製薬企業は以下の理由から天然物探索研究から撤退している。すなわち、微生物の収集・培養、生物活性評価、精製や構造決定に時間と費用がかかり、また、微生物が生産する化合物は構造的に多様で、合成展開が難しい。

一方、1990年代に欧米の製薬企業で相次いで導入されたハイスループットスクリーニング (HTS) は、化合物ライブラリーの評価を高速で行うことができ、初期の新薬候補化合物の探索や医薬品リード化合物の選択に用いられるようになった。日本の製薬企業でも HTS を導入する傾向になり、医薬品の探索源が天然物からコンビナトリアル合成品へと移り変わった。コンビナトリアル合成品は、当初は出発原料にシキミ酸を用い、200万以上の二環性骨格化合物 (Derek *et al.*, 1998)、最近ではビルディングブロックとして注目されている窒素が結合したアルキン化合物イナミドを用いた合成品 (Wang *et al.*, 2014) などが使用されている。上に述べた最後の天然物抗生物質ダプトマイシンの発見と時を同じくして創薬研究に HTS が用いられた。しかし、コンビナトリアル合成品から医薬品となった例はほとんど無く、近年、天然物の構造や生物活性の多様性が再評価され、再度微生物代謝産物の探索研究が注目されつつある。一例として、クロイソカイメン由来のハリコンドリン B を元に創薬されたエブリン (Towle *et al.*, 2001) は、2010年に抗がん剤として FDA に承認された。この成果は、天然物が創薬の探索源として依然活用できることを示してい

る。化合物の構造多様性はケミカルスペースによって表すことができる (Christopher, 2004)。ケミカルスペースは、化合物の溶解性など物理化学的な性質や化合物に含まれる全炭素中の sp^3 炭素の割合を示す F_{sp^3} 係数が高い (Lovering *et al.*, 2009) などのトポロジカルな構造的特徴など、化合物の化学的特性範囲を評価できる。骨格多様な天然物は化学合成品よりケミカルスペースが広いといわれており、創薬研究に用いられるリード化合物として再評価されている。

ゲノム解析技術の進展により、微生物は多種多様な二次代謝産物の生合成遺伝子を有することがあきらかとなった (Crits-Christoph *et al.*, 2018)。その二次代謝生合成経路はポリケチド、メバロン酸・非メバロン酸、アミノ酸、糖質、シキミ酸経路の5つに大別できる。単独もしくは複数の代謝系が関わって二次代謝産物 (天然物) の複雑・多様な構造が生み出される。そこには二次代謝の基質となる原料の違いや修飾酵素など様々な要因が関わっており、ナナオマイシン類 (Fig. 1; Ōmura *et al.*, 1974; Nakashima *et al.*, 2017a; Nakanishi *et al.*, 2019; Matsuo *et al.*, 2019a, 2019b) に見られる様に、放線菌 *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966 株 1 菌株から、今回の我々の成果を含めて 12 類縁体が発見された。また、これらの類縁体はわずかな構造的な違いにより異なる生物活性を示した。培養方法や検出方法の工夫により微生物が生産する二次代謝産物の種類は天文学的な数になる。

微生物培養液には多くの夾雑物が含まれており、従来から行われている生物活性ではメイン物質の活性の陰に隠れてしまい、見落としている可能性がある。近年、クロマトグラフィーと質量分析は目覚ましい発展を遂げ、高分離・高感度・高分解能な質量スペクトルが得られ、正確に微量成分を分析できるようになってきた。

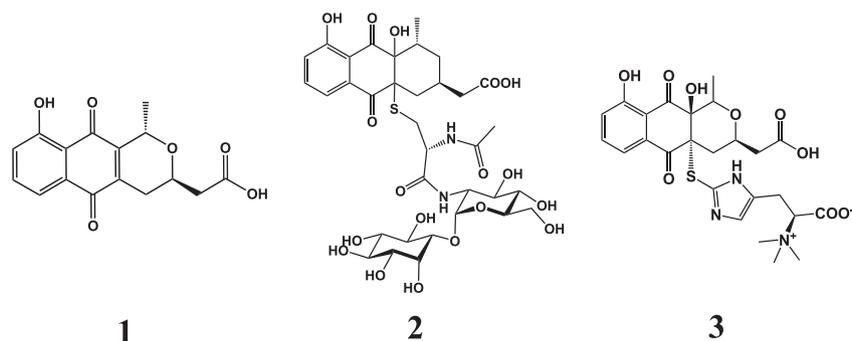


Fig. 1 Structures of nanaomycin analogs. Nanaomycin A (1) showed antimicrobial activity against *Trichophyton* spp. Nanaomycin H (2) and nanaomycin K (3) showed cytotoxic activity against MCDK cell-induced Epithelial Mesenchymal Transition.

本寄付講座では、微生物の多様な化合物生産能力を引き出すために、特定の生物活性ではなく、LC/UVやLC/MS等で化合物の物理化学的性状を解析し、化合物の新規性を予測して単離・精製および構造決定を行う方法で新規物質の探索を行った。この生物活性によらない探索法を physicochemical (PC) screening (Nakashima *et al.*, 2017b; Takahashi & Nakashima, 2018; 高橋・中島, 2018) と称した。

北里大村創薬グループは、長年に渡り、様々な分離法を駆使して微生物株を分離し、その培養液をスクリーニングに供し、エバーメクチン (Burg *et al.*, 1979) やラクタシスチン (Ōmura *et al.*, 1991) など有用物質を含む約 520 の新規物質を発見してきた。北里微生物資源ライブラリー (KML) では、これら生産菌株と探索研究の過程で既知物質と同定された物質の生産菌も含めて、長期保存法等により保存されている。常時、多様な微生物資源を得るために、分離法の工夫や様々な環境に注目し、放線菌や糸状菌を分離している。例えば、植物の根より分離される放線菌は、一般土壌からは分離されにくい *Streptomyces* 属以外の希少放線菌が多く、その中から新属・新種の放線菌を多数報告している (Matsumoto & Takahashi, 2017)。

本寄付講座は、北里大村創薬グループの共同研究体制の一員として参画し、KMLに保存されている様々な菌株の培養液を用いて PC screening による新規物質の探索を行った。

PC screening 法の概略は以下の通りである。予め設定しておいた 4 種類の液体培地で培養後、当量のエタノールを加え、よく混和し菌体を破碎した後に遠心により上清を回収し、分析試料とした。LC/MSやLC/UV分析データを取得後、培養液抽出物に含まれている質量分析値や紫外線極大吸収のデータを Dictionary of Natural Products (DNP, CRC press, Taylor & Francis Group) で検索した。質量分析は内部標準もしくは外部標準で精密質量値を取得し、可能な限り分子式まで求めた。分子量が大きいものは範囲をもたせた MS 値で検索した。紫外線極大吸収値と合わせることで既知物質の dereplication の精度が向上し、さらに生産菌情報などから化合物を絞り込んだ。絞り込んだ化合物の MS/MS フラグメントの計算値と実測値を合わせて化合物を推定した。既知物質と同定された化合物の MS/MS フラグメントをライブラリ化し、インハウスデータベースとして構築した。

第二章 研究成果の概要

1) 質量分析による新規物質の探索

探索源としては KML の保存菌株および特殊環境から

分離した糸状菌を用いた。

(i) 長期保存株 KML: 約 1,200 の放線菌培養液抽出物の LC/MS 分析データを用い、主成分分析 (MakerView™ ソフトウェア, エービーサイエックス) により解析した。この主成分分析により、複数のサンプル群の間でデータを比較した。ここで、データセットのグループ化を行い、そのグループをスコアプロットするとグラフィカルに表示できる (Fig. 2)。培養液抽出物について主成分分析を行って、20,000 のピークを抽出し、化合物の分子量関連イオンであるモノアイソトピックピークを検出し、4,662 ピークまで絞り込んだ。それぞれのピークの精密質量値、紫外線極大吸収スペクトル、MS/MS フラグメント分析情報を得た。これらの情報を天然物データベース DNP に掲載されている既知物質の情報と比較することにより、新規と推定される化合物を選択し、精製および構造決定へと進めた。

Fig. 2 に一例を示す。 *Streptomyces griseus* OS-3601 株が生産する一つのモノアイソトピックピークに着目した。その精密質量値から選択した化合物の分子組成は $C_{17}H_{24}N^+$ と推定できた。紫外線極大吸収は 272 および 284 nm を示し、これらのデータを DNP で検索したところ、既知物質の情報と一致しなかったため、新規物質と推定した。各種クロマトグラフィーで精製後、NMR で解析し、イミニマイシン類 (Nakashima *et al.*, 2016a, 2016b) と決定した。

本方法で、 *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966 株からナナオマイシン類 (Nakashima *et al.*, 2015b, 2017a; Matsuo *et al.*, 2019a, 2020a), *Actinomadura* sp. K13-0306 株からサガミラクタム (Kimura *et al.*, 2016), *Allostreptomyces* sp. K12-0794 株からハムラマイシン類 (Suga *et al.*, 2018), *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株からピリゾマイ

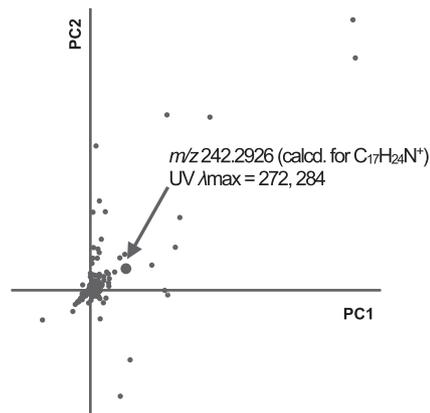


Fig. 2 Principal component analysis of microbial culture extracts.

シン (Kimura *et al.*, 2018a), *Mumia* sp. YSP-2-79 株からムミアマイシン (Kimura *et al.*, 2018b) を発見した。

(ii) 特殊環境分離糸状菌：北里生命科学研究センターでは海洋島や深海の堆積物などの特殊環境から新属・新種の糸状菌や希少な糸状菌を多数分離している。海洋島および深海由来糸状菌を探索源として、上記の (i) と同様に PC screening を行い、海洋島由来糸状菌 *Pochonia chlamydosporia* var. *spinulospora* FKI-7537 株よりポコニオライド類 (Miyano *et al.*, 2018), *Neocosmospora* sp. FKI-7792 株よりケトチベルシン C (Matsuo *et al.*, 2020b), 深海由来糸状菌 *Sarcopodium* sp. FKI-0025 株よりサルコポディノール類 (Matsuo *et al.*, 2018), *Penicillium brevicompactum* FKI-0123 株よりシブラルフェリン (Matsuo *et al.*, 2019b), *Penicillium steckii* FKI-0213 株よりハツサミド類を発見した。

2) ヘテロ元素含有新規物質の探索 (新規含窒素化合物と新規含硫黄化合物)

天然物データベース DNP には 267,132 の有機化合物が登録され、そのうち含窒素化合物は 62,100 化合物 (23%)、含硫黄化合物は 5,087 化合物 (2%) である。一方、KEGG MEDICUS (Kanehisa *et al.*, 2010) には日本および米国の医薬品添付文書をもとに 10,484 の医薬品が登録されている。そのうち、7,207 化合物 (69%) が窒素、2,430 化合物 (23%) が硫黄を含んでいる。このようにヘテロ元素を含む化合物は構造的に多様性を生み出し、医薬品として利用されている化合物も多い。そこで、窒素または硫黄を含む化合物のスクリーニング系を構築し、新規物質探索を行った。

新規含窒素化合物は主成分分析と窒素ルールを用いて探索した。窒素ルールとは、分子量が奇数になる化合物は窒素が奇数個含まれているというルールである。主成分分析は MakerView™ ソフトウェアを用いて解析し、分子量が奇数のピークを選択し、PC screening より新規と推定した化合物を精製・構造決定した。その結果、*Trichoderma virens* FKI-7573 株よりトリコチオネイックアシッド (Miyano *et al.*, 2020), *Oidiodendron maius* FKI-7498 株よりペニシドン E, *Sarocladium oryzae* KF-140 株よりサロクラディックアシッドを発見した。

天然物に含まれるヘテロ元素のなかで硫黄は窒素に次いで含有率が多い元素である。しかし、硫黄化合物を簡便かつ選択的に探索する方法はない。そこで、Fig. 3 に示す硫黄選択的酸化反応 (モリブデン酸化), (Trost & Masuyama, 1984) および質量分析計を組み合わせた微生物由来含硫黄物質検出系 (MoS-screening) を構築した (Matsuo *et al.*, 2020c)。MoS-screening により *Trichoderma polypori* FKI-7382 株からチオポリジオール類 (Matsuo *et*

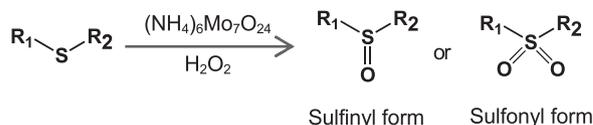


Fig. 3 Principle of molybdenum oxidation reaction.

al., 2020d), *Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961 株からレプトチオニンを見出した。

3) エルゴステロール修飾シリカ (ESシリカ) を用いた新規物質の探索

真菌の細胞膜主要成分であるエルゴステロールは抗真菌物質アンホテリシン B の標的分子である。シリカゲルのシラノール基にエルゴステロールを結合させた樹脂 (ESシリカ) を開発し、エルゴステロールと特異的に結合する化合物を放線菌培養液から探索した。放線菌培養液抽出物 859 サンプルから ESシリカと結合する化合物を探索し、既知物質 94 化合物を同定して、推定新規物質 29 化合物を見出した。既知物質は、ポリエン化合物だけでなく、様々な化合物が ESシリカに結合することがわかった。また、ピペラジン化合物や核酸系化合物など窒素を含む複素環式化合物が多く検出され、既知物質 94 化合物のうち 75 化合物 (80%) が微生物アルカロイドだった。新規物質と推定した化合物の中から *Amycolatopsis* sp. K16-0194 株よりジピリマイシン類 (Izuta *et al.*, 2018) および *Streptomyces* sp. K16-0477 株よりデイジアミド C を発見した。同定した既知物質やジピリマイシンの結果より、ESシリカは微生物アルカロイドと結合する可能性が示唆された。

4) PC screening を活用した放線菌ゲノムからの新規物質探索および生合成研究

放線菌ゲノムからの生合成遺伝子の探索と PC screening を組み合わせ、新規物質の取得を試みた。ユニークな骨格であるアミノビニルシステインの生合成遺伝子を放線菌 768 株から探索することで "*Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis*" AM-3603 株 および *S. nitrosporeus* K93-0711 株よりサイペマイシン新規類縁体を発見した。また、*Streptomyces* sp. KO-7888 株より二次代謝を正に制御する転写制御因子を利用した新規物質探索を行うことで新規リポペプチド、サーペプチン類を発見した (Koomsiri *et al.*, 2019)。さらに、PC screening により得られた新規物質の生合成研究を行い、トレハンジェリン (Inahashi *et al.*, 2016)、アクチノアロライド (Inahashi *et al.*, 2018) およびピリゾマイシンの生合成遺伝子クラスターを同定した。

第三章 おわりに

2014年から2020年までの寄付講座期間中にPC screeningで見いだされた新規物質をTable 1にまとめた。放線菌19株および糸状菌10株から、新規物質32化合物(類縁体を含めると50化合物)を発見した。ここで特記される点は、これらPC screeningによって発見された化合物の多くは、単離・構造決定後に何らかの生物活性が見いだされることである。ヘテロ元素含有新

規物質や生体分子修飾シリカのスクリーニングでは、多くの推定新規化合物が含まれていた。

1940年から2010年で微生物の代謝産物から33,500の化合物が発見され、その中の10,800は、2,000年からの10年間で発見されている(Bérdy, 2012)。また、Newman & Cragg (2016)によると、1981年から2014年の34年間に1,211の低分子医薬品が米国食品医薬品局(FDA)で承認され、その50%程度が天然物あるいはそれをヒントにして創られた化合物であり、天然物探索の重要性

Table 1 List of new compounds by PC screening (2014.10–2020.3)

Compound	year	Producing microorganism	Biological activity (year)
Nanaomycin F & G	2014		
Nanaomycin H	2016	<i>Streptomyces rosa</i> subsp. <i>notoensis</i>	Inhibitor of EMT cells in H & K (2016, 2017)
Nanaomycin I, J, K	2017	OS-3966	
Nanaomycin L	2018		
Sagamilactam	2015	<i>Actinomadura</i> sp. K13-0306	Cytotoxicity (2015)
Iminimycin A	2015		
Iminimycin B	2016	<i>Streptomyces griseus</i> OS-3601	Antibacterial activity (2015, 2016)
Mumiamicin	2015	<i>Mumia</i> sp. YSP-2-79	Antibacterial activity (2015) Antioxidative activity (2016)
Mangromicin L	2015	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	Antioxidative activity (2015)
Pyrizomicin A, B	2016	K10-0216	Anti-tumor (2016)
5-Nitro tryptophan K12-0360 F	2016		
	2017	<i>Saccharothrix</i> sp. K12-0360	Anti-malaria
Hamuramicin A	2016		
Hamuramicin B	2017	<i>Allostreptomyces</i> sp. K12-0794	Antibacterial activity (2017)
Sarcopodinol A, B	2016	<i>Sarcopodium</i> sp. FKJ-0025	Antibacterial activity (2016)
Pochoniolode A, B	2016	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>spinulospora</i>	Antioxidative activity (2016)
Pochoniolode C	2017	FKI-7537	
Chaetochiversin C	2016	<i>Neocosmospora</i> sp. FKI-7792	Antioxidative activity (2016)
Bisoxazolomycin	2016	<i>Streptomyces subflavus</i> subsp. <i>irumaensis</i> AM-3603	Antibacterial activity (2016)
AM-3603 A	2016	<i>Streptomyces subflavus</i> subsp. <i>irumaensis</i> AM-3603	Antibacterial activity (2016)
K93-0711 A	2016	<i>Streptomyces nitrosporeus</i> K93-0711	Antibacterial activity (2016)
K07-460C25-2	2016	<i>Streptosporangium oxazolanicum</i> K07-0460/ <i>Streptomyces lividans</i> TK24	
Tatemasporeine	2017	<i>Actinomycetospora</i> sp. YM25-058	Fluorescent
Dipyrimicin A, B	2017	<i>Amycolatopsis</i> sp. K16-0194	Ergosterol binding assay (2017)
Virantmycin B, C	2017	<i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	Antifungal activity (2017)
Trichotoneic acid	2017	<i>Trichoderma virens</i> FKI-7573	Antioxidative activity (2018)
Hatsusamide A	2017		Cytotoxicity (2018)
Hatsusamide B	2018	<i>Penicillium steckii</i> FKI-0213	Anti-malarial activity (2018)
Cipralphelin	2018	<i>Penicillium brevicompactum</i> FKJ-0123	Antioxidative activity (2018)
Sattachipmycin	2018	<i>Streptomyces</i> sp. GKU 257-1	Biofilm formation inhibitor (2018)
Penicidone E, F	2018	<i>Oidiodendron maius</i> FKI-7498	Antioxidative activity (2018)
Holothin analog	2018	<i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	
Leptothionine A, B, C	2018	<i>Leptobacillum leptobactrum</i> FKI-7961	Cytotoxicity (2018)
Sarcocladic acid	2018	<i>Sarcocladium oryzae</i> KF-140	
Thioporidiol A, B	2019	<i>Trichoderma polypori</i> FKI-7382	Anti- <i>Candida</i> activity
Dietziamide C	2019	<i>Streptomyces</i> sp. K16-0477	
K18-0336 A	2020	<i>Streptomyces</i> sp. K18-0336	
KMA-0360 A	2020	<i>Streptomyces</i> sp. KMA-0360	

が指摘されている。当寄付講座はPC screeningという手法を用いて、微生物が生産する物質に焦点をあて、新規物質を探索してきた。これまで微生物の二次代謝産物から多くの化合物が発見され、有効活用されているが、当寄付講座の結果は、多くの新規物質が未発見のまま残されていることを示唆している。

今回の研究は、新規物質探索では微生物資源の質および多様性が重要であることを示している。Tiwari & Gupta (2012) は、いわゆる希少放線菌から発見された化合物についてまとめており、新規物質の探索源として興味深いと述べている。本寄付講座でも、Table 1に示したように *Streptomyces* 属 10 株であるのに対して、9 株の希少放線菌から新規物質を発見した。寄付講座以前に行っていたPC screeningで発見したマングロマイシン類 (Nakashima *et al.*, 2014a, 2014b, 2015a) やトレハンジェリン (Nakashima *et al.*, 2013) などを含めると、希少放線菌から発見できた新規物質の数は *Streptomyces* 属から見出された数を上回る。一方、糸状菌に目を向けると、頻繁に分離される *Penicillium* 属から3つの新規物質が発見できたが、これまで二次代謝産物の生産菌として報告例が少ない *Pochonia chlamyosporia* var. *spinulospora* FKI-7537 からポコニオライド類、*Leptobacillium leptobactrum* FKI-7961 からレプトチオニン類、*Trichoderma polypori* FKI-7382 からチオポリジオール類などの新規物質が発見できた。

近年、天然物探索が見直され、再び微生物由来の新規化合物の探索が注目されている (Grushkin, 2013)。ゲノム解析により、菌株によっては30以上の二次代謝産物生合成遺伝子を持っていることが報告されており、本寄付講座で発見できた新規物質の結果は当然のこととも言える。しかし、ゲノム解析から予測される化合物と、実際に取得できる化合物には数の上で大きな開きがあり、多くの新規物質が未発見のまま取り残されている。PC screeningは物質ありきで進めてきたが、化合物があれば新たな活性が見つかり社会に貢献できる道が開ける。また、二次代謝産物の生産が確認された菌株が保存されていることが重要であり、見落とされてきた能力を新たに発見できる可能性を秘めている。菌株の遺伝子解析により得られる情報や遺伝子操作等に加え、PC screeningによるアプローチとこれまで蓄積してきたデータベースを駆使することによって新規化合物発見も飛躍的に高まると考える。

本寄付講座の最大の目標である実用化研究では、以下の2件があげられる。

そのひとつは、エルゴステロールと特異的に結合する化合物を検出するシリカゲル (ESシリカ) の開発であり、2019年に富士シリシア化学㈱から市販された。

もうひとつはトレハンジェリンの発見である。トレハンジェリンは西表島のキンギン草の根から分離された希少放線菌 *Polymorphospora rubra* K10-0510 株の培養液からPC screeningで見出された。本物質は、トレハロースに2分子のアンジェリカ酸が結合した構造であり、当初、細胞膜の光酸化抑制効果が見出されていた (Nakashima *et al.*, 2013)。本寄付講座期間中に企業と共同研究で応用展開し、コラーゲン生成促進効果 (神谷ら, 2016) およびオートファジー誘導効果 (小坂ら, 2017) が確認された。現在、トレハンジェリンの生産量は産業利用できるまで向上し、効果はコラーゲン生成促進効果に加え、ラメラ構造の修復能力 (神谷ら, 2020) が観察された。また、コマツナを使ったポット試験で葉緑体濃度を向上させる効果 (矢嶋・小坂, 2019) を示した。トレハンジェリンは株式会社ファンケルおよび長瀬産業株式会社と共同で開発を進め、2021年に化粧品および洗浄剤として上市予定である。

謝 辞

本研究は、公益法人発酵研究所の2014年度寄付講座助成である北里大学 北里生命科学研究所 創薬資源微生物学研究室で行われたものであります。本助成を賜った発酵研究所に深く感謝申し上げます。また、この研究は、大村 智先生および高橋洋子先生の終始変わらぬご指導とご支援によってなされたものであり、改めて心より感謝申し上げます。また、北里大村創薬グループの皆様、特に微生物資源でお世話になりました松本厚子博士および野中健一博士、構造解析でお世話になりました岩月正人博士および砂塚敏明博士に感謝申し上げます。PC screeningによる新規化合物の探索をとともに遂行して下さった、稲橋佑起博士、松尾洋孝博士、須賀拓弥博士と多くの学生諸氏に感謝申し上げます。

文 献

- Baltz, R.H. 2006. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 507-513.
- Bérdy J. 2012. Thought and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.* **65**: 385-395.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E. *et al.* 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 361-367.
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J. & Sanders, A.G. 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* **236**: 226-228.
- Christopher, M.D. 2004. Chemical space and biology. *Nature* **432**: 824-828.
- Crits-Christoph, A., Diamond, S., Butterfield, C.N., Thomas, B.C.

- & Banfield, J.F. 2018. Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. *Nature* **558**: 440-444.
- Derek, S.T., Michael, A.F., Matthew, D.S. & Stuart L.S. 1998. Stereoselective synthesis of over two million compounds having structural features both reminiscent of natural products and compatible with miniaturized cell-based assays. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 8565-8566.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**: 226-236.
- Grushkin, D. 2013. Natural products emergent. *Nature Medicine* **19**: 390-392.
- *Inahashi, Y., Shiraishi, T., Palm, K., Takahashi, Y., Ōmura, S., Kuzuyama, T. & Nakashima T. 2016. Biosynthesis of trehangelin in *Polymorphospora rubra* K07-0510: Identification of metabolic pathway to angelyl-CoA. *ChemBiochem.* **17**: 1442-1447.
- *Inahashi, Y., Shiraishi, T., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Kuzuyama, T. & Nakashima T. 2018. Identification and heterologous expression of the actinollolide biosynthetic gene cluster. *J. Antibiot.* **71**: 749-752.
- *Izuta, S., Kosaka, S., Kawai, M. *et al.* 2018. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. *J. Antibiot.* **71**: 535-537.
- *神谷義之, 榎本有希子, 松熊祥子, 中島琢自, 高橋洋子, 大村 智 2016. 新規トレハロース化合物 trehangelin の抗老化機能に関する研究. 第136回日本薬学会大会. 28AB-pm183.
- *神谷義之, 横田麻美, 鈴木民恵, 桜井哲人, 中島琢自, 高橋洋子, 大村 智 2020. 新規トレハロース化合物 trehangelin の皮膚バリア機能に関する研究. 第140回日本薬学会大会. 27P-pm160.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. & Hirakawa, M. 2010. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **38**: D355-360.
- *Kimura, T., Inahashi, Y., Matsuo, H., Suga, T., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018a. Pyrizomicin A and B: structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **71**: 606-608.
- *Kimura, T., Iwatsuki, M., Asami, Y. *et al.* 2016. Anti-trypanosomal compound, sagamilactam, a new polyene macrocyclic lactam from *Actinomadura* sp. K13-0306. *J. Antibiot.* **69**: 818-824.
- *Kimura, T., Tajima, A., Inahashi, Y. *et al.* 2018b. Mumiamicin: Structure and bioactivity of a new furan fatty acid from *Mumia* sp. YSP-2-79. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **64**: 62-67.
- *Koomsiri, W., Inahashi, Y., Leetanasaksakul, K. *et al.* 2019. Sarpeptins A and B, lipopeptides produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 overexpressing a specific SARP regulator. *J. Nat. Prod.* **82**: 2144-2151.
- *小坂邦男, 曾田匡洋, 田中麻美, 中島琢自, 稲橋佑起, 高橋洋子, 大村智 2017. トレハンジェリンAはSirt1活性化を介してオートファジーを誘導する. 2017年度日本農芸化学会大会. 2C14p12.
- Lovering, F., Bikker, J. & Humblet, C. 2009. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J Med Chem.* **52**: 6752-6756
- *Matsumoto, A. & Takahashi, Y. 2017. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J. Antibiot.* **70**: 514-519.
- *Matsuo, H., Hanamura, Y., Miyano, R., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020c. Screening for sulfur compounds by molybdenum-catalyzed oxidation combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecules.* **25**: pii: E240.
- *Matsuo, H., Hirose, T., Mokudai, T., Nonaka, K., Niwano, Y., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020b. Absolute structure and anti-oxidation activity of chaetochiversin C isolated from fungal strain *Neocosmospora* sp. FKI-7792 by physicochemical screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (in press). doi.org/10.2323/jgam.2019.06.001
- *Matsuo, H., Mokudai, T., Higo, M. *et al.* 2019b. Cipralphelin, a new anti-oxidative *N*-cinnamoyl tripeptide produced by the deep sea-derived fungal strain *Penicillium brevicompactum* FKJ-0123. *J. Antibiot.* **72**: 775-778.
- *Matsuo, H., Nakanishi, J., Noguchi, Y., Kitagawa, K., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020a. Nanaomycin K, a new epithelial-mesenchymal transition inhibitor produced by the actinomycete "*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **129**: 291-295.
- *Matsuo, H., Noguchi, Y., Miyano, R., Higo, M., Nonaka, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T. 2020d. Thioporidiols A and B: two new sulfur compounds discovered by molybdenum-catalyzed oxidation screening from *Trichoderma polypori* FKI-7382. *Antibiotics* **9**: 236.
- *Matsuo, H., Noguchi, Y., Také, A., Nakanishi, J., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019a. Nanaomycin I and J: New nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from "*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **127**: 549-553.
- *Matsuo, H., Nonaka, K., Nagano, Y., Yabuki, A., Fujikura, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. New metabolites, sarcopodinols A and B, isolated from deep-sea derived fungal strain *Sarcopodium* sp. FKJ-0025. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**: 1323-1326.
- *Miyano, R., Matsuo, H., Mokudai, T. *et al.* 2020. Trichothioneic acid, a new antioxidant compound produced by the fungal strain *Trichoderma virens* FKI-7573. *J. Biosci. Bioeng.* **129**: 508-513.
- *Miyano, R., Matsuo, H., Nonaka, K., Mokudai, T., Niwano, Y., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. Pochoniolides A and B, new antioxidants from the fungal strain *Pochonia chlamydsoporia* var. *spinulospora* FKI-7537. *J. Biosci. Bioeng.* **126**: 661-666.
- *Nakanishi, J., Sugiyama, K., Matsuo, H., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. An Application of Photoactivatable Substrate for the Evaluation of Epithelial-mesenchymal Transition Inhibitors. *Anal. Sci.* **5**: 65-69.
- *Nakashima, T., Boonsongcheep, P., Kimura, T., Iwatsuki, M., Sato, N., Nonaka, K., Prathantururug, S., Takahashi, Y. & Ōmura S. 2015b. New compounds, nanaomycin F and G, discovered by physicochemical screening from a culture broth of *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **120**: 596-600.
- *Nakashima, T., Iwatsuki, M., Ochiai, J. *et al.* 2014a. Mangromicins A and B: Structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **67**: 253-260.

- *Nakashima, T., Kamiya, Y., Iwatsuki, M., Takahashi, Y., Ōmura, S. 2014b. Mangromicins, six new anti-oxidative agents isolated from a culture broth of the actinomycete, *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **67**: 533-539.
- *Nakashima, T., Kamiya, Y., Iwatsuki, M., Sato, N., Takahashi, Y., Ōmura, S. 2015a. Mangromicin C, a new analog of mangromicin. *J. Antibiot.* **68**: 220-222.
- *Nakashima, T., Kimura, T., Miyano, R., *et al.* 2017a. Nanaomycin H: A new nanaomycin analog. *J. Biosci. Bioeng.* **123**: 765-770.
- *Nakashima, T., Miyano, R., Iwatsuki, M. *et al.* 2016a. Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. *J. Antibiot.* **69**: 611-615.
- *Nakashima, T., Miyano, R., Matsuo, *et al.* 2016b. Absolute configuration of iminimycin B, a new indolizidine alkaloid, from *Streptomyces griseus* OS-3601. *Tetrahedron Lett.* **57**: 3284-3286.
- *Nakashima, T., Okuyama, R., Kamiya, Y., Matsumoto, A., Iwatsuki, M., Inahashi, Y., Yamaji, K., Takahashi, Y. & Ōmura, S. 2013. Trehangelins A, B and C, novel photo-oxidative hemolysis inhibitors produced by an endophytic actinomycete, *Polymorphospora rubra* K07-0510. *J. Antibiot.* **66**: 311-317.
- *Nakashima, T., Takahashi, Y. & Ōmura S. 2017b. Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. *Biochem. Pharmacol.* **134**: 42-55.
- Newman, D.J. & Cragg G.M. 2016. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**: 629-661.
- Ōmura, S., Tanaka, H., Koyama, Y., Oiwa, R. & Katagiri M. 1974. Nanaomycins A and B, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **27**: 363-365.
- Ōmura, S., Fujimoto, T., Otoguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H. & Sasaki, Y. 1991. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot.* **44**: 113-116.
- Schatz, A., Bugie, E. & Waksman, S.A. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**: 66-69.
- Silver, L.L. 2011. Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 71-109.
- *Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y. *et al.* 2018. Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *J. Antibiot.* **71**: 619-625.
- *Takahashi, Y. & Nakashima, T. 2018. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics*. **7**: pii: E45.
- *高橋洋子, 中島琢自 2018. 微生物は新規天然物の宝庫. *Japanese J. Antibiot.* **71**: 99-112.
- Tiwari, K. & Gupta, R.K. 2012. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit. Rev. Biotech.* **32**: 108-132.
- Towle, M.J., Salvato, K.A., Budrow, J. *et al.* 2001. *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Res.* **61**: 1013-1021.
- Trost, M.B. & Masuyama, Y. 1984. Chemoselectivity in molybdenum catalyzed alcohol and aldehyde oxidations. *Tetrahedron Lett.* **25**: 173-176.
- Waksman, S.A. & Tishler M. 1942. The chemical nature of actinomycin, an antimicrobial substance produced by *Actinomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.* **142**: 519-523.
- Waksman, S.A. & Woodruff, H. B. 1942. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **49**: 207-210.
- Wang, X.N., Yeom, H.S., Fang, L.C., He, S., Ma, Z.X., Kedrowski, B.L. & Hsung, R.P. 2014. Ynamides in ring forming transformations. *Acc. Chem. Res.* **47**: 560-578.
- *矢嶋 (嘉悦) 佳子, 小坂邦男 2019. 新規トレハロース化合物トレハンジェリンの施用がコマツナの品質に及ぼす影響. 園芸学会. Poster No.098.

* 本助成で得られた研究成果の報告

質量分析による新規物質の探索

松尾 洋孝, 中島 琢自

北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

The search for new compounds by mass spectrometry

Hiroataka Matsuo, Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan

Microorganisms have been known to produce natural products with unique chemical structures. These products are produced from their interaction with the environment they live in as a strategy for survival. This suggests that these diverse chemical structures are often associated with vast strong biological activity. This is reason why natural products are an important source for drug discovery. At present bioactive compounds were often screened through bioactivity-guided approach. However, this approach could miss potentially valuable compounds in such minor components or secondary metabolites without the specific biological activity, and it is possible to miss or overlook potential and valuable compounds. The development of analyzers, such as HPLC and MS, are possible to physicochemically detect compounds produced by microorganisms. In our laboratory, we have identified new unique compounds using the physicochemical (PC) screening approach. PC screening is performed by indexing the physicochemical properties of the produced compounds. In this study, we report the new compounds and their biological activities discovered by PC screening from actinomycete and fungal strains.

Key words: Kitasato Microbial Library, deep-sea fungi, endophytic actinomycetes, mass spectrometry, physicochemical screening

緒 言

微生物は、多様な構造をもつ二次代謝産物を生産することで知られており、これまで様々な生物活性物質を求めて探索研究がなされてきた。放線菌からストレプトマイシン (Schatz *et al.*, 1944) やエバーメクチン (Burg *et al.*, 1979) 等、糸状菌からペニシリン (Fleming, 1929) や

コンパクチン (Endo *et al.*, 1976) 等が発見され、医薬、動物薬、農薬などの分野で大きな社会貢献を果たしてきた。

従来から行われている探索研究として生物活性を指標とした方法がある。この探索方法は、微生物培養液抽出物がある特定の生物活性で評価し、活性を示した抽出物を分配やクロマトグラフィーなどで分画し、その分画の活性を再評価することで精製を進め、化合物を特定していく。この方法は、合目的的で開発の道筋が明確であり将来の展開も考え易い。しかし、この方法だけでは、微生物の多くがその物質生産能力を十分に生かされずに見逃されてきたと考えられる。

Crits-Christoph *et al.* (2018) は、土壌から抽出した遺伝子の解析から、微生物は多くの二次代謝産物生合成遺伝子を保有していることを報告している。また、これらの遺伝子には休眠状態のものも多く、覚醒させる遺伝子工学技術も開発されつつある (尾仲, 2014; 浅井・大島, 2016)。例えば、土壌分離放線菌のリボゾームまたは

E-mail: matsuo-h@lisci.kitasato-u.ac.jp, takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp

共同研究者：目代貴之 (東北大学金属材料研究所),

庭野吉巳 (秀明大学看護学部),

大西康夫 (東京大学大学院農学生命科学研究科),

中西 淳 (国立研究開発法人物質・材料研究機構),

重村克己 (神戸大学医学部),

坂戸久子 (株式会社 BF アグロ),

松本厚子 (北里大学北里生命科学研究所),

野中健一 (北里大学北里生命科学研究所),

岩月正人 (北里大学北里生命科学研究所),

廣瀬友靖 (北里大学北里生命科学研究所),

砂塚敏明 (北里大学北里生命科学研究所)

RNAポリメラーゼに変異を導入し、抗生物質耐性をもたせることで、休眠遺伝子が活性化し、親株では生産していなかった4分子のピペリジンを含む新規抗菌物質ピペリダマイシンを生産するようになったとの報告がある(Hosaka *et al.*, 2009). このような技術革新によって、多様な二次代謝生成遺伝子を有する微生物がさらに活かされることが期待される。

そこで、本寄付講座では、微生物培養液抽出物から、生産化合物の物理化学的性状をLC/UVやLC/MSなどで解析し、データベースと照合することにより化合物の新規性を予測し、単離・精製を進めた。本アプローチをphysicochemical (PC) screening (Nakashima *et al.*, 2017; Takahashi & Nakashima, 2018) と称し、新規物質の探索研究を適用した。使用した微生物は、北里大学大村創薬グループより提供された。大村創薬グループでは、長年に渡り微生物が生産する二次代謝産物から新規物質の探索研究を進め、類縁体を含めて約520の新規物質を発見してきた(Ōmura, 2015)。これらの生産菌株と探索研究の過程で得られた既知物質生産菌は北里微生物資源ライブラリーと称するコレクションとして、長期保存法により保存しており、本研究では、その保存微生物を探索研究に用いた。また、共同研究先である北里生命科学研究所微生物資源研究センターや微生物機能研究室では、毎年約1,000株以上の糸状菌や放線菌を分離しており、その分離源が特徴的である。これまでに日本本土と一度も陸続きとならなかった海洋島や海面から200m以深である深海、植物の根などである。このような特殊環境から新属・新種の糸状菌や、一般土壌からあまり分離されない希少な糸状菌や放線菌が分離されている(増間・野中, 2013, Matsumoto & Takahashi, 2017)。海洋島、深海、植物根などの特殊環境から取得された糸状菌や放線菌からの新鮮分離株を探索研究に用いた。

実験材料と実験方法

北里微生物資源ライブラリーの利用

スタウロスポリン(Ōmura *et al.*, 1977) やナナオマイシン(Ōmura *et al.*, 1974) など大村創薬グループで発見した新規物質を生産する放線菌の他に、ストレプトマイシンなど既知物質を生産する放線菌が長期保存法により保存されている。これらの長期保存放線菌340株を復元し、4種類の培地で培養し、機器分析試料(1,360試料)とした。

特殊環境から分離した糸状菌

北里生命科学研究所微生物資源研究センターより提供された海洋島由来糸状菌705株および深海由来糸状菌

320株が、それぞれ4種類の異なる培地で培養された2,820および1,280(計4,100)サンプルの培養液を新規物質探索源として使用した。

生産培地

放線菌用生産培地として次の4種類を用いた。

301 培地: 2.4 % starch, 1.0 % glucose, 0.5 % yeast extract, 0.3 % meat extract, 0.3 % peptone, 0.4 % CaCO₃, pH7.0; No.51 培地: 0.5 % glucose, 0.5 % corn steep powder, 1.0 % oatmeal, 1.0 % pharmedia, 0.5 % K₂HPO₄, 0.4 % MgSO₄·7H₂O, 1mL/L trace metals solution (0.1 % FeSO₄·7H₂O, 0.1 % MnCl₂·4H₂O, 0.1 % ZnSO₄·7H₂O, 0.1 % CuSO₄·5H₂O, 0.1 % CoCl₂·6H₂O), pH7.0; No.54 培地: 2 % soluble starch, 1 % defatted wheat germ, 0.5 % glycerol, 0.3 % dry yeast, 0.3 % meat extract, 0.5 % CaCO₃, pH7.0; NSGS 培地: 3.3 % nutrient broth, 3.3 % soybean meal, 2.2 % glycerol, 2.2 % soluble starch, 0.5 % CaCO₃, pH未調整

糸状菌用生産培地として次の4種類を用いた。

F8 培地: 3 % soluble starch, 1 % glycerol, 2 % soybean meal, 0.3 % dry yeast, 0.3 % KCl, 0.2 % CaCO₃, 0.05 % MgSO₄·7H₂O, 0.05 % KH₂PO₄; F8Q 培地: 3 % soluble starch, 1 % glycerol, 2 % soybean meal, 0.3 % dry yeast, 0.3 % KCl, 0.2 % CaCO₃, 0.05 % MgSO₄·7H₂O, 0.05 % KH₂PO₄, 0.03 % , quercetin dehydrate; F36 培地: 500 g rice, 5μg/mL seaweed tea (0.1 mg/mL); F38 培地: 3.0 % sucrose, 3.0 % soluble starch, 1.0 % malt extract, 0.3 % Ebios, 0.5 % KH₂PO₄, 0.05 % , MgSO₄·7H₂O, pH未調整

LC/MS測定条件

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)はAgilent 1200 series(アジレントテクノロジー)、質量分析装置はQSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System(エービー・サイエックス)およびTripleTOF[®] 5600+ System(エービー・サイエックス)を用いた。LC/MSの測定条件はTable 1および2に記載した。

推定新規物質の選定

主成分分析ソフトMarkerView[™]ソフトウェア(エービー・サイエックス)を用いて、新規物質を探索した。MarkerView[™]ソフトウェアはメタボロミクスやタンパク質/ペプチドバイオマーカーのプロファイリング用に設計されたプログラムである。放線菌培養液抽出物1,360試料をQSTARで分析し、得られたデータをMarkerView[™]ソフトウェアで解析し、1試料にのみ含まれている化合物を選択した。一方、糸状菌培養液抽出物4,100サンプルの培養液をQSTARで分析し、新属・新種の可能性を

Table 1 LC/MS condition in QSTAR

Column	Inertsil® ODS-4 3.0 i.d. x 150 mm (GL science)
Eluate	5% MeOH + 0.1 % formic acid (0-5 min), 5-100% MeOH + 0.1 % formic acid (5-35 min), 100% MeOH + 0.1 % formic acid (35-40 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column Temp.	40°C
Detection	UV-Vis (200~600 nm), TOF-MS (m/z 100-2000)
Injection vol.	5 µL
Ionization mode	ESI positive
Ion spray voltage	5,500 V
Ion source gas	50 L/min
Curtain gas	30 L/min
Declustering Potential	50 V
Focusing potential	250 V
Temperature	450°C
Detector voltage	2300 V

Table 2 LC/MS condition in TripleTOF® 5600+

Column	Capcell Core C18 2.1φ x 100 mm (Osaka soda)
Eluate	5% MeOH + 0.1 % formic acid (0-2 min), 5-100% MeOH + 0.1 % formic acid (2-10 min), 100% MeOH + 0.1 % formic acid (10-13 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40°C
Detection	UV-Vis (200~600 nm), TOF-MS (m/z 100-2000)
Injection vol.	1 µL
Ionization mode	ESI positive
IonSpray Voltage Floating	5,500 V
Ion source gas 1	50 psi
Ion source gas 2	50 psi
Curtain gas	25 psi
Declustering Potential	80 V
temperature	500°C
Collision Energy	45 V
Collision Energy Spread	15 V
Ion Release Delay	30 µs
Ion Release Delay Width	15 µs

有する糸状菌の培養液や特徴的な紫外線 (UV) スペクトルを有する化合物を選択した。選択した化合物は、Analyst® ソフトウェア (エービー・サイエック) を用いて、精密質量値や UV スペクトルなど、選択した化合物の物理化学的性状を解析した。そのデータを用いて、天然物データベース Dictionary of Natural Products (DNP) に収録されている既知物質情報の比較や MS/MS データからなるインハウスデータベースで検索し、新規性を推定した。

培養、精製および構造解析

新規物質と推定された化合物を取得するため、大量培養を行い、シリカゲルカラムや ODS カラムクロマトグ

ラフィーなどにより精製した。得られた物質は、MS および NMR 等により平面構造の解析後、各手法を用いて立体構造の決定を検討した。なお、詳細については各化合物の論文を参考にさせていただきたい。

生物活性評価

抗菌活性試験は、ペーパーディスク法で測定した。真菌菌として *Candida albicans* ATCC 64548, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Mucor racemosus* IFO 4581, グラム陽性菌としてとして *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, グラム陰性菌としてとして *Escherichia coli* NIHJ, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* KB 88 を検定菌とした。

細胞毒性試験は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて行った。ヒト子宮頸部類上皮癌細胞 HeLa S3, ヒト結腸腺癌細胞 HT29, ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549, ヒト肺腺癌細胞 H1299, ヒト膵臓腺癌 PANC-1, ヒト急性単球性白血病細胞 THP-1, ヒトT細胞性白血病細胞 Jurkat, ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いた。

抗酸化活性は、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素消去活性を評価した。

結果および考察

質量分析による新規物質の探索

1,360 放線菌培養液抽出物 (物質生産放線菌約 340 株を 4 種類の培地で培養した培養液) の LC/MS データを MarkerView ソフトウェアで主成分分析した。 *Streptomyces griseus* OS-3601 株 (ストレプトマイシン生産菌として 1973 年に凍結乾燥で長期保存) の No.54 培地 (小麦胚芽培地) の培養液抽出物にのみ検出された化合物に注目した。その化合物の物理化学的性状は、 m/z 242.1910 $[M]^+$ ($C_{17}H_{24}N^+$), UV 極大吸収 270 および 280 nm を示した。この物理化学的性状をデータベース (Dictionary of Natural Products およびインハウスデータベース) で検索した結果、該当する化合物はなく、新規物質 (イミニマイシン A と命名) と推定し、精製および構造決定した。

S. griseus OS-3601 株を 10L の No.54 培地で 5 日間培養し、培養上清と菌体に濾別した。その培養上清を各種クロマトグラフィーで処理し、最終的に HPLC でイミニマイシン A を 3.0 mg 精製した (Nakashima *et al.*, 2016a)。また、目的物質の精製過程で、イミニマイシン A の MS/MS フラグメントが類似した類縁物質 (イミニマイシン B, Nakashima *et al.*, 2016b) を 28.5 mg 得た。

イミニマイシン A の 2D-NMR 解析の結果、Fig. 1A に示すように、構造内にイミニウムイオンを有する構造であることが明らかになった。ROESY 解析より相対立体

配置は Fig. 1B のようにシクロプロパン環とアルキル鎖がアンチの関係であると決定した。また、絶対立体配置は、計算化学ソフト Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009) を用いた円二色性 (CD) スペクトルの計算値と実測値を比較することにより決定した。イミニマイシン A は、シクロプロパン環とアルキル鎖がアンチの関係であることから、(2*R*,3*S*) または (2*S*,3*R*) の 2 通りの立体構造が考えられた。そこで、Gaussian 09 によりその 2 通りの CD スペクトルを計算したところ、(2*R*,3*S*) の結果と一致し、イミニマイシン A の構造は、Fig. 1C のように絶対立体配置を決定した。イミニマイシン A は、微生物代謝産物では初の報告となる分子内にイミニウムイオンを有していた。

イミニマイシン B の 2D-NMR 解析の結果、Fig. 2A に示すように、構造内にピリジニウムイオン、*N*-アセチルシステインを有する構造であることが明らかになり、ROESY により相対立体配置はイミニマイシン A と同様にシクロプロパン環とアルキル鎖がアンチの関係であると決定した。イミニマイシン B の絶対立体配置は、Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009) により CD スペクトルを計算したところ、(2*R*,3*S*) の結果と一致した。また、2' 位の絶対立体配置は、ラネーニッケル (Mozingo *et al.*, 1943) および改良マーフィー法 (Marfey, 1984) により決定した。ラネーニッケルを用いて *N*-アセチルシステインを切断後、遊離した *N*-アセチルシステインを加水分解し、生成したアラニンを FDLA (*N*^α-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-alaninamide) で標識した。標品の L-および D-アラニンを FDLA で標識し、LC-UV/MS で解析した。イミニマイシン B 由来のアラニンは、LC/MS において MS 値および溶出時間が L 体の標品一致したため、2' 位は S 配置であると決定した。以上の結果より、イミニマイシン B の構造を Fig. 2B のように決定した。

イミニマイシン A および B の生物活性を評価した結果、イミニマイシン A は HeLa S3 細胞において IC₅₀=

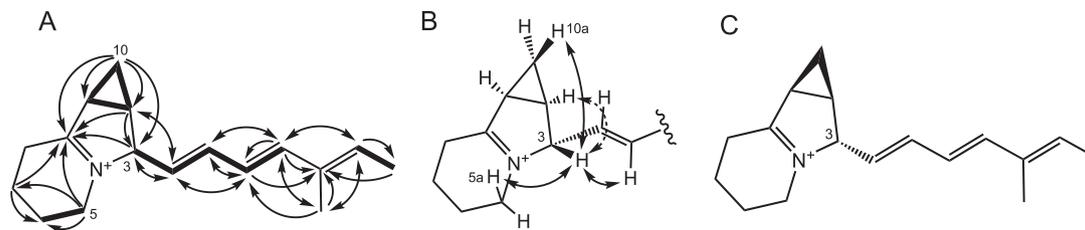


Fig. 1 Structure elucidation of iminimycin A.

A, ^1H - ^1H COSY (bold lines) and selected HMBC correlation (arrows) of iminimycin A. B, Key ROESY and NOE correlations (arrows) and coupling constants (dotted arrows) of iminimycin A. C, Relative configurations of iminimycin A.

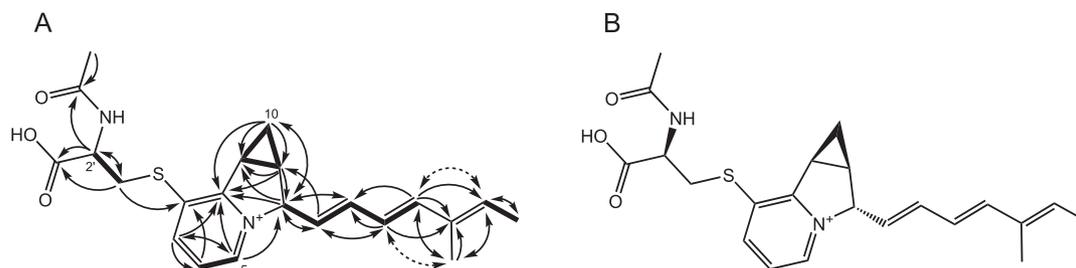


Fig. 2 Structure elucidation of iminimycin B. A, ^1H - ^1H COSY (bold lines) and selected HMBC correlation (arrows) of iminimycin B. B, Relative configurations of iminimycin B.

43.1 μM および Jurkat 細胞において $\text{IC}_{50} = 36.0 \mu\text{M}$ で細胞増殖阻害活性を示した。また, *Bacillus subtilis* KB-211 に対して 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$, *Kocuria rhizophila* KB-212, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* KB-88 に対して 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で阻止円を形成した。Iminimycin B は *X. campestris* pv. *oryzae* KB-88 に対して 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$ でわずかな抗菌活性を示した。

ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* OS-3601 株から新規物質イミニマイシン類が見出され, この結果は微生物が生産する二次代謝産物のなかに, 多くの新規物質が取り残されている可能性を示唆している。また, 同種であるゲノム解析株 *Streptomyces griseus* IFO 13350 株 (Onishi *et al.*, 2008) もイミニマイシン類を生産することがわかった。現在, 共同研究で生合成研究を進めている。

Streptomyces rosa subsp. *notoensis* OS-3966 株は, 動物用抗真菌剤として使用されているナナオマイシン A (Fig. 3A, Ōmura *et al.*, 1974) の生産菌として 1974 年から凍結乾燥で長期保存されていた。MarkerView ソフトウェアで主成分分析結果から, 同株の No. 54 培地 (小麦脱脂胚芽培地) の培養液抽出物にのみ検出された化合物に注目した。その化合物の物理化学的性状は, m/z 805.2307, UV 極大吸収 233 および 270 nm を示した。この物理化学的性状をデータベースで検索した結果, 該当する既知化合物はなく, 新規物質と推定し, 精製および構造決定した。

S. rosa subsp. *notoensis* OS-3966 株を 10L の No. 54 培地で 6 日間培養し, 培養上清と菌体に濾別した。その培養上清を各種クロマトグラフィーで処理し, 最終的に HPLC でナナオマイシン H を 4.1 mg 取得した。各種 NMR および質量分析よりナナオマイシン H の構造決定を行った。Fig. 3B に示すように COSY より 5 カ所の部分構造および HMBC 相関より平面構造を決定した。相

対立体配置は key ROESY と糖の部分はカップリングコンスタントから決定した。N-アセチルシステインの 2' 位はラネーニッケル (Mozingo *et al.*, 1943) および改良マーフィー法 (Marfey, 1984) により立体配置を決定した (Fig. 3C)。ナナオマイシン H の構造はナナオマイシンの基本骨格であるナフトキノ骨格にマイコチオールが結合した化合物であった (Nakashima *et al.*, 2017a)。ナナオマイシン H の精製の過程で, 新規類縁体ナナオマイシン F および G も見出された。ナナオマイシン F は 4a 位の水酸化化合物 (Fig. 3D), ナナオマイシン G はキノ骨格が縮環し, 5 員環になった化合物であった (Fig. 3E, Nakashima *et al.*, 2015)。さらに, ナナオマイシン H の生物活性評価を行うために, 生産培養を繰り返した。その過程で, 新規類縁体ナナオマイシン I (Fig. 3F), J (Fig. 3G, Matsuo *et al.*, 2019) および K (Fig. 3H, Matsuo *et al.*, 2020) を発見した。

ナナオマイシン新規類縁体には抗菌活性や細胞毒性は観察されなかった。キノン抗生物質であるナナオマイシン A (Fig. 3A) は, キノンの還元もしくはセミキノンジカルの生成により活性酸素を発生する (Marumo *et al.*, 1980; Hayashi *et al.*, 1982)。この活性酸素発生のためには, ナフトキノ骨格の 4a と 10a の二重結合が重要である。WST-1 を用いてスーパーオキシドラジカル (O_2^-) の産生を測定した結果, ナナオマイシン A は濃度依存的に O_2^- の産生が確認できたが, F, G, H は O_2^- の産生がほとんど認められなかった。このことから, 新規類縁体の 4a および 10a 位に水酸基もしくはカルボニル基が結合することにより, O_2^- の産生能力を失い, 抗菌活性が消失したと考えられる。

物質材料研究機構 (NIMS) の中西 淳先生との共同研究で, ナナオマイシン H に上皮間葉転換 (EMT) により間葉細胞化した細胞 (MDCK) に対して選択的に傷害を与えることがわかった。高密度培養細胞と低密度培養

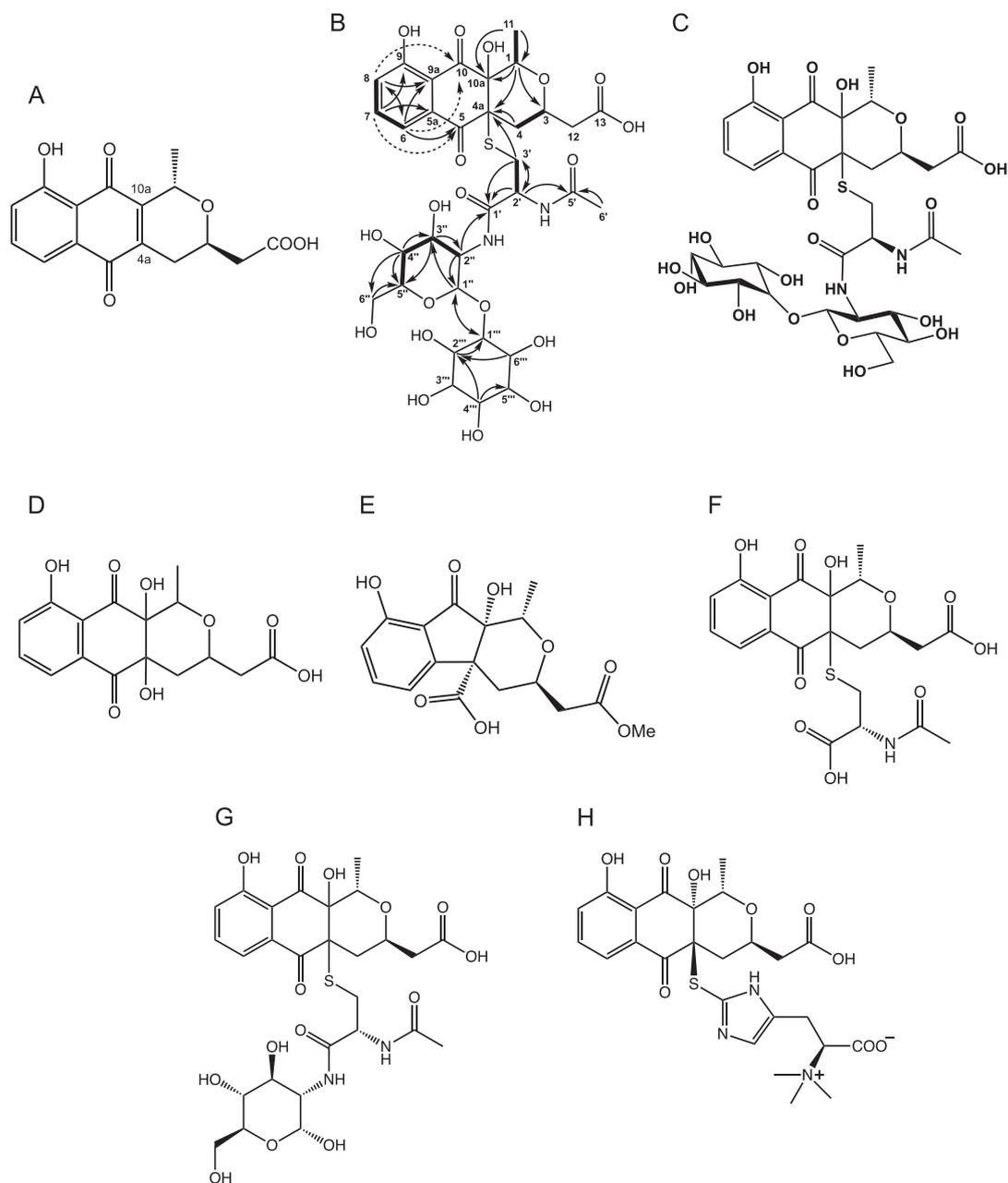


Fig. 3 Structure elucidation of nanaomycin H.

A, ^1H - ^1H COSY (bold lines) and selected HMBC correlation (arrows) of nanaomycin H. B, Relative configurations of nanaomycin H. Nanaomycin H (C), nanaomycin F (D), nanaomycin G (E), nanaomycin I (F), nanaomycin J (G), nanaomycin K (H).

細胞に TGF- β で EMT を誘導させ、ナナオマイシン H の細胞毒性効果を調べた。高密度培養細胞より低密度培養細胞に対してより高い細胞毒性が見られた (Fig. 4A)。Fig. 4B (A) は DMSO, (B) はナナオマイシン H で処理した時の顕微鏡写真である。低密度培養は高密度培養より EMT を誘導した細胞が移動しやすいため細胞毒性が見られた (Nakanishi *et al.*, 2019)。ナナオマイシン F および G には EMT 誘導細胞に対して効果は無く、ナナオマイシン I, J, K には増殖抑制効果が見られた。類縁体の中で、ナナオマイシン H および K が強力な活性を示した (Nakashima *et al.*, 2017; Nakanishi *et al.*, 2019; Matsuo *et al.*, 2020)。

EMT 関連転写因子発現と癌との関係は調べられており (Chaffer & Weinberg, 2011), EMT 関連転写因子ファミリーである Snail 1 は、癌の転移や再発との相関が高いと報告されている (Peinado *et al.*, 2007)。ナナオマイシン H および K の EMT に関連した癌に対する効果を確認するため、神戸大学の重村克巳先生との共同研究で膀胱癌に対する細胞増殖抑制効果を調べた。ヒト膀胱癌細胞株は KK-47 株 (低浸潤株) および T24 株 (高浸潤株) の 2 種類を用いた。KK-47 株および T24 株の担ガンマウスを作製し、ナナオマイシン K を腫瘍内に投与し、腫瘍の体積を経時的に測定した。その結果、コントロールと比較して腫瘍の体積は増加せず、腫瘍の増殖を抑制した (Fig. 5)。回収した腫瘍の免疫染色の結果、上皮系マーカーである E-カドヘリンが上昇し、間葉系マーカーで

ある N-カドヘリンおよびビメンチンの減少が見られた。これらの結果からナナオマイシン K は EMT が誘導された細胞に対して増殖抑制効果があると示唆された。

MarkerView™ ソフトウェアを用いた PC screening で、海洋細菌 *Mumia* sp. YSP-2-79 株からムミアマイシン (Kimura *et al.*, 2018a), *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株からピリゾマイシン (Kimura *et al.*, 2018b), *Streptomyces* sp. AM-2504 株からビラントマイシン B & C (Kimura *et al.*, 2019) などを見出し報告した。これらの新規物質の構造は Fig. 6 に記載した。

特殊環境分離糸状菌

北里生命科学研究所・微生物資源研究センターおよび微生物機能研究室では、海洋島や深海の堆積物、植物の根などの特殊な分離源から糸状菌や放線菌を分離している。海洋島および深海由来糸状菌、植物内生放線菌を探索源として PC screening を行い、海洋島由来糸状菌 *Pochonia chlamydosporia* var. *spinulospora* FKI-7537 株よりポコニオライド類, *Neocosmospora* sp. FKI-7792 株よりケトチベルシン C, 深海由来糸状菌 *Sarcopodium* sp. FKJ-0025 株よりサルコポディノール類, *Penicillium brevicompactum* FKJ-0123 株よりシプラルフェリン, *Penicillium steckii* FKJ-0213 株よりハツサミド類, *Allostreptomyces* sp. K12-0794 株よりハムラマイシン類を発見したのでここに報告する。

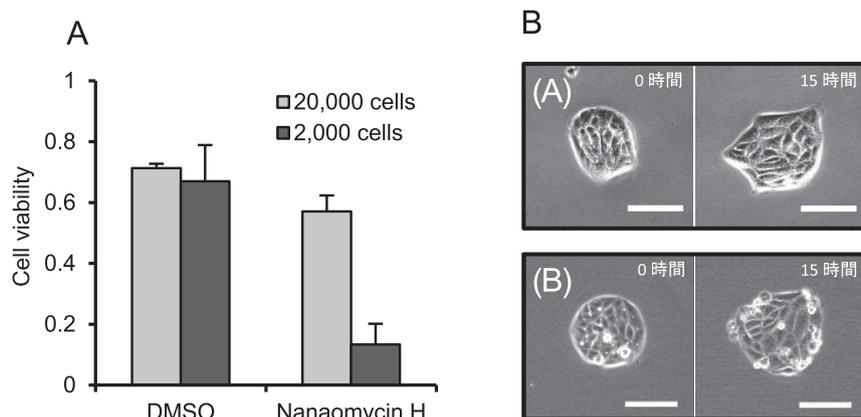


Fig. 4 Effect of nanomycin H on MDCK cells undergoing EMT by TGF- β 1 stimulation.

A, MDCK cells were treated with 10ng/mL TGF- β 1 plus 0.001 % BSA, or 0.001 % BSA alone, for 3 d. The cells were harvested by trypsin-EDTA and seeded at 2000 or 20000 cells/well density in a Falcon 96-well plate (Corning, NY, USA) and allowed to attach for 1 d. The cells were treated with 50 μ g/mL nanomycin H containing DMSO (final concentration 0.5 %) or DMSO only and incubated for 1 day. Finally, the cell viability was analyzed by MTS cell proliferation colorimetric assay kit (Funakoshi) according to the manufacturer's instructions. Data are means \pm SDs (n=3).

B, Representative images during expansion of a circular cluster in the presence of 0.5 % DMSO (A) and 50 μ g/mL nanomycin H plus 0.5 % DMSO (B). Only the cells indicated by arrow heads were dying. Scale bar: 100 μ m.

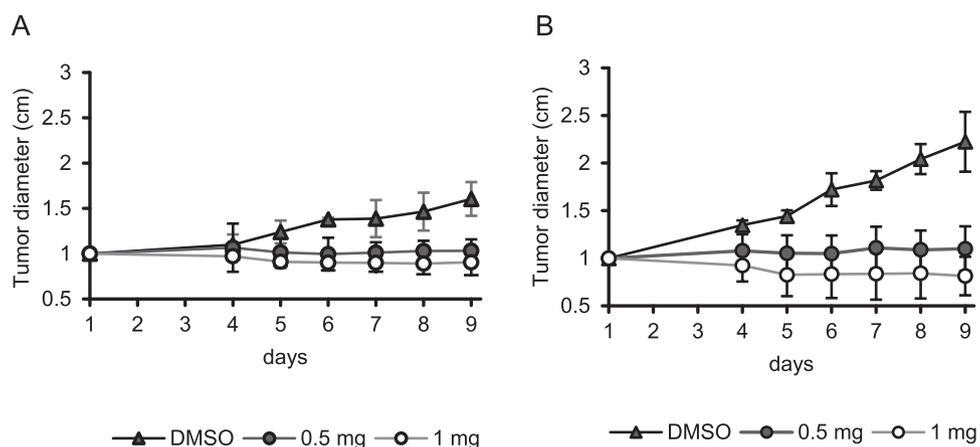


Fig. 5 Antitumor effect of nanaomycin K on KK47 (A) and T24 (B) cells *in vivo*. Two bladder cancer cells, KK47 and T24 cells (1×10^6 cells) were inoculated at day 0 in Balb/c nu/nu mice (age 6-8 weeks). Tumor volume was expressed by the following formula: (longest diameter) \times (shortest diameter)² \times 0.5. After the longest tumor diameter reached 10mm, every mice with tumor (KK47, T24) were randomly assigned to treatment groups and control groups and then administered Gelform (Pfizer) containing 0.5mg, 1mg nanaomycin K or DMSO. After inoculation, tumor diameter of mice was measured every 24 h for 9 days. Mice were sacrificed and tumors were collected at the last day of the experiment. Tumors were fixed and embedded with paraffin. All aspects of the experimental design and procedure were reviewed and approved by the institutional ethics and animal welfare committees of Kobe University. Data are means \pm SDs (n=4).

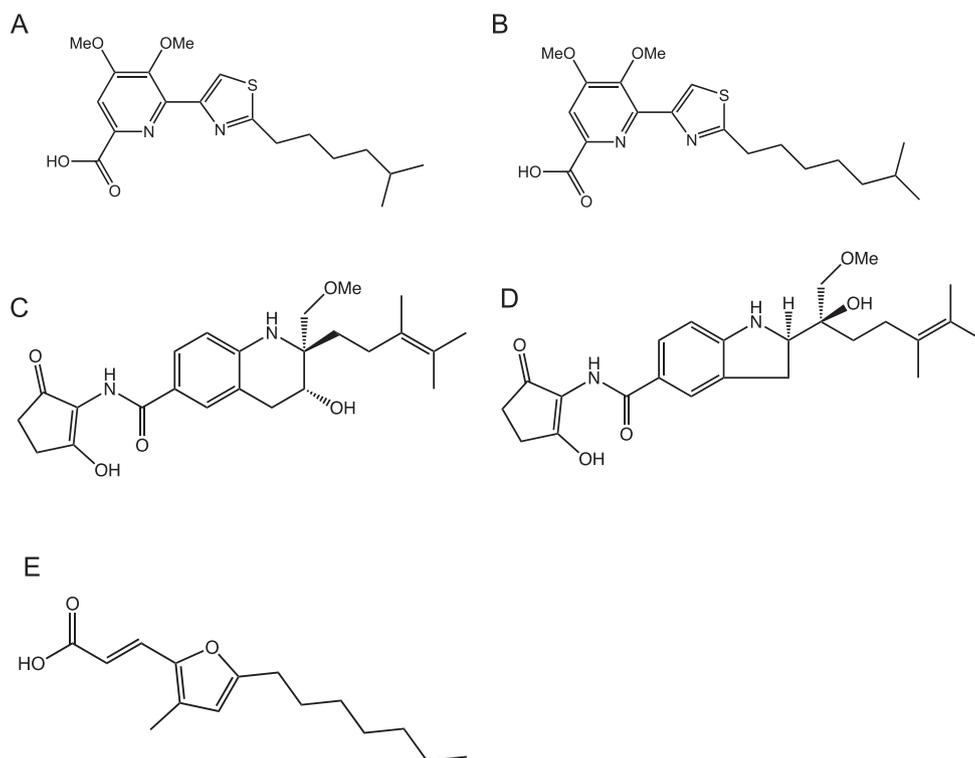


Fig. 6 Structures of (A) pyrizomicin A, (B) pyrizomicin B, (C) virantmycin B, (D) virantmycin C, and (E) mumiamicin.

ポコニオライド A および B

Pochonia chlamydosporia var. *spinulospora* FKI-7537 株は、東京都新島の土壌から単離された。本菌株が F8Q 培地で生産する FKI-7537 A および B 物質は、UV 極大吸収 274 nm, m/z 319.0461 $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{11}O_8$), FKI-7537 B 物質は UV 極大吸収 226, 277, 314, 380 nm, m/z 335.0391 $[M+H]^+$ ($C_{15}H_{11}O_9$) の物性を示し、DNP 検索の結果、これら物性と一致する既知物質はなく、新規物質と推定した。そこで、FKI-7537 株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、FKI-7537 A を 10 mg, FKI-7537 B を 46 mg 取得した。NMR 構造解析の結果、FKI-7537 A および B はクロモン骨格にムコノラクトンが結合した新規物質で、菌株名に因んでポコニオライド A および B と命名した (Fig. 7A, B)。ポコニオライド A および B は旋光度、円二色性スペクトルおよびキラルカラムによる HPLC 解析により、ラセミ体で存在することが示された。ポコニオライド B は強いヒドロキシラジカルおよび一重項酸素消去作用を有しており (Fig. 7C, D)、アミノ酸と還元糖を熱処理した際に生じる有害物質であるアクリルアミドを低減する作用も見出され、特許出願を行った (大村ら, 2017)。

ケトチベルシン C

Neocosmospora sp. FKI-7792 株は、東京都新島の土壌から単離された。本菌株が F36 培地で生産する FKI-7792A 物質は、UV 極大吸収 204, 262, 306, 318, 351, 367 nm, $[M-H]^- = 399.0842$ ($C_{18}H_{20}ClO_8$) の物性を示し、MS の同位体パターンから塩素原子を一つ有することが分かった。これらの情報を DNP 検索した結果、該当する既知物質はなく、新規物質と推定された。そこで、FKI-7792 株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、FKI-7792A を 5.2 mg 取得した。各種 NMR 解析の結果、FKI-7792A 物質はイソクマリン骨格を有するケトチベルシン類 (Wijeratne *et al.*, 2006) の新規類縁物質で、ケトチベルシン C と命名した (Fig. 8A)。本物質は 4 つの不斉炭素を有していたため、その立体構造の検討を行った。1,3-diol 構造の相対立体配置は、そのアセタール誘導体の $CDCl_3$ 中における 1H -NMR ケミカルシフトから経験的に決定できることが知られている (Rychnovsky *et al.*, 1993)。そこで、ケトチベルシン C の 2 つのジオールをアセタール化して bis-acetal 体とし、 1H -NMR を測定した結果、3',5'-diol は *syn*, 6',8'-diol は *anti* の関係にあることが分かった (Fig. 8B)。次に、3' 位および 8' 位の MTPA ester 体を調製し、それぞれの絶

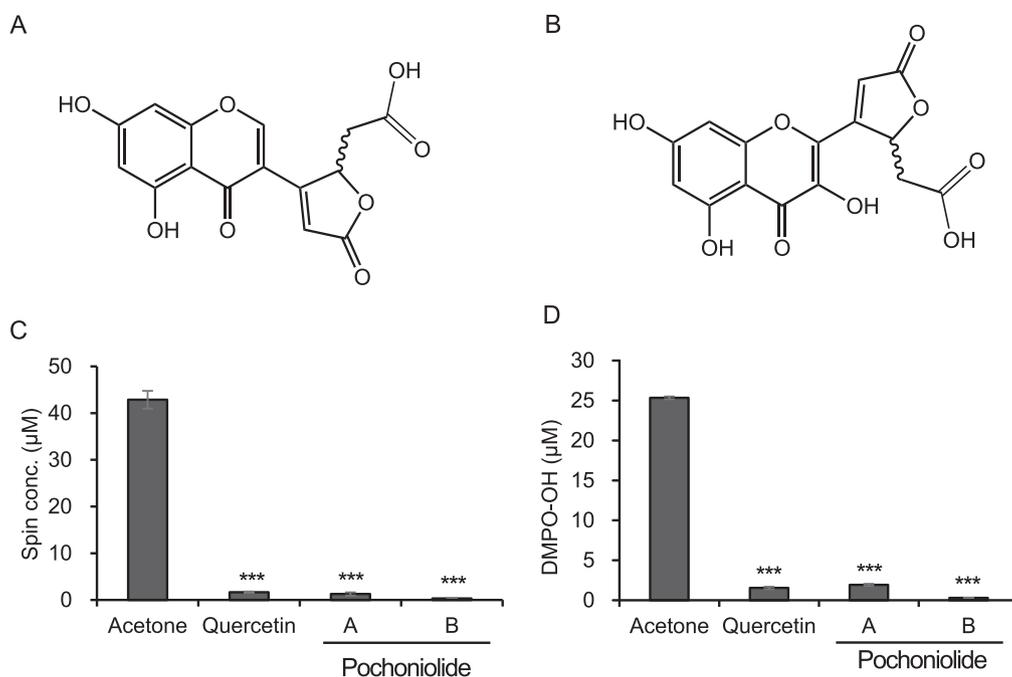


Fig. 7 Structures and biological activity of pochoniolide A (A) and B (B). Eliminating performance of $\cdot OH$ and 1O_2 by pochoniolides A and B. (C) $\cdot OH$ with DMPO-OH values and (D) 1O_2 with spin concentration values measured by ESR spectrum. Quercetin used as positive control. Mean \pm SD (n=3), *** $p < 0.001$ vs. control (t-test).

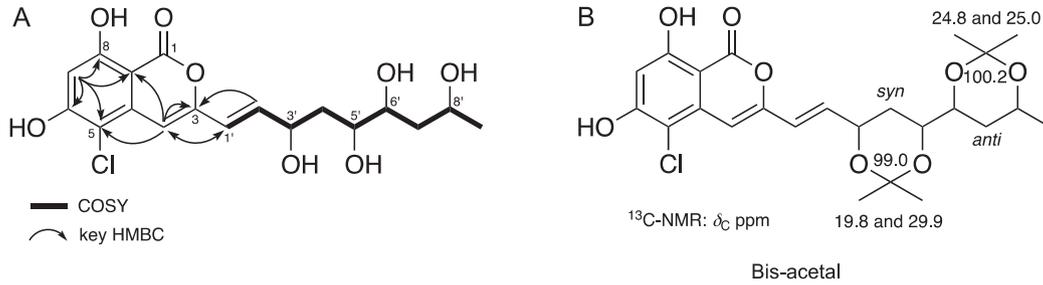


Fig. 8 (A) 1D, 2D-NMR correlations for chaetochiversin C, (B) ^{13}C -NMR chemical shifts of bis-acetal analog for chaetochiversin C in CDCl_3 .

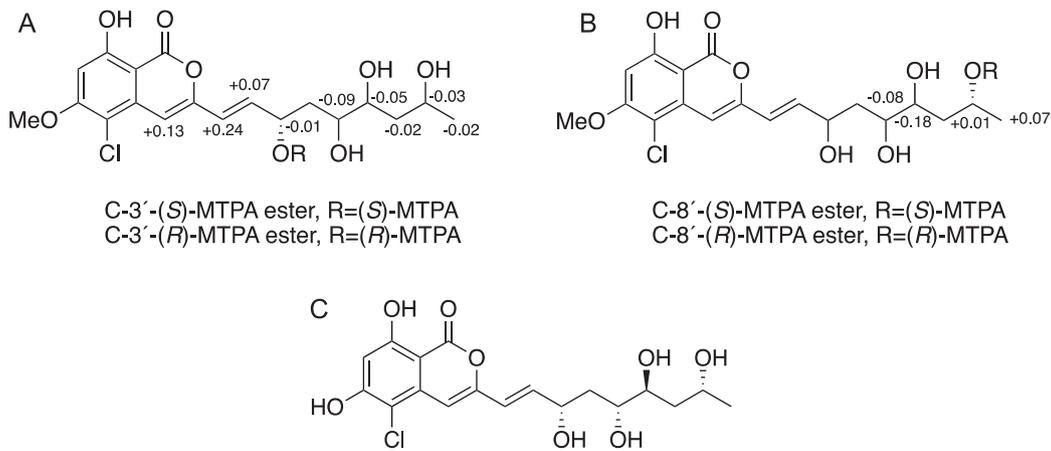


Fig. 9 The $\Delta\delta$ values [$\Delta\delta$ in parts per million = $\delta_S - \delta_R$] obtained for (S)- and (R)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl) (MTPA) esters.

対立体配置を決定した。フェノール性水酸基の保護をするため、ケトチベルシンCをTMS-diazomethaneでメチル化後、(S)-MTPA-OHおよび(R)-MTPA-OHと反応させた。反応物をかきとりTLCで精製し、C-3'-(S)-MTPA esterおよびC-3'-(R)-MTPA esterから、C-3'位の絶対立体配置はSであることが明らかになった (Fig. 9A)。また、C-8'-(S)-MTPA esterおよびC-8'-(R)-MTPA esterは他のMTPA esterとの混合物で得られたため、それぞれの混合物の ^1H - ^1H COSYを測定し、C-8'-(S)-MTPA esterおよびC-8'-(R)-MTPA esterの鍵となる ^1H -NMRを詳細に同定した。その結果、Fig. 9Bに示した通り、C-8'位の絶対立体配置はRであることが明らかになった。上記の相対立体配置の結果を踏まえ、ケトチベルシンCの絶対立体配置を3'S, 5'R, 6'Sおよび8'Rと決定した (Fig. 9C)。

ケトチベルシンCの抗菌活性、細胞毒性、抗マラリア活性、抗酸化活性を評価した結果、一重項酸素($^1\text{O}_2$)

の消去活性を見出した。コントロール(アセトン)を $^1\text{O}_2$ 発生率100%としたとき、ケトチベルシンCを2.5mMで処理した群では55%まで発生率を抑制した (Fig. 10)。

サルコポディノールAおよびB

Sarcopodium sp. FKJ-0025株は、鹿児島県若尊カルデラ深海200mの堆積物から単離された。本菌株がF38培地で生産する2つの物質FKJ-0025AおよびB物質はそれぞれ、 $m/z = 297.1702$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ および 281.1747 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ に擬分子イオンピークを有し、分子式は $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5$ および $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ と推定された。また、220および290nm付近にUV極大吸収を有し、これらのデータをDNPで検索した結果、該当する既知物質はなく、新規物質と推定された。そこで、F38培地でFKJ-0025株を培養後、各種カラムクロマトグラフィーで精製した結果、最終的にサルコポディノールAを2.5mg、サルコポディノールBを1.5mg得た。それぞれの物質をNMRおよびLC/MS

質量分析による新規物質の探索

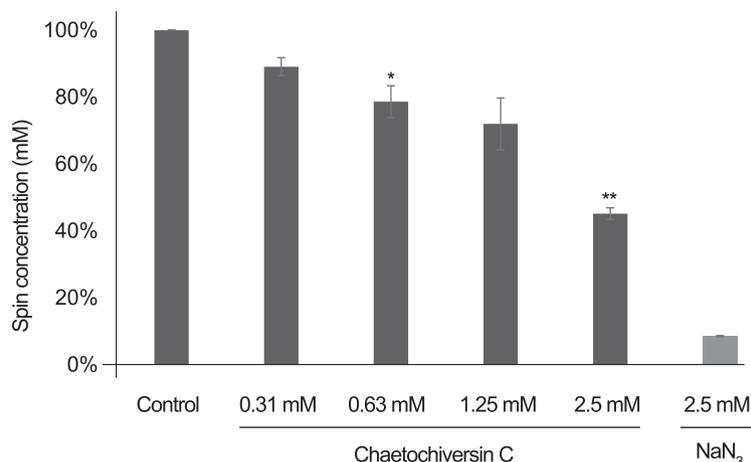


Fig. 10 Quenching effect of Chaetochiversin C on singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). The $^1\text{O}_2$ spin concentration values were measured by electron spin resonance (ESR). NaN_3 was used as a positive control at 2.5mM. Error bars indicate the standard deviations of measurements (n=3) and asterisks indicate significant differences from the control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Student's t -test).

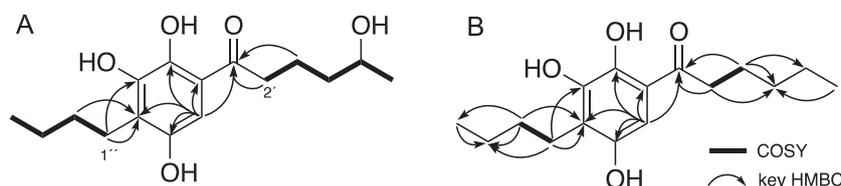


Fig. 11 Selected 2D-NMR correlations for sarcopodinol A and B.

を用いて構造解析した結果, Fig. 11A および B に示すようなヒドロキシキノールを基本骨格とする構造であることが明らかになった. これらの新規物質は *Sarcopodium* 属糸状菌が生産するアルコールであることから, サルコポディノール A およびサルコポディノール B と命名した.

サルコポディノール A は, 5' 位に 2 級水酸基が結合する不斉炭素を有することから, 改良モッシャー法を用いてその絶対立体配置を決定した. フェノール性水酸基の保護をするため, サルコポディノール A を TMS-diazomethane でメチル化後, (R)-MTPA-Cl および (S)-MTPA-Cl と反応させ, (S)-MTPA エステル体および (R)-MTPA エステル体を得た. 両 MTPA エステル体の $^1\text{H-NMR}$ の差から, サルコポディノール A の 5' 位の絶対立体配置は S であることが明らかとなった (Fig. 12).

サルコポディノール A およびサルコポディノール B の抗菌活性および細胞毒性を評価した結果, サルコポディノール A は Jurkat 細胞に対して $\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{g/mL}$ で, サルコポディノール B は HL-60, Jurkat および PANK-1 細胞に対してそれぞれ $\text{IC}_{50} = 37 \mu\text{g/mL}$, $\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{g/mL}$

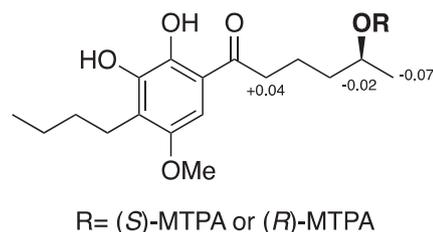


Fig. 12 $\Delta\delta$ values [$\Delta\delta$ in ppm = $\delta_S - \delta_R$] obtained for (S)- and (R)-MTPA esters.

および $\text{IC}_{50} = 66 \mu\text{g/mL}$ で細胞毒性を示した.

これまでに, *Sarcopodium* 属からの二次代謝産物の報告はなく, 本物質が初の知見となった. サルコポディノール B は Jurkat 細胞のみに細胞毒性を示したのに対し, サルコポディノール A は HL-60, Jurkat および PANK-1 細胞に対して弱い細胞毒性を示し, この活性の差は, 5' 位の水酸基の有無に起因すると考えられた. 今後, サルコポディノール A および B のさらなる有用な生物活性の発見に期待したい.

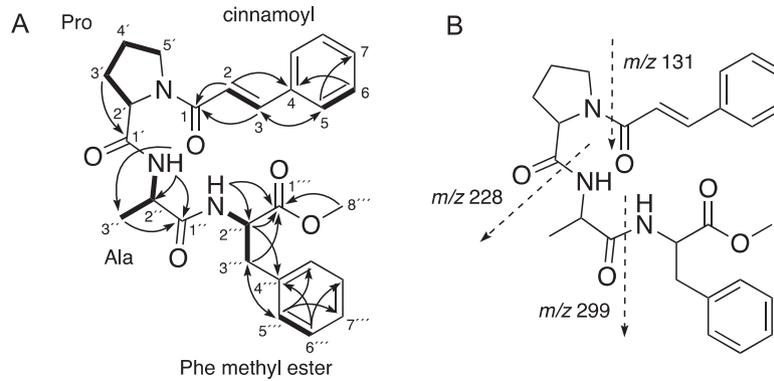


Fig. 13 (A) Selected 2D-NMR correlations of ciproalphelin, (B) MS/MS fragmentations of ciproalphelin.

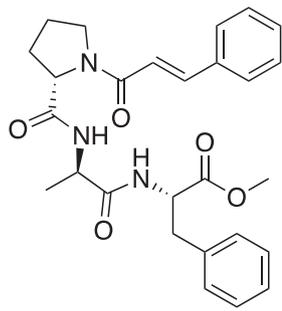


Fig. 14 Absolute structure of ciproalphelin.

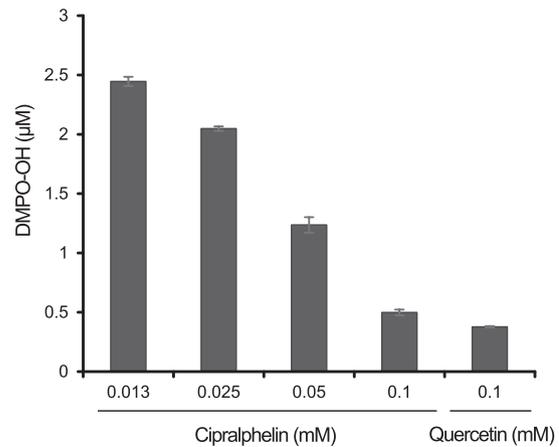


Fig. 15 Scavenging activity of ciproalphelin against hydroxy radical.

シプラルフェリン

Penicillium brevicompactum FKJ-0123 株は、沖縄県琉球海溝の深海 283m の堆積物から単離された。本菌株が F36 培地で生産する FKJ-0123A 物質は、UV 極大吸収 205, 283nm, $m/z = 478.2331$ $[M+H]^+$ ($C_{25}H_{32}N_3O_5$) の物性を示し、DNP 検索の結果、これら物性と一致する既知物質はなく、新規物質と推定された。そこで、FKJ-0123 株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、FKJ-0123A を 10.1mg 取得した。NMR および MS/MS フラグメント解析の結果 (Fig. 13A, B), FKJ-0123A 物質はケイヒ酸、プロリン (Pro), アラニン (Ala), フェニルアラニンメチルエステル (Phe methyl ester) の順にアミド結合した新規物質で、それらの頭文字に因んでシプラルフェリンと命名した。各アミノ酸の立体は、改良マーフィー法を用いて検討した。シプラルフェリン 1.0mg を 6M HCl で加水分解後、D-FDLA で修飾した。また、D,L-プロリン、D,L-アラニン、D,L-フェニルアラニンの標品も同様に D-FDLA 修飾し、LC/MS でそれぞれ分析した。その結果、シプラルフェリン由来のプロリン、アラニン、フェニルアラニンはそれぞれ、D-プロリン、L-アラニン、L-フェニルアラニンであるこ

とが明らかとなった。したがって、シプラルフェリンの絶対構造を Fig. 14 のように決定した。

シプラルフェリンの抗菌活性、細胞毒性、抗マラリア活性、抗酸化活性を評価した結果、ヒドロキシラジカル消去活性を見出した。コントロールでは、ヒドロキシラジカルの発生を DMPO-OH で換算したとき、 $2.5\mu\text{M}$ の発生量であった。一方、シプラルフェリンを 0.1mM で処理した群では約 $0.5\mu\text{M}$ まで発生量を抑制し、その作用はポジティブコントロールのケルセチンと同等であった (Fig. 15)。

ケイヒ酸誘導体は一般的に、植物に多く含まれている物質である。その誘導体の多くは抗酸化作用が報告されており (Chen & Ho, 1997), シプラルフェリンもヒドロキシラジカル消去活性を示すことが予想され、実際、ポジティブコントロールに匹敵する活性を認めた。また、ケイヒ酸とプロリンが直接結合した物質はこれまで糸状菌から取得された例はなく、本物質が初の報告となった (DNP 調べ)。

ハツサミドAおよびB

Penicillium steckii FKJ-0213 株は、静岡県初島沖の深海1,171mの堆積物から単離された。本菌株がF8培地で生産するFKJ-0213A物質は、UV極大吸収206, 270, 332nm, $m/z=703.3221$ $[M+H]^+$ ($C_{39}H_{46}N_2O_{10}$), FKJ-0213B物質はUV極大吸収206, 229 (sh), 252 (sh), 326nm, $m/z=449.1560$ $[M+H]^+$ ($C_{21}H_{24}N_2O_9$)を示し、DNP検索の結果、これら物性と一致する既知物質はなく、新規物質と推定された。そこで、FKJ-0213株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、FKJ-0213Aを10.1mg, FKJ-0213Bを28.3mg取得した。NMR構造解析および加水分解などの検討により、FKJ-0213Aはタンザワ酸BおよびトリコデルマミドCがエステル結合した新規物質 (Fig.16A), FKJ-0213Bはアスペルギラジン類の新規類縁体 (Fig.16B)であること

が明らかとなった。生産菌の採取地にちなみ、ハツサミドAおよびBと命名した。また、これら新規物質取得の過程で、既知物質であるタンザワ酸BおよびトリコデルマミドCも取得した (Fig.16C, D)。タンザワ酸Bは相対立体配置が、トリコデルマミドCは絶対立体配置がそれぞれ報告されている (Ando *et al.*, 1993, Davis *et al.*, 2008)。そこで、タンザワ酸Bの絶対立体配置を決定することで、ハツサミドAの絶対立体配置を決定することとした。天然由来のタンザワ酸Bをメタノール中で結晶化後、X線結晶構造解析を行い、絶対立体配置を決定した。次に、ハツサミドA 10.3mgを2M NaOH中、2時間室温で加水分解した。10% H_2SO_4 で中和し、減圧留去後、かきとりTLCで粗精製した。最終的に分取HPLCで精製した結果、ハツサミドA由来のタンザワ酸BおよびトリコデルマミドCをそれぞれ

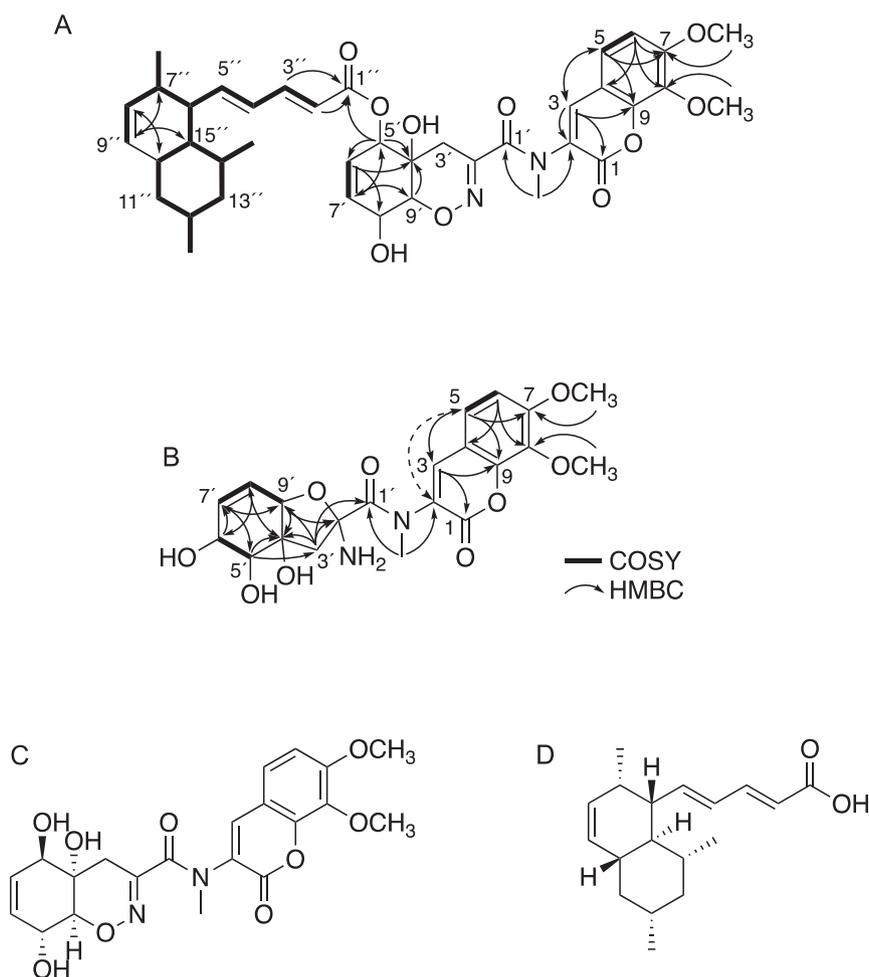


Fig. 16 Selected 2D-NMR correlations of (A) hatsusamide A and (B) hatsusamide B. Structures of known compounds, (C) trichoderamide C and (D) tanzawaic acid B.

0.6mg, 0.5mg 得た. これら物質と, 天然由来のタンザワ酸BおよびトリコデルマミドCの比旋光度を比較した結果, 良い一致を示したため, ハツサミドAの絶対立体配置を4'S, 5'R, 8'R, 9'S, 6''R, 7''R, 10''S, 12''R, 14''S, 15''Rと決定した (Fig.17A). 次いで, ハツサミドBの相対立体配置を結合定数, ROESY 相関およびその推定生合成経路により決定した. H-6' と H-3' の ROESY 相関によりこれらはβ配置, H-5' と H-6' の結合定数が8.0Hzより, H-5' はα配置と決定した. また, ハツサミドBは, アスペルギラジン類 (Capon *et al.*,

2005) やペニシラジン類 (Lin *et al.*, 2000) と同様の生合成経路で生産されていると予想されるため, 最終的に Fig.17B に示すような相対立体配置と決定した.

ハツサミドA, ハツサミドB, タンザワ酸BおよびトリコデルマミドCの抗菌活性, 細胞毒性, 抗マラリア活性を評価した結果を Table 3 および Table 4 に示した. 細胞毒性試験では, ハツサミドAのみ HeLa S3, HT29, A549, H1299, PANC-1 細胞に対して, それぞれ IC₅₀ 15.0, 6.8, 13.7, 18.8, 12.9 μM で細胞毒性を示した. また, 抗マラリア活性では, ハツサミドAは K1 および

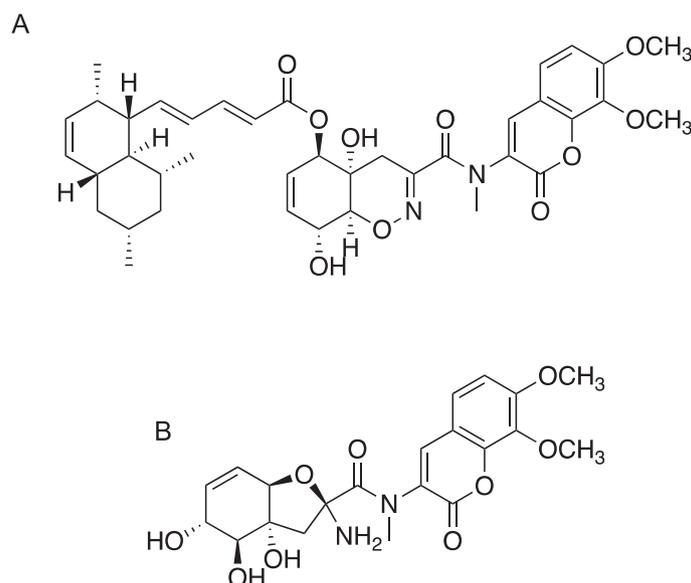


Fig. 17 (A) Absolute configuration of hatsusamide A, (B) Relative configuration of hatsusamide B.

Table 3 Cytotoxic activity of the compounds against five human tumor cell lines

Compounds	IC ₅₀ (μM) values against five human tumor cell lines				
	HeLa S3	HT29	A549	H1299	Panc1
Hatsusamide A	15.0	6.8	13.7	18.7	12.9
Hatsusamide B	>100	>100	>100	>100	>100
Tanzawaic acid B	>100	>100	>100	>100	>100
Trichodermamide C	>100	>100	>100	>100	>100

Table 4 Anti-malarial activity of the compounds against K1 and FCR3 strains

Compounds	IC ₅₀ (μM) values against two strains	
	K1	FCR3
Hatsusamide A	27.2	27.9
Hatsusamide B	>50	>50
Tanzawaic acid B	78.5	79.2
Trichodermamide C	>50	>50

FCR3株においてそれぞれIC₅₀ 27.2および27.9μMで活性を示し、タンザワ酸BはK1およびFCR3株においてそれぞれIC₅₀ 78.5および79.2μMで活性を示した。これらの結果から、タンザワ酸BあるいはトリコデルマミドC単体よりも、それらがエステル結合したハツサミドAの方が強い活性を示すことが明らかになった。これらの結果は、活性のない既知物質同士が結合すれば、新たな有用物質へと変換することができる可能性を示唆するものであった。

ハムラマイシンAおよびB

Allostreptomyces sp. K12-0794株は、東京都羽村市のシダ植物の根から単離された。本菌株がNo.54培地で生

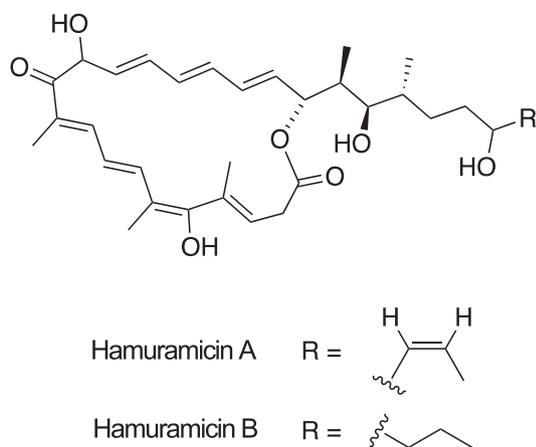


Fig. 18 Structures of hamuramicin A and B.

産する K12-0794A および B 物質は、UV 極大吸収 265, 275, 330 nm, $m/z = 605.3450$ $[M+Na]^+$ ($C_{35}H_{50}O_7$), K12-0794B 物質は UV 極大吸収 265, 275, 330 nm, $m/z = 5833620$ $[M-H]^-$ ($C_{35}H_{52}O_7$) を示し、DNP 検索の結果、これら物性と一致する既知物質はなく、新規物質と推定された。そこで、K12-0794 株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、K12-0794A を 329.3 mg, K12-0794B を 397.9 mg 取得した。NMR 構造解析の結果、K12-0794A および B は、アルキル側鎖を有する新規 22 員環マクロライドであることが明らかとなった (Fig. 18)。生産菌の採取地にちなみ、ハムラマイシン A および B と命名した (Suga *et al.*, 2018)。

ハムラマイシン A および B の抗菌活性およびヒト細胞に対する細胞毒性の結果を Table 5 および 6 にそれぞれ示した。ハムラマイシン A および B は、*Kocuria rhizophia* および *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* に対して抗菌活性を示し、試験した細胞種全てにおいて細胞毒性を示した。*Allostreptomyces* 属由来の二次代謝産物の報告はこれまでになく、ハムラマイシン A および B が初の報告となった。

このように、特殊な環境から分離された微生物を用いた PC screening により、非常にユニークな構造を有する二次代謝産物を得ることができた。いずれの物質も様々な生物活性が見出され、今後の有用性を期待させる結果であった。深海や植物内など、特殊環境から分離される微生物は、新属や新種の微生物も多数分離されている。今後、そのような菌からの新規物質の発見が期待される。

Table 5 The MIC values against eight bacteria

Strain	MIC values (μg/mL)	
	Hamuramicin A	Hamuramicin B
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	>256	>256
<i>Kocuria rhizophia</i> ATCC9341	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	>256	>256
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>256	>256
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KB88	4	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	>256	>256
<i>Proteus vulgaris</i> NBRC3167	>256	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC12582	>256	>256

Table 6 Cytotoxic activity against five human tumor cell lines

Compounds	IC ₅₀ (μM) values against five human tumor cell lines				
	HeLa S3	HT29	A549	H1299	PANC-1
Hamuramicin A	1.1	5.0	2.3	8.8	5.0
Hamuramicin B	1.3	5.9	1.4	17.8	4.5

要 約

微生物はこれまでに、人知の及ばない構造を有する化合物を提供してきた。それらは長い生存競争の過程における生命活動に伴い作り出された化合物であるため、強力な生物活性を示すものが多い。化学構造の多様性は、生物活性の多様性と深く関わっており、新しい構造を有する化合物(新規化合物)の取得は、創薬研究において重要な課題である。これまでに見出されてきた生物活性物質の多くは、その活性を指標に探索されてきたため、目的の生物活性と偶然に一致した場合のみ、化合物が取得されてきた。すなわち、目的以外の物質は、新規化合物であったとしても見逃されている可能性が高いと考えられる。近年の画期的な分析機器の発展は、多くの化合物の検出を可能にし、微生物の化合物生産能を最大限に引き出すことを可能にした。PC screening は、化合物の物理化学的性状を指標とするため、生物活性を指標とするスクリーニングと比較してより多くの化合物が対象となり、新規物質の発見に特化した方法である。本研究では、放線菌および糸状菌から生物活性を有する新規物質を見出すことに成功し、PC screening の有効性を明確にした。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 宮野 怜, 松尾洋孝, 木村 徹, 浅見行弘, 岩月正人, 佐藤 倫子, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2015. 放線菌 *Streptomyces griseus* OS-3601 株が生産する新規物質について. 第30回日本放線菌学会大会 9月7-8日. 富山
- 2) 宮野 怜, 松尾洋孝, 木村 徹, 浅見行弘, 岩月正人, 佐藤 倫子, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2017. Physicochemical Screeningによる新規物質の探索-放線菌 *Streptomyces griseus* OS-3601株が生産する新規物質-, 第28回北里大学バイオサイエンスフォーラム 8月6-7日. 相模原
- 3) 木村 徹, 稲橋佑起, 高田拓和, 岩月正人, 塩見和朗, 高橋 洋子, 大村 智. 2017. 希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216株が生産する pyrizomicin の生合成研究. 日本農芸化学会2017年度大会 3月17-20日. 京都
- 4) 宮野 怜, 松尾洋孝, 野中健一, 庭野吉己, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2017. 糸状菌 *Pochonia* sp. FKI-7537 株培養液抽出物から得られた新規化合物 pochoniolide A および B について. 日本農芸化学会2017年度大会 3月17-20日. 京都
- 5) 松尾洋孝, 野中健一, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2017. 糸状菌を探索源とした physicochemical screening による新規物質の探索. 日本農芸化学会2017年度大会 3月17-20日. 京都
- 6) Kimura, T., Inahashi, Y., Matsumoto, A., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ômura, S. & Nakashima, T. 2017. Sagamilactam, Mumiamicin and Pyrizomicin, new compounds from rare actinomycetes, discovered by Physicochemical screening. 18th International Symposium

- on the Biology of Actinomycetes, 23-27 May. Cheju, Korea
- 7) Nakashima T., Miyano R., Iwatsuki M., Shirahata T., Petersson GA., Takahashi Y. & Ômura S. New iminium and pyridinium metabolites, iminimycin A and B, produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 23-27 May. Cheju, Korea
 - 8) Inahashi Y., Kimura T., Shiomi K., Takahashi Y., Ômura S. & Nakashima T. Biosynthesis of pyrizomicin in *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 23-27 May. Cheju, Korea
 - 9) 宮野 怜, 松尾洋孝, 野中健一, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2018. Physicochemical screeningによる糸状菌由来新規アルカロイドの探索-アルカロイド生産培地の検討と見出された化合物について-. 日本農芸化学会2018年度大会 3月17-20日. 名古屋
 - 10) 松尾洋孝, 目代貴之, 野中健一, 長野由梨子, 矢吹彬憲, 藤倉克則, 庭野吉己, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2018. 深海由来糸状菌 *Penicillium* sp. FJK-0123株が生産する新規シナモイルトリペプチドについて. 日本農芸化学会2019年度大会 3月24-27日. 名古屋

原著論文

- 1) Nakashima, T., Boonsongcheep, P., Kimura, T., Iwatsuki, M., Sato, N., Nonaka, K., Prathanturug, S., Takahashi, Y. & Ômura, S. 2015. New compounds, nanaomycin F and G, Discovered by Physicochemical Screening from a culture broth of *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966. J. Biosci. Bioeng. **120**: 596-600.
- 2) Nakashima, T., Miyano, R., Iwatsuki, M., Shirahata, T., Kimura, T., Asami, Y., Kobayashi, Y., Shiomi, K., Petersson, G. A., Takahashi, Y. & Ômura, S. 2016. Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. J. Antibiot. **69**: 611-615.
- 3) Nakashima, T., Miyano, R., Matsuo, H., Iwatsuki, M., Shirahata, T., Kobayashi, Y., Shiomi, K., Peretsson G. A., Takahashi, Y. & Ômura, S. 2016. Absolute configuration of iminimycin B, a new indolizidine alkaloid, from *Streptomyces griseus* OS-3601. Tetrahedron Lett. **30**: 3284-3286.
- 4) Nakashima, T., Kimura, T., Miyano, R., Matsuo, H., Hirose, T., Kimishima, A., Nonaka, K., Iwatsuki, M., Nakanishi, J., Takahashi, Y. & Ômura, S. 2017. Nanaomycin H: A new nanaomycin analog. J. Biosci. Bioeng. **123**: 765-770.
- 5) Kimura, T., Tajima, A., Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Kasai, H., Mokudai, T., Niwano, Y., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ômura, S. & Nakashima, T. 2018a. Mumiamicin: structure and bioactivity of a new fatty acid from *Mumia* sp. YSP-2-79. J. Gen. Appl. Microbiol. **64**: 62-67.
- 6) Kimura, T., Inahashi, Y., Matsuo, H., Suga, T., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ômura, S. & Nakashima, T. 2018b. Pyrizomicin A and B: Structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. J. Antibiot. **71**: 606-608.
- 7) Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Nonaka, K., Take, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ômura, S. & Nakashima, T. 2018. Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allotrestreptomyces* sp. K12-0794. J. Antibiot. **71**: 619-625.
- 8) Matsuo, H., Nonaka, K., Nagano, Y., Yabuki, A., Fujikura, K.,

- Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. New metabolites, sarcopodinols A and B, isolated from deep-sea derived fungal strain *Sarcopodium* sp. FKJ-0025. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**: 1323–1326.
- 9) Miyano, R., Matsuo, H., Nonaka, K., Mokudai, T., Niwano, Y., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. Pochoniolides A and B, new antioxidants from the fungal strain *Pochonia chlamydosporia* var. *spinulospora* FKI-7537. *J. Biosci. Bioeng.* **126**: 661–666.
- 10) Kimura, T., Inahashi, Y., Matsuo, H., Suga, T., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. Pyrizomicin A and B: Structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **71**: 606–608.
- 11) Kimura, T., Suga, T., Inahashi, Y., Matsuo, H., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. New tetrahydroquinoline and indoline compounds containing a hydroxy cyclopentenone, virantmycin B and C, produced by *Streptomyces* sp. AM-2504. *J. Antibiot.* **71**: 169–173.
- 12) Matsuo, H., Noguchi, Y., Také, A., Nakanishi, J., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. Nanaomycin I and J: new nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from “*Streptomyces rosa* subsp. *notensis* OS-3966”. *J. Biosci. Bioeng.* **127**: 549–553.
- 13) Matsuo, H., Mokudai, T., Higo, M., Nonaka, K., Nagano, Y., Nagahama, T., Niwano, Y., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. Cipralphelin, a new anti-oxidative *N*-cinnamoyl tripeptide produced by the deep-sea derived fungal strain *Penicillium brevicompactum* FKI-0123. *J. Antibiot.* **72**: 775–778.
- 14) Matsuo, H., Nakanishi, J., Noguchi, Y., Kitagawa, K., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Nanaomycin K, a new epithelial-mesenchymal transition inhibitor produced by the actinomycete “*Streptomyces rosa* subsp. *notensis* OS-3966”. *J. Biosci. Bioeng.* **129**: 291–295.
- 15) Matsuo, H., Hirose, T., Mokudai, T., Nonaka, K., Niwano, Y., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Absolute structure and anti-oxidative activity of chaetochiversin C isolated from fungal strain *Neocosmospora* sp. FKI-7792. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (in press)
- その他 (特許)
- 1) 大村智, 高橋洋子, 中島琢自, 松本厚子, 中西淳, 松尾洋孝. 2016. 新規ナナオマイシンH化合物及びその誘導体, 並びに, それらを有効成分として含有する上皮間葉転換が誘導された細胞に傷害を与える薬剤. 特願2016-186970.
- 2) 大村智, 高橋洋子, 中島琢自, 松尾洋孝, 野中健一, 坂戸久子. 2017. 新規ボコニオライド化合物及びその使用. 特願2017-050861.
- す. NMRおよびMSを測定してくださいました北里大学薬学部の佐藤倫子氏, 長井賢一郎博士に深く感謝致します. また, 本研究は当寄付講座に在籍した学生, 北里生命研大村創薬グループの皆さんのご協力があったからこそ成し遂げられたもので, ここに感謝致します.

文 献

- Ando, K., Azuma, T., Matsuda, Y., Morishita, Y. & Saito, Y. 1993. Japan patent JPH07179391A.
- 浅井禎吾, 大島吉輝 2016. エピジェネティック制御を利用する新規医薬資源の開拓. *生化学* **88**: 643–648.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E. *et al.* 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 361–367.
- Capon, R. J., Ratnayake, R., Stewart, M., Lacey, E., Tennant, S. & Gill, J. H. 2005. Aspergillazines A–E: novel heterocyclic dipeptides from an Australian strain of *Aspergillus unilateralis*. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 123–129.
- Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**: 1559–1564.
- Chen, J. H. & Ho, C. T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2374–2378.
- Crits-Christoph, A., Diamond, S., Butterfield, C.N., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. 2018. Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. *Nature* **558**: 440–444.
- Davis, R. A., Longden, J., Avery, V. M. & Healy, P. C. 2008. The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichoderamide C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 2836–2839.
- Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinium*. *J. Antibiot.* **29**: 1346–1348.
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**: 226–236.
- Frisch, M. J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B. *et al.* 2009. Gaussian 09, Revision D.01 (Gaussian, Wallingford, CT).
- Hayashi, M., Unemoto, T., Minami-Kakinuma, S., Tanaka, H., & Ōmura, S. 1982. The mode of action of nanaomycins D and A on a gram-negative marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Antibiot.* **35**: 1078–1085.
- 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.
- Kimura, T., Inahashi, Y., Matsuo, H., Suga, T., Iwatsuki, M., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima T. 2018a. Pyrizomicin A and B: structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **71**: 606–608.
- Kimura, T., Tajima, A., Inahashi, Y., *et al.*, 2018b. Mumiamicin: Structure and bioactivity of a new furan fatty acid from *Mumia* sp. YSP-2-79. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **64**: 62–67.

謝 辞

本研究は, 公益財団法人発酵研究所 (IFO) の寄付助成により支援されたもので, この場を借りて感謝致します

- Kimura, T., Suga, T., Kameoka, M., *et al.*, 2019. New tetrahydroquinoline and indoline compounds containing a hydroxy cyclopentenone, virantmycin B and C, produced by *Streptomyces* sp. AM-2504. *J. Antibiot.* **72**: 169-173.
- Lin, Y., Shao, Z., Jiang, G., Zhou, S., Cai, J., Vrijmoed, L. L. P. & Jones, E. B. G. 2000. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4*H*-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (Strain #386) from the south china sea. *Tetrahedron* **56**: 9607-9609.
- Marfey, P. 1984. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro 2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 591-596.
- Marumo, H., Kitaura, K., Morimoto, M., Tanaka, H. & Ōmura, S. 1980. The mode of action of nanaomycin A in Gram-positive bacteria. *J. Antibiot.*, **33**: 885-890.
- Matsumoto, A. & Takahashi, Y. 2017. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J. Antibiot.* **70**: 514-519.
- Matsuo, H., Noguchi, Y., Také, A., Nakanishi, J., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. Nanaomycin I and J: New nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from "*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **127**: 549-553.
- Matsuo, H., Nakanishi, J., Noguchi, Y., Kitagawa, K., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Nanaomycin K, a new epithelial-mesenchymal transition inhibitor produced by the actinomycete "*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **129**: 291-295.
- Mozingo, R., Wolf, D.E., Harris, S.A. & Folkers, K. 1943. Hydrogenolysis of sulfur compounds by Raney nickel catalyst, *J. Am. Chem. Soc.* **65**: 1013-1016.
- 増間 啓郎, 野中 健一 2013. 生物活性物質探索資源としての菌類研究. *日本菌学会会報* **54**: 1-14
- Nakanishi, J., Sugiyama, K., Matsuo, H., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2019. An application of photoactivatable substrate for the evaluation of epithelial-mesenchymal transition inhibitors. *Anal. Sci.* **5**: 65-69.
- Nakashima, T., Boonsongcheep, P., Kimura, T., Iwatsuki, M., Sato, N., Nonaka, K., Prathanturug, S., Takahashi, Y. & Ōmura S. 2015. New compounds, nanaomycin F and G, discovered by physicochemical screening from a culture broth of *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.* **120**: 596-600.
- Nakashima, T., Kimura, T., Miyano, R., *et al.* 2017a. Nanaomycin H: A new nanaomycin analog. *J. Biosci. Bioeng.* **123**: 765-770.
- Nakashima, T., Miyano, R., Iwatsuki, M. *et al.* 2016a. Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. *J. Antibiot.* **69**: 611-615.
- Nakashima, T., Miyano, R., Matsuo. *et al.*, 2016b. Absolute configuration of iminimycin B, a new indolizidine alkaloid, from *Streptomyces griseus* OS-3601. *Tetrahedron Let.* **57**: 3284-3286.
- Nakashima, T., Takahashi, Y. & Ōmura S. 2017b. Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. *Biochem. Pharmacol.* **134**: 42-55.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. 2008. The Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Ōmura, S. 2015. Splendid gifts from microorganisms -the achievements of Satoshi Ōmura and collaborators- fifth editioned, Kitasato Institute for Life Sciences.
- Ōmura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. & Masuma, R. 1977. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization, *J. Antibiot.* **30**: 275-282.
- Ōmura, S., Tanaka, H., Koyama, Y., Oiwa, R. & Katagiri, M. 1974. Nanaomycins A and B, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **27**: 363-365.
- 大村 智, 高橋洋子, 中島琢自, 松尾洋孝, 野中健一, 坂戸久子 2017. 食品の加熱処理により発生するアクリルアミドの生成低減物質. 特願 2017-050861.
- 尾仲宏康 2014. 生合成遺伝子覚醒—外部刺激による新規天然物生産の活性化共培養法を中心に. *化学と生物* **52**: 685-692.
- Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**: 415-428.
- Rychnovsky, S. D., Rogers, B. & Yang, G. 1993. Analysis of two ¹³C NMR correlations for determining the stereochemistry of 1,3-diol acetones. *J. Org. Chem* **58**: 3511-3515.
- Schatz, A., Bugie, E. & Waksman, S.A. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**: 66-69.
- Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y. *et al.*, 2018. Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *J. Antibiot.* **71**: 619-625.
- Takahashi, Y. & Nakashima, T. 2018. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics*. **7**: pii: E45.
- Wijeratne, E. M. K., Paranagama, P. A. & Gunatilaka, A. A. L. 2006. Five new isocoumarins from Sonoran desert plant-associated fungal strains *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *Tetrahedron* **62**: 8439-8446.

質量分析および主成分分析を利用した 探索系による含窒素物質の探索

松尾 洋孝, 中島 琢自

北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

Screening for nitrogen compounds by principle component analysis with liquid chromatography-mass spectrometry

Hiroataka Matsuo, Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan

Filamentous fungi produce secondary metabolites with various structures. Recent genome analyses of filamentous fungi indicate that there are far more biosynthetic gene clusters of secondary metabolites than the number of compounds discovered thus far. This indicates that filamentous fungi potentially produce unknown and useful secondary metabolites. Physicochemical (PC) screening systems enable the detection of even minute amounts of compounds in a culture broth. According to the KEGG MEDICUS database (<https://www.kegg.jp/kegg/medicus/>), which provides molecular information about commercially available medicines, 87 % of medicines contain nitrogen. The nitrogen is important constituent of most medicines. Thus, to conduct PC screening for new nitrogen compounds from secondary metabolites of filamentous fungi and actinomycetes, we established modern screening method of nitrogen compounds using principle component analysis and liquid chromatography-mass spectrometry. During the course of these screening, three new nitrogen compounds produced by *Trichoderma virens* FKI-7573, *Sarocladium oryzae* KF-140 and *Oidiodendron maius* FKI-7498 were discovered. Here we report the establishment of screening and purification, structure elucidation and biological activities of these compounds.

Key words: fungal metabolites, nitrogen compounds, principal component analysis

緒 言

糸状菌を探索源とした physicochemical screening を実施している中で、取得された新規物質はどれも、炭素、水素、酸素のみから成るポリケタイドやテルペン系の化合物であった。近年の糸状菌ゲノム解析の結果によると、糸状菌から報告されている二次代謝産物は、生合成遺伝

子から考えられる化合物数には遠く及ばない (Keller, 2019)。特にヘテロ元素、とりわけ窒素や硫黄原子を含む二次代謝産物は、生産されているにも関わらず、見逃されている可能性がある。実際、放線菌と糸状菌から、何らかの生物活性を指標とした探索により取得された含窒素物質数を調べると、放線菌では 65 % (2,865/8,291)、糸状菌では 31 % (4,112/13,340) と大きな差がある (DNP 調べ)。真核生物である糸状菌は放線菌と同等、あるいはそれ以上の物質生産能力を有していると考えられているにも関わらず、含窒素物質の取得数にはこのように大きな差があり、糸状菌の物質生産能を完全に活かされていない可能性がある。また、ゲノム・疾患・医薬品データベースである KEGG MEDICUS (Kanehisa *et al.*, 2010) に登録されている低分子医薬品 (0.1-1kDa) における含窒素医薬品の割合を調べると、約 80 % に窒素

E-mail: matsu-h@lisci.kitasato-u.ac.jp, takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp

共同研究者：松本厚子 (北里大学北里生命科学研究所)、
野中健一 (北里大学北里生命科学研究所)、
野口吉彦 (北里大学北里生命科学研究所)、
廣瀬友靖 (北里大学北里生命科学研究所)、
砂塚敏明 (北里大学北里生命科学研究所)、
目代貴之 (東北大学金属材料研究所)、
庭野吉巳 (秀明大学看護学部)

が含まれている。つまり、含窒素物質を選択的に取得することで、効率的に医薬品のシード物質を探索することが期待できる。

含窒素物質の探索方法は、古くから様々な方法が知られている。例えば、アミノ酸を呈色するニンヒドリン反応や (Kawerau & Wieland, 1951)、3級および4級アミンを呈色するドラーゲンドルフ反応 (Rubia & Gomez, 1977) などがある。これらの反応は、培養液への直接添加やTLCに噴霧して検出する方法が一般的だが、検出感度は高いとは言えず、生産量の少ない物質には不向きである。

一方、分子量が奇数の物質は、構造内に奇数個の窒素原子を含んでいるという窒素ルールがある。近年の分析機器の発展は目覚ましく、少量のサンプルで微量成分まで検出できるLC/MSなどの開発により、微生物培養液中の物質を網羅的に検出できるようになった。そこで本研究では、LC/MSにより得られたデータをもとに、主成分分析を行い、窒素ルールにしたがって奇数の分子量を示す物質を簡便に探索する方法を構築した。また、当研究所内における生物活性物質の探索に用いられている培地の中で、最も新規物質の取得率が高かった米培地に窒素源を加えるなど、培養方法の工夫による取り組みを行った。

これらの方法により、*Trichoderma virens* FKI-7573株よりトリコチオネ酸、*Sarocladium oryzae* KF-140株よりサロクラド酸、*Oidiodendron maius* FKI-7498株よりベニシドンの新規含窒素物質を取得したので報告する。

実験方法

探索源

北里生命科学研究所微生物資源研究センターより提供された糸状菌100株を用いた。

窒素源の探索

F36培地を基本培地とし、天然物の窒素源としてペプトン、ハイポリペプトン、NZアミン、ファーマメディア、カツオエキス、乾燥ブイヨンの6成分を添加した。塩類の窒素源としては硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム (AS)、酢酸アンモニウム、コハク酸アンモニウム、酒石酸アンモニウムの6成分を添加した。また、Nose *et al.*, (2000)らの報告を参考に、上記の各培地にきな粉 (SBM) を添加した (Nose *et al.*, 2000)。

培養および培養液のLC/MS解析

生産培地はF36培地を基本とした計26種類を用いた。米を1時間半水に漬けた後に水をきり、10gを50mLの

スナップコニカルに入れた。天然物の窒素源およびきな粉をそれぞれ秤量し、米を入れたスナップコニカルに入れた。秤量したこぶ茶粉末を水で溶き、塩類の窒素源を添加し、米を入れたスナップコニカルに分注した。軽く蓋を締め、アルミ箔をかぶせて121℃、15分オートクレーブ滅菌した。種培養液を5%となるように植菌し、25℃で14日間静置培養した。生産培養後、培養液に20mLのメタノールを加え、破碎機で米と菌体を砕いた。1,500×gで5分間遠心分離し、上清を回収した。上清をシリジフィルターでろ過し、LC/MSを測定した。

新規物質探索および精製、構造解析

MarkerView softwareを用いて主成分分析を行い、奇数の分子量を有する物質のみをピックアップし、その物理化学的性状をDNPと比較した。

推定新規含窒素物質生産菌に対応した培地で培養後、シリカゲルカラム、ODSカラムクロマトグラフィーなどにより精製した。得られた物質は、一次元および二次元NMR等により平面構造の解析を行い、各種手法により立体構造までを検討した。

生物活性評価

抗菌活性試験は、ペーパーディスク法で測定した。真菌として*Candida albicans* ATCC 64548、*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763、*Aspergillus niger* ATCC 6275、*Mucor racemosus* IFO 4581、グラム陽性菌としてとして*Kocuria rhizophila* ATCC 9341、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、グラム陰性菌としてとして*Escherichia coli* NIHJ、*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* KB 88を検定菌とした。

細胞毒性試験は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学)を用いて行った。ヒト子宮頸部類上皮癌細胞HeLa S3、ヒト結腸腺癌細胞HT29、ヒト肺基底上皮腺癌細胞A549、ヒト肺腺癌細胞H1299、ヒト膵臓腺癌PANC-1、ヒト急性単球性白血病細胞THP-1、ヒトT細胞性白血病細胞Jurkat、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を用いた。

抗酸化活性は、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素消去活性を評価した。

結果および考察

生産培地の選定

含窒素物質を探索するにあたり、まず初めに生産培地の改良を行った。含窒素化合物であるgliotoxin類の生産菌である*Trichoderma virens* FKI-7573株をモデル糸状菌として用いて生産培地の検討を行った。GliotoxinはNRPSで生合成されるdiketopiperazine構造を持つ含窒素物質である (Dolan *et al.*, 2015)。種々検討の結果、

Gliotoxin 類の生産量が良く向上し、他の二次代謝産物の生産量の向上も見られた F36-きなこ (SBM)/ 硫酸アンモニウム (AS) 培地を含窒素物質の探索に使用する生産培地として選択した (Fig.1)。さらに、比較対象とし F36 培地、F36-AS 培地、F36 培地にきな粉を添加した F36-SBM 培地を選択し、計 4 種類を本研究における生産培地とした。

MakerView software による窒素ルールを適用した含窒素物質の探索

400 サンプルの LC/MS データを主成分分析ソフト

ウェア MarkerView™ (株式会社エービー・サイエックス) で解析した。MarkerView™ では 400 サンプルに含まれる全化合物の m/z 値を一覧できる。Fig.2 に MarkerView™ の表の一部を示した。Row は列番号、Index は各化合物に割り振られた数字、Peak Name は m/z 値/溶出時間 (Index)、 m/z は各化合物の m/z 値、Ret. Time は溶出時間、Group は各化合物のグループ、Use はチェックした化合物を主成分分析の対象とすることを意味している。この表を用いることで、 m/z 値が偶数 (分子量が奇数) の化合物ある含窒素化合物のみを抽出し、主成分分析をすることができる。

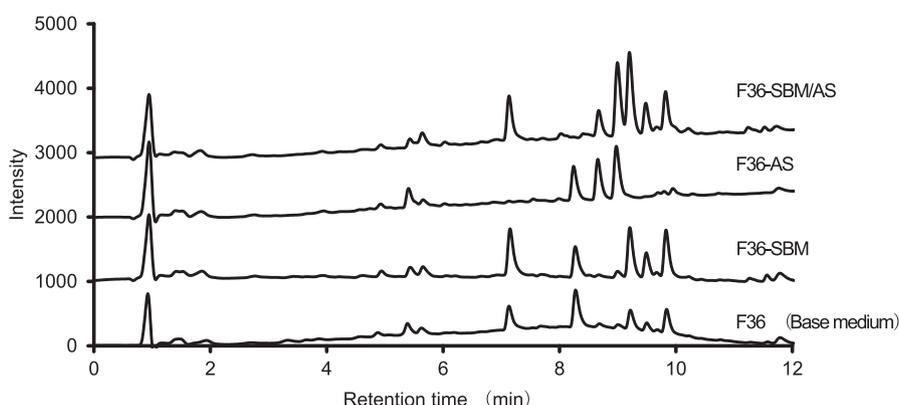


Fig. 1 The LC/UV chromatogram of the cultured broth of FKI-7573

Row	Index	Peak Name	m/z	Ret. Time	Group	USE
65482	65482	301.3/13.6 (65482)	301.2901	13.58		FALSE
65483	65483	301.3/13.9 (65483)	301.2902	13.86		FALSE
65484	65484	301.6/6.8 (65484)	301.6463	6.85		FALSE
65485	65485	301.7/6.0 (65485)	301.6678	6		FALSE
65486	65486	301.7/2.6 (65486)	301.6685	2.62		FALSE
65487	65487	301.7/2.5 (65487)	301.6708	2.48	(Monoisotopic)	FALSE
65488	65488	301.7/4.5 (65488)	301.6767	4.47		FALSE
65489	65489	301.7/4.8 (65489)	301.6792	4.83		FALSE
65490	65490	301.7/4.5 (65490)	301.6805	4.48		FALSE
65491	65491	301.7/4.8 (65491)	301.6837	4.8	(Isotope)	FALSE
65492	65492	302.0/3.0 (65492)	301.97	2.97		FALSE
65493	65493	302.0/3.0 (65493)	301.9952	2.97		FALSE
65494	65494	302.0/3.9 (65494)	302.0123	3.91	(Monoisotopic)	TRUE
65495	65495	302.1/7.1 (65495)	302.0634	7.09		TRUE
65496	65496	302.1/6.1 (65496)	302.0635	6.05		TRUE
65497	65497	302.1/8.3 (65497)	302.0654	8.28		TRUE
65498	65498	302.1/7.0 (65498)	302.0731	7.01		TRUE
65499	65499	302.1/6.1 (65499)	302.0909	6.06		TRUE

Fig. 2 The partial table of compounds analyzed by MarkerView software

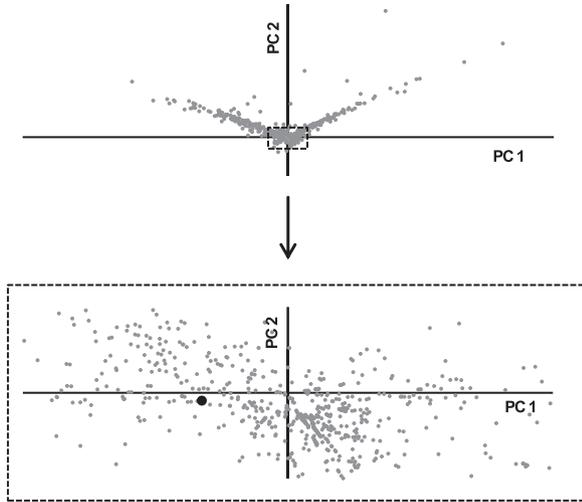
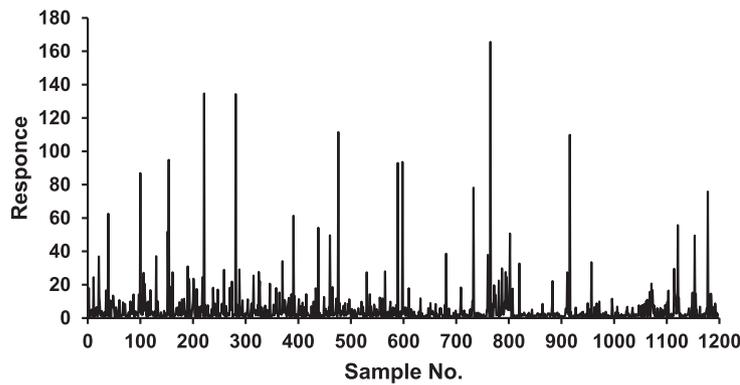


Fig. 3 The result of principal component analysis

m/z 値が偶数（分子量が奇数）の化合物を選択し、主成分分析を行った結果の散布図を Fig. 3 に示した。この散布図の1つの点が1つの化合物を示している。この中から1つの化合物を選択すると Fig. 4 に示したグラフが表示される。このグラフは横軸がサンプルナンバーを表し、縦軸は検出量を表しており、選択した化合物がどのサンプルにどの程度含まれているかを表している。例えば Fig. 4 上段のようなグラフを示す化合物は複数の培養液抽出物サンプルに含まれている化合物である。このような化合物は様々な糸状菌が生産する一般的な化合物である可能性がある。本研究では、ある菌株が特異的に生産するユニークな含窒素化合物を取得するため、Fig. 4 下段に示すような、ある1菌株のサンプルにのみ含まれていた化合物を選択した。さらに本研究では、従来の培地（F36 培地）では得ることが困難と考えられた化合物を取得するために、改変培地（F36-AS, F36-SBM,

A



B

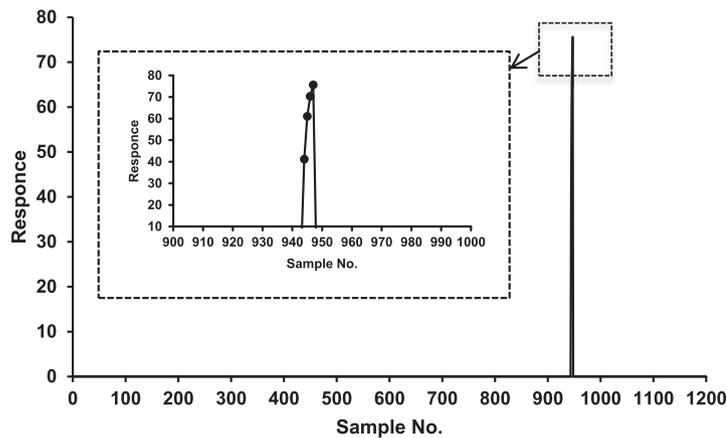


Fig. 4 The graph of selected sample. (A) The example of the compound produced by several strains. (B) The example of the compound produced by one strain.

F36-SBM-AS) での生産量が基本培地よりも向上している化合物 (Fig.4Bがその例) を選択した. このような方法により, 400 サンプルに含まれていた m/z 値が偶数 (分子量が奇数) の物質を 1197 件選択した. この中から, 菌株特異的な物質を 781 物質選択し, 改変培地で生産量が増加していた物質を絞り込み, 284 物質を選択した. この内の 8 物質の物理化学的性状情報を DNP で検索した結果, 5 つの物質が新規含窒素物質であると推定された. それ以外の物質については解析中である.

1197 件の m/z 値が偶数 (分子量が奇数) の物質を見出したことにより, 1 株あたり平均約 12 の含窒素物質を生産していることが明らかになった. さらに, 菌株特異的な物質については 1 株あたり約 8 物質を生産していることが分かった. このように, 培地改変や探索方法を工夫することで, 糸状菌の含窒素物質生産能を引き出すことに成功した.

Trichoderma virens FKI-7573 株が F36SBM-AS 培地で生産するトリコチオネ酸について

本菌株が F36SBM-AS 培地で生産する FKI-7573A 物質は, UV 極大吸収 216, 249nm, $m/z=510.2255$ $[M+H]^+$ ($C_{24}H_{35}N_3O_7S$) の物性を示し, DNP 検索の結果, これら物性と一致する既知物質はなく, 新規物質と推定された. そこで, FKI-7573 株を大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製し, FKI-7573A 物質を 55mg 取得した. NMR 解析の結果, FKI-7573A 物質はヘプテリ

ジン酸にエルゴチオネインが結合した新規物質で (Fig.5), *Trichoderma* 属と物質名に因んでトリコチオネ酸と命名した.

相対立体配置を検討するため, ROESY 相関およびカップリングコンスタントの解析を行った結果, トリコチオネ酸の相対立体配置を Fig.6 のように決定した. さらに, C-5' の絶対立体配置は, ラネーニッケル反応 (Mozingo *et al.*, 1943) による脱硫反応で生じるヘルシニンの比旋光度を, (S)-ヘルシニンの文献 (Reinhold *et al.*, 1968) と比較することで決定した. トリコチオネ酸をラネーニッケルで脱硫し, HPLC 分取することで, トリコチオネ酸由来のヘルシニンを得た. その比旋光度は $[\alpha]_D^{23}+53.4$ で, (S)-ヘルシニンの文献値は $[\alpha]_D^{22}+44.7$ であったため, トリコチオネ酸由来のヘルシニンは (S)-ヘルシニンであると決定した. ヘプテリジン酸部分の絶対立体配置は CD スペクトルにより決定した. CD スペクトルの計算には Spartan 16 (Wavefunction, Inc.) と Gaussian 16 (Gaussian, Inc.) を用いた. 実測の CD スペクトルと Fig.6 の絶対立体配置をもとにして算出された円二色性スペクトルを Fig.7 に示した. 実測, 計算値ともに正のコットン効果を示したことから, トリコチオネ酸のヘプテリジン酸部分の絶対立体配置は 1S, 6S, 7R, 10S であると決定した. 以上の結果から, トリコチオネ酸は Fig.8 に示した絶対立体配置であると決定した.

トリコチオネ酸の抗菌活性, 細胞毒性, 抗マラリア活

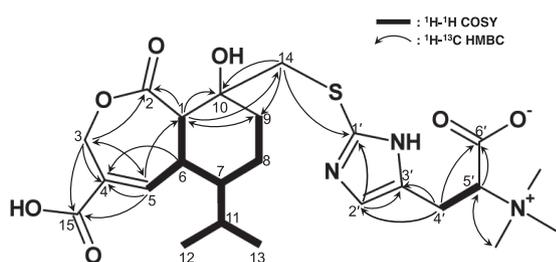


Fig. 5 1D and 2D NMR correlations of trichothioneic acid

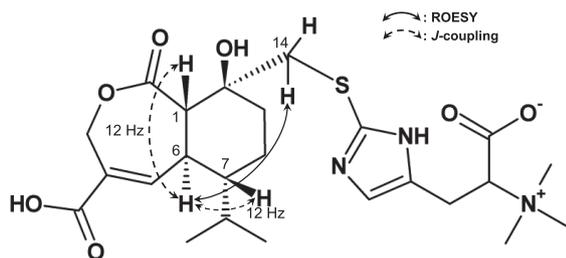


Fig. 6 Analyses of ROESY correlations and coupling constants

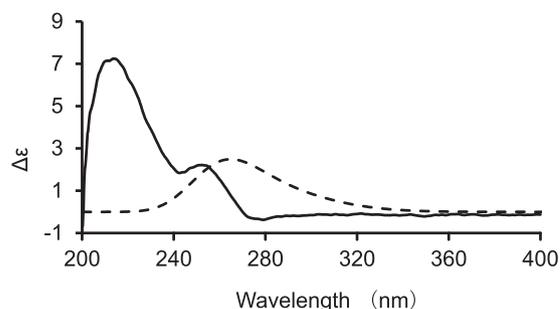


Fig. 7 The comparison with CD spectra of trichothioneic acid (full line: observation, dotted line: computation)

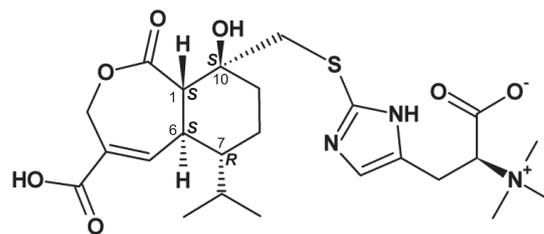


Fig. 8 Absolute structure of trichothioneic acid

性, 抗酸化活性を評価した結果, ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) および一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) 消去活性を見出した. ヒドロキシラジカルに対する 0.1mM のトリコチオネ酸の消去活性は陽性対照であるケルセチンと同程度であった. また, 一重項酸素に対するトリコチオネ酸の消去活性は, 陽性対照である 2.5mM アジ化ナトリウムと同程度であった (Fig.9).

Sarocladium oryzae KF-140 株が F36SBM-AS 培地で生産するサロクラド酸について

本菌株が F36SBM-AS 培地で生産する KF-140 物質は, UV 極大吸収 264nm, $m/z = 382.1875$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{NO}_7$) の物性を示し, DNP 検索の結果, これら物性と一致する既知物質はなく, 新規物質と推定された. そこで, KF-140 株を大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製し, KF-140 物質を 55mg 取得した. NMR 解析の結果, KF-140 物質はテトラミン酸を部分構造に有する 3

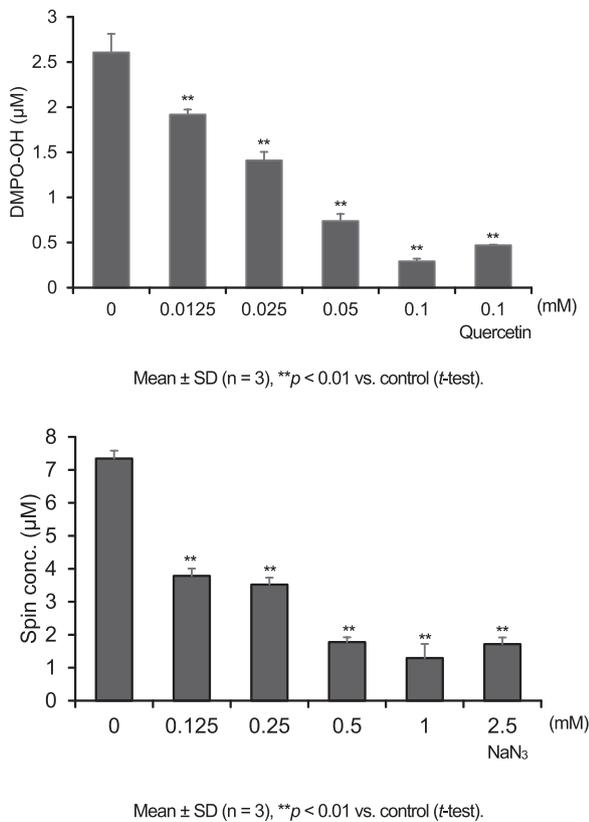


Fig. 9 The $\cdot\text{OH}$ - and $^1\text{O}_2$ -eliminating performance of trichothionic acid. (A) $\cdot\text{OH}$ with DMPO-OH values and (B) $^1\text{O}_2$ with spin concentration values measured by electron spin resonance spectra. Quercetin and NaN_3 were used as respective positive controls. Mean \pm SD ($n=3$), $**p < 0.01$ vs. NC (t -test).

つの構造が推定された (Fig.10A-C). KF-140 物質を *Sarocladium* 属とテトラミン酸に因んでサロクラド酸と命名した.

推定構造 C について, トリフェニルホスフィンを用いて還元したところ, まったく反応は進行しなかった. また, サロクラド酸を TMS ジアゾメタンでメチル化したところ, 最大で 3 つのメチル基が導入されることを確認した. この条件を満たすのは推定構造 A である. さらに, MS/MS フラグメントを解析したところ, 推定構造 A でなければ見られないフラグメントが観測されたため (Fig.11), サロクラド酸の構造を推定構造 A であると決定した. サロクラド酸の生物活性については探索中である.

Oidiodendron maius FKI-7498 株が F36SBM-AS 培地で生産するペニシドン E および F について

本菌株が F36SBM-AS 培地で生産する FKI-7498A および B 物質は, それぞれ UV 極大吸収 226, 260, 314nm,

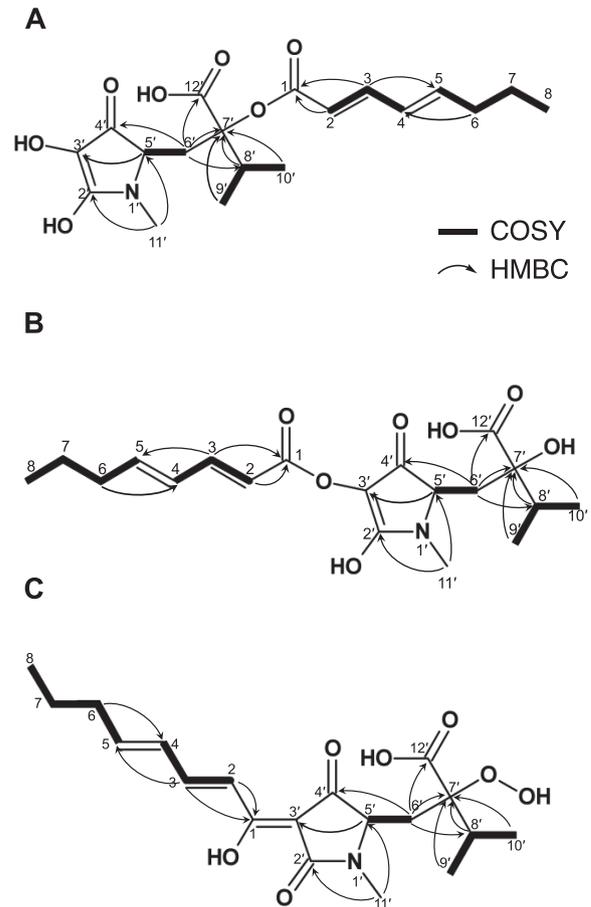


Fig. 10 Three deduced structures of sarocladic acid ^1H - ^1H COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations of deduced structure 1 (A), 2 (B) and 3 (C).

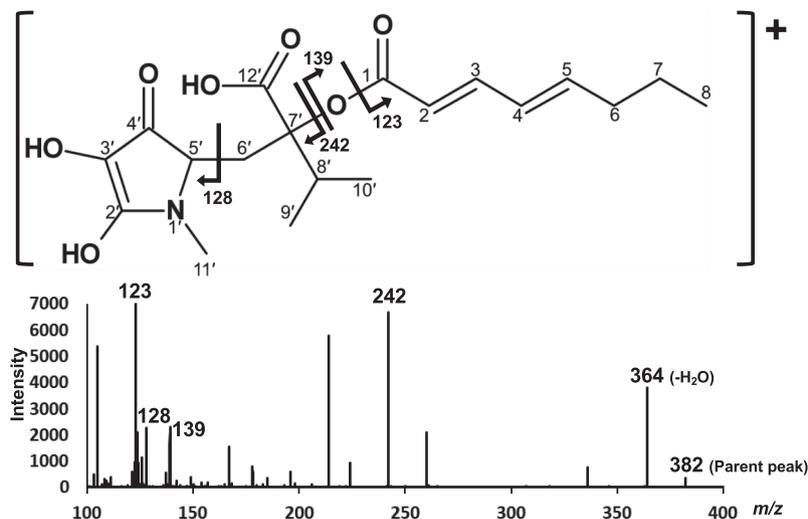


Fig. 11 MS/MS fragments of sarocladic acid

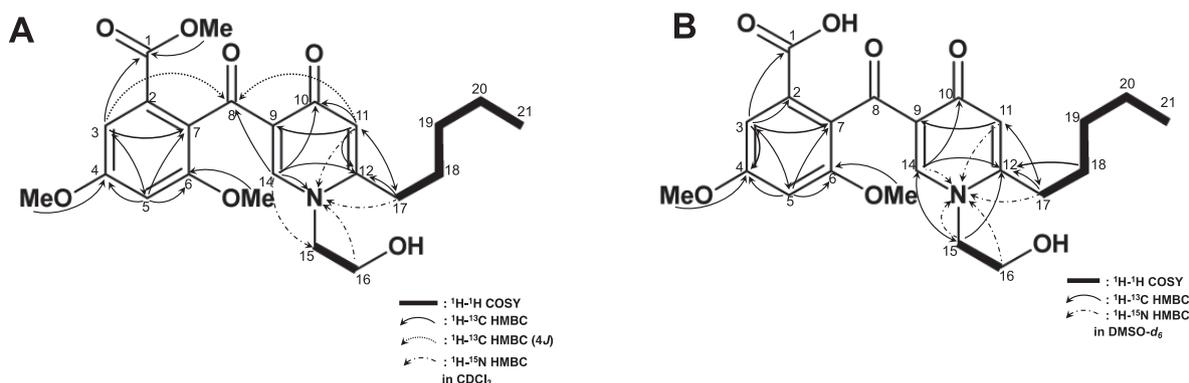


Fig. 12 1D and 2D NMR correlations of penicidones E and F
(A) 1D and 2D NMR correlations of penicidone E and (B) 1D and 2D NMR correlations of penicidone F.

$m/z = 418.2005 [M+H]^+$ ($C_{22}H_{27}NO_7$) および UV 極大吸収 226, 260, 316 nm, $m/z = 432.2038 [M+H]^+$ ($C_{22}H_{29}NO_7$) の物性を示し, DNP 検索の結果, これら物性と一致する既知物質はなく, 新規物質と推定された. そこで, FKI-7498 株を大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製し FKI-7498A および B 物質それぞれを 25 mg, 14 mg 取得した. NMR 解析の結果, FKI-7498A および B 物質は 2-(4-ピリドン-3-カルボニル)-安息香酸を基本骨格とするペニシドン類の新規類縁物質であることが分かり (Fig. 12), ペニシドン E および F と命名した.

ペニシドン E および F は, 2-(4-pyridone-3-carbonyl) benzoic acid を基本骨格とする化合物であった. この骨格を有する天然物としてはペニシドン C (Ge *et al.*,

2008) および D (Liu *et al.*, 2015) のみ報告されており, 非常にユニークな構造であった. ペニシドン C はコルククヌギの幹から得られた内生糸状菌である *Penicillium* sp. IFB-E022 から見出され, 弱い細胞毒性が報告されている. また, ペニシドン D はマングローブの枝から得られた内生糸状菌である *Penicillium* sp. HN29-3B1 から得られている. ペニシドン C, D の関連化合物であるフニコンは 8 つの類縁物質が DNP に掲載されているが, これらの化合物の生産菌は *Penicillium* 属あるいは *Talaromyces* 属 (*Penicillium* 属の完全世代の一つ) の糸状菌である. *Oidiodendron* 属と *Penicillium* 属はそれぞれ *Leotiomyces* 綱および *Eurotiomyces* 綱に分類されており系統的に遠い関係にある. 糸状菌は属ごとに生産する物質が異なることが知られており, これら 2 種の糸状

菌において同じ基本骨格を有する物質が得られたことは、生合成遺伝子クラスターの伝播や進化の観点から大変興味深いことであった。加えて、*O. maius* は菌根菌として知られており (Martino *et al.*, 2018)、ペニシドン C, D は植物内生糸状菌から得られていることから、ペニシドン E, F は植物に対して何らかの影響を与える活性が期待される。

要 約

糸状菌を探索源とした physicochemical screening を実施している中で、取得された新規物質はどれも、炭素、水素、酸素のみから成るポリケチドやテルペン系の化合物であった。しかし、糸状菌は様々な構造を有する二次代謝産物を生産している。近年のゲノム解析の結果、糸状菌は報告されている二次代謝産物数を超える生合成遺伝子を有していることが明らかとなった。つまり、糸状菌はまだ多くの未知物質を生産していることが示唆された。医薬品データベースである KEGG MEDICUS によると、低分子医薬品における含窒素物質の割合は 87% であった。したがって、窒素は医薬品にとって重要な構成元素である。そこで、新規含窒素物質を選択的に探索するため、主成分分析と LC/MS を用いて新たなスクリーニング方法を構築した。糸状菌培養液を用いたスクリーニングの結果、*Trichoderma virens* FKI-7573, *Sarocladium oryzae* KF-140, *Oidiodendron maius* FKI-7498 株から 3 つの新規含窒素物質を発見したのでここに報告する。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 宮野怜, 松尾洋孝, 野中健一, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2018. Physicochemical screening による糸状菌由来新規アルカロイドの探索 - 生産培地の検討と二次代謝産物の解析 -. 日本農芸化学会 2018 年度大会 3 月 15-18 日. 名古屋
- 2) 宮野怜, 松尾洋孝, 野中健一, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2018. Physicochemical Screening による糸状菌由来新規アルカロイドの探索 - 新規アルカロイド trichothioneic acid について -. 第 31 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 8 月 8-9 日. 相模原
- 3) 宮野怜, 松尾洋孝, 野中健一, 目代貴之, 庭野吉己, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2019. 「Physicochemical screening による新規化合物の探索 - *Trichoderma virens* FKI-7573 株が生産する新規含窒素化合物について -. 日本農芸化学会 2019 年度大会 3 月 24-27 日. 東京
- 4) 宮野怜, 松尾洋孝, 野中健一, 塩見和朗, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自. 2019. Physicochemical screening による新規化合物の探索 - *Sarocladium oryzae* KF-140 株が生産する新規含窒素化合物について -. 第 32 回北里大学バイオサイエンスフォーラム 8 月 7-8 日. 東京

原著論文

- 1) Miyano, R., Matsuo, H., Mokudai, T., Higo, M., Nonaka, K., Niwano, Y., Shiomi, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Trichothioneic acid, a new antioxidant compound produced by the fungal strain *Trichoderma virens* FKI-7573. *J. Biosci. Bioeng.* **129**, 508-513.

謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所 (IFO) の 2014 年度寄付講座助成により支援されたもので、この場を借りて感謝致します。NMR および MS を測定していただきました北里大学薬学部の佐藤倫子氏、長井賢一郎博士に深く感謝致します。また、本研究は当寄付講座に在籍した学生、北里生命研大村創薬グループの皆さんのご協力があったからこそ成し遂げられたもので、ここに感謝致します。

文 献

- Dolan, S. K., O'Keeffe, G., Jones, G. W. & Doyle, S. 2015. Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. *Trends Microbiol.* **23**: 419-428.
- Ge, H. M., Shen, Y., Zhu, C. H., Tan, S. H., Ding, H., Song, Y. C. & Tan, R. X. 2008. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. *Phytochemistry* **69**: 571-576.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. & Hirakawa, M. 2010. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **38**: D355-360.
- Kawerau, E. & Wieland, T. 1951. Conservation of amino-acid chromatograms. *Nature* **168**: 77-78.
- Keller, N. P. 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 167-180.
- Liu, Y., Yang, Q., Xia, G., Huang, H., Li, H., Ma, L., Lu, Y., He, L., Xia, X. & She, Z. 2015. Polyketides with α -glucosidase inhibitory activity from a mangrove endophytic fungus. *Penicillium* sp. HN29-3B1. *J. Nat. Prod.* **78**: 1816-1822.
- Martino, E., Morin, E., Grelet, G. A., *et al.* 2018. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytol.* **217**: 1213-1229.
- Mozingo, R., Wolf, D. E., Harris, S. A. & Folkers, K. 1943. Hydrogenolysis of sulfur compounds by Raney nickel catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **65**: 1013-1016.
- Nose, H., Seki, A., Yaguchi, T., Hosoya, A., Sasaki, T., Hoshiko, S. & Shomura, T. 2000. PF1163A and B, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. *J. Antibiot.* **53**: 33-37.
- Reinhold, V. N., Ishikawa, Y. & Melville, D. B. 1968. Synthesis of α -N-methylated histidines. *J. Med. Chem.* **11**: 258-260.
- Rubia, L. B. & Gomez, R. 1977. TLC sensitivity of six modification of Dragendorff's reagent. **66**: 1656-1657.

モリブデン酸化および質量分析を組み合わせた 含硫黄物質探索系の構築と新規含硫黄物質の取得

松尾 洋孝, 中島 琢自

北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

Screening for sulfur compounds by molybdenum-catalyzed oxidation with liquid chromatography-mass spectrometry

Hiroataka Matsuo, Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan

Natural products are often used as drugs, agricultural chemicals, and chemical reagents. Compounds containing sulfur are often useful due to their strong biological activities. According to the KEGG MEDICUS database (<https://www.kegg.jp/kegg/medicus/>), which provides molecular information about commercially available medicines, 25 % of medicines contain sulfur. Thus, sulfur is important constituent of most medicines. We established modern screening (MoS-screening) for sulfur compounds based on Mo-catalyzed oxidation and liquid chromatography-mass spectrometry. Here, we report the establishment of MoS-screening and two new sulfur compounds produced by *Trichoderma polypori* FKI-7382 and *Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961.

Key words: molybdenum-catalyzed oxidation, sulfur compounds, MoS screening

緒 言

硫黄は、単体自体で医薬品として用いられている他、含硫黄物質は様々な生理活性や生物活性を示すため、重要な医薬品の構成元素の一つである。ゲノム・疾患・医薬品データベースである KEGG MEDICUS (Kanehisa *et al.*, 2010) に登録されている低分子医薬品 (0.1-1kDa) における含硫黄医薬品の割合を調べると、約 25% が含硫黄医薬品であった。つまり、含硫黄物質を選択的に取得することができれば、新規な医薬品の発見が期待できる。

天然物では、その構造は基本的に炭素、水素、酸素、窒素、硫黄、塩素、臭素 (稀にリン、ヨウ素、フッ素) から成る。既知天然物データベースである Dictionary of

Natural Products (2017 年版) によると、炭素、水素、酸素を基本構成元素とした場合、収録されている約 27 万化合物のうち含窒素物質は約 65,000 件 (24%)、含硫黄物質は約 9,800 件 (3.6%)、含塩素物質は約 5,400 件 (2%)、含臭素物質は約 4,000 件 (1.5%)、含リン物質は約 980 件 (0.4%)、含ヨウ素物質は 324 件 (0.1%)、含フッ素物質は 210 件 (0.08%) であった。含硫黄物質の特異的な探索方法 (検出方法) は、硝酸銀 (Pollard *et al.*, 1962, Coyne & Maw, 1964) やニトロプルシドなどを用いた TLC の呈色反応 (Korte & Vogel, 1962) などが知られているが、微量成分の検出は困難である。このような背景の中、2013 年に理化学研究所と山口大学の共同研究で、質量分析を用いた含硫黄物質の網羅的解析法「S-オミクス」が報告された (Nakabayashi *et al.*, 2013)。これは、硫黄の天然存在比 (^{32}S : 94.9%, ^{34}S : 4.29%) を、超高分解能質量分析を用いて M+2 領域を見分ける方法である。しかし残念ながら、この質量分析装置は非常に高価であり、熟練した技術・経験を必要とし、国内でも限られた機関のみが所有しているため、現

E-mail: matsuo-h@lisci.kitasato-u.ac.jp, takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp

共同研究者: 松本厚子 (北里大学北里生命科学研究所),

野中健一 (北里大学北里生命科学研究所),

野口吉彦 (北里大学北里生命科学研究所),

廣瀬友靖 (北里大学北里生命科学研究所),

砂塚敏明 (北里大学北里生命科学研究所)

状では汎用性に欠ける装置といえる。

モリブデン酸化は、1984年にTrost & Masuyama (1984)らが報告したモリブデンを触媒とし、過酸化水素を酸化剤として用いる酸化反応である。通常、塩基性条件下で1級水酸基の存在下、2級水酸基の酸化に用いられる。Jeyakumar *et al.* (2009)らはこの応用例として、スルフィドをスルホンへと酸化する簡便な方法を報告した。さらに、この酸化では1級および2級水酸基やオレフィンの酸化はほとんど起きない。そこで我々は、この反応を利用することによって、微生物培養液中の含硫黄物質を同定できるのではないかと考えた。すなわち、微生物培養液中の含硫黄物質をモリブデン酸化により酸化(硫黄原子に酸素を付加)し、未反応サンプルと酸化サンプルをLC/MSで比較することにより、酸化された含硫黄物質は酸化サンプル上から消失し、分子量が32(酸素原子2つ分)増加した新たなピークが出現する。未酸化サンプルから消失したピークを同定することにより含硫黄物質を同定できる。本研究では、モリブデン酸化とLC/MSを組み合わせることにより、含硫黄物質の新たな探索系を構築し、MoS-screeningと命名した(Matsuo *et al.*, 2020a)。本項目では、MoS-screeningの構築および本探索系による*Trichoderma polypori* FKI-7382株から*N*-アセチルシステインを部分構造に有するチオポリジオール類(Matsuo *et al.*, 2020b)、*Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961株よりシスタチオンを部分構造に有するレプトチオン(unpublished)の取得について報告する。

実験方法

モリブデン酸化

被験サンプルを1mg/mLになるようメタノール200 μ Lに溶解し、100 μ Lずつそれぞれ2枚の96 well plateに分注した。1枚目(酸化用plate)には、10mg/mLに調製した(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O水溶液を10 μ Lおよび30%過酸化水素水を10 μ L加え、2枚目(未酸化用plate)には濃度調整のため水を20 μ L加えた。室温で6時間、プレートシェーカーで振盪後、各サンプルをLC/MSで分析した。

LC/MS測定条件

LCは、AB Sciex社製ExionLC™を用い、各種条件は以下の通り。Column: CPCELL CORE C18 S2.7 (3.0mmI.D. × 100mm), Column temperature: 40°C, Eluent A: H₂O + 0.1% formic acid, B: methanol+0.1% formic acid, Gradient system: (A/B), 0min (95/5)→2min (95/5)→10min (0/100)→12min (0/100), Flow rate: 0.5mL/min, Wavelength: 200–600nm, Injection volume: 1 μ L. MSは、

AB Sciex社製TripleTOF® 5600+ Systemを用いた。ポジティブイオンモードで測定し、各種測定条件は以下の通り。Ion Source Gas1: 50psi, Ion Source Gas2: 50psi, Curtain Gas: 25psi, Temperature: 500°C, IonSpray Voltage Floating: 5500V, Declustering Potential: 80V, Collision Energy: 45V, Collision Energy Spread: 15V, Ion Release Delay: 30 μ s, Ion Release Delay Width: 15 μ s. 各データは、Analyst software (AB Sciex)を用いて解析した。

探索源

糸状菌新鮮分離株培養液および北里生命科学研究所で長期保存されていた放線菌株を培養した培養液、放線菌新鮮分離株培養液を用いた。

新規物質探索および精製、構造解析

MoS-screeningにより含硫黄物質であると推定された物質について、その物理化学的性状をDNPと比較した。推定新規含硫黄物質生産菌を対応した培地で培養後、シリカゲルカラム、ODSカラムクロマトグラフィーなどにより精製した。得られた物質は、一次元および二次元NMR等により平面構造の解析を行い、各種手法により立体構造までを検討した。

生物活性評価

抗菌活性試験は、グラム陽性菌として*Bacillus subtilis* KB-211, *Kocuria rhizophila* KB-212を、グラム陰性菌として*Escherichia coli* KB-213, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KB-88を、真菌として*Candida albicans* KF-1, *Mucor racemosus* KF-233を用いた。

細胞毒性試験は、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60, ヒトT細胞性白血病細胞Jurkat, ヒト急性単球性白血病細胞THP-1, ヒト肺基底上皮腺癌細胞A549, ヒト膵臓腺癌PANC-1, ヒト子宮頸部類上皮癌細胞HeLa S3, ヒト結腸腺癌細胞HT29, ヒト肺腺癌細胞H1299を用いた。

抗酸化活性は、スーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素消去活性を評価した。

結果および考察

まず始めに、複雑な構造を有する天然物でも簡便にスルフィドからスルホンへ酸化できるかどうかを検討するため、Fig.1に示した硫黄原子の架橋構造を有するオートヴィリンA (Kajula *et al.*, 2016)、スルフィド構造を有するナナオマイシンK (Matsuo *et al.*, 2020c)および*N*-アセチルシステインを有するラクタシステイン(Ômura

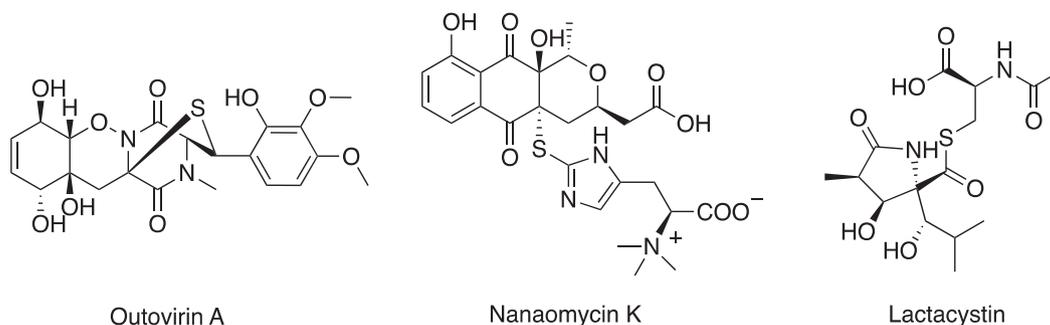


Fig. 1 Structures of outovirin A, nanaomycin K and lactacystin.

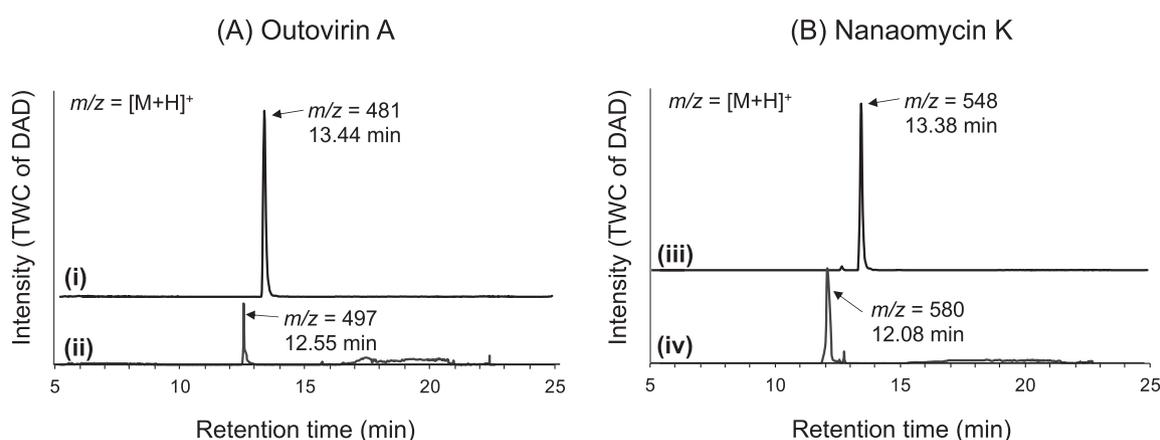


Fig. 2 Chromatograms are shown for Mo-catalyzed oxidation and control samples containing of sulfur compounds: (A) outovirin A and (B) nanaomycin K. Chromatograms (i) and (iii) were acquired prior to Mo-catalyzed oxidation and chromatograms (ii) and (iv) were acquired after Mo-catalyzed oxidation. Mass-to-charge ratios (m/z) are indicated as $[M+H]^+$.

et al., 1991a, 1991b) をそれぞれモリブデン酸化した。未酸化サンプルと比較した結果の LC/MS クロマトグラムを Fig. 2 に示した。オートヴィリン A ($m/z = 481$, 13.44 min; Fig. 2A-i) は、酸化により完全にピークが消失し、酸化後クロマトグラム上で酸素原子が1つ付加したピーク ($m/z = 497$, 12.55 min) として出現した。ナナオマイシン K ($m/z = 548$, 13.38 min; Fig. 2B-i) もまた、酸化により完全にピークが消失し、酸化後クロマトグラム上で酸素原子が2つ付加したピーク ($m/z = 580$, 12.08 min; Fig. 2B-ii) として出現した。一方、ラクタシスチンは酸化後クロマトグラム上で全くピークが検出されなかったため、酸化反応により分解したものと考えた。以上の結果から、天然物を用いた場合では、酸化反応に耐えうる含硫黄物質は、スルフィニルあるいはスルフォニル体として同定できることが分かった。

次に、これらの含硫黄物質が混合物中でも同定できるのかどうかを検討した。硫黄非含有物質としてタンザワ酸 B (Kuramoto *et al.*, 1997), ポーベリシン (Hamill *et al.*, 1969), SF-227 (Mizushima *et al.*, 2012), アクレモリン B (Tian *et al.*, 2015) を用い、含硫黄物質としてオートヴィリン A およびナナオマイシン K を用いた。それぞれ 1 mg を含んだメタノール溶液 1 mL を、酸化用および未酸化用として 100 μ L ずつ分注して反応させ、LC/MS で測定した結果を Fig. 3 に示した。各物質の構造、保持時間 (RT), 質量電荷比 (m/z) は Table 1 に示した。未酸化クロマトグラム上 (Fig. 3A) の peak 1 ~ 6 は、その m/z 値および UV スペクトルから Table 1 に示したように同定した。酸化後クロマトグラム上では (Fig. 3B), その RT, UV スペクトルおよび m/z 値から, peak 1' (11.56 min), peak 2' (11.16 min) および peak 4' (7.10 min) をそれ

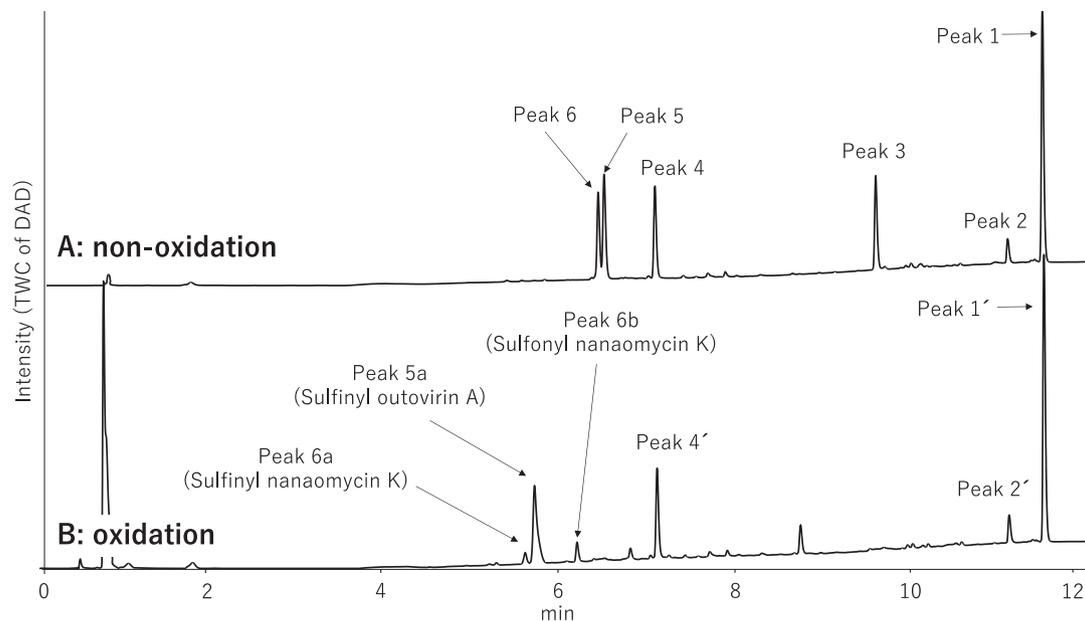
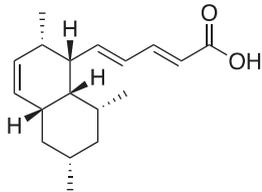
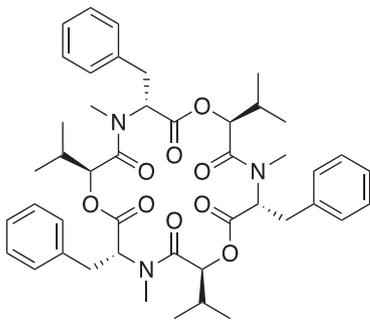
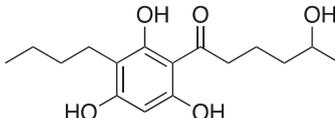


Fig. 3 An LC/MS chromatogram of a mixture of compounds with and without sulfur. (A) Control (non-oxidized) sample, (B) oxidized sample. Intensity refers to the output of a photodiode array detector (DAD) operating in total wavelength chromatography (TWC) mode.

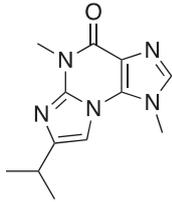
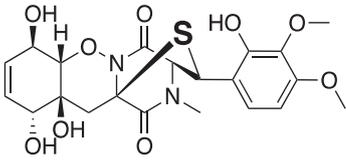
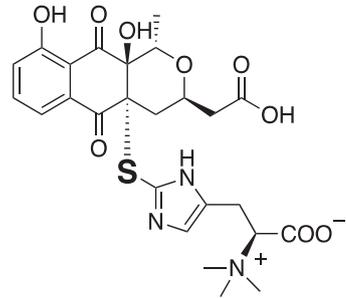
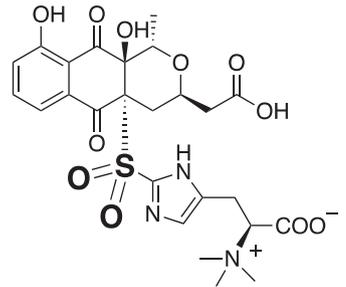
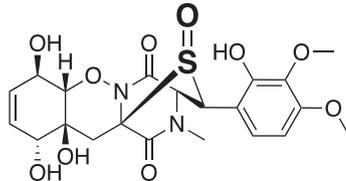
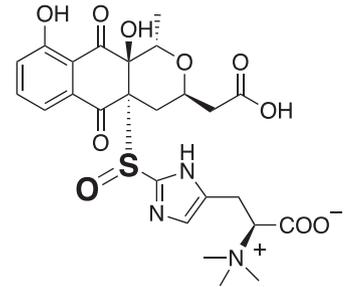
Table 1 The structures and LC/MS data of the compounds used in this study.

Peak No.	Compound	RT (min)	m/z $[M+H]^+$	Structure
1, 1'	Tanzawaic acid B	11.56	295	
2, 2'	Beauvericin	11.16	784	
3	SF-227	9.63	297	

Continued on the next page.

Table 1 continued

Continued.

4,4'	Acremoline B	7.10	246	
5	Outovirin A	6.52	481	
6	Nanaomycin K	6.45	548	
6b	Sulfonyl nanaomycin K	6.21	580	
5a	Sulfinyl outovirin A	5.72	497	
6a	Sulfinyl nanaomycin K	5.62	564	

ぞれタンザワ酸 B, ボーベリシンおよびアクレモリン B と同定した. Peak 5 (6.52min) および peak 6 (6.45min) は, 酸化後クロマトグラム上では消失しており, 新たに peak 5a (5.72min), peak 6a (5.62min) および peak 6b (6.21min) が出現した. Peak 6a および peak 6b はそれぞれ, $m/z=564$ および 580 $[M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し, peak 6 と同様の UV スペクトルを示した. また, peak 5a は $m/z=497$ $[M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し, peak 5 と同様の UV スペクトルを示した. 以上のことから, peak 5a, peak 6a および peak 6b はそれぞれ, スルフィニルオートヴィリン A, スルフィニルナオマイシン K およびスルフォニルナオマイシン K と同定した. Peak 3 (SF-227) の酸化体 ($m/z=297$) は酸化後クロマトグラム上で検出されなかったため, モリブデン酸化により分解したと考えられた. オートヴィリン A (peak 5) とスルフィニルオートヴィリン A (peak 5a) のように, UV スペクトルにはほとんど変化がないため, 同定は容易であった. 以上の結果から, 混合物中の含硫黄物質はモリブデン酸化により, スルフィニル体, スルフォニル体あるいは両方の酸化体としてオリジナルのピーク付近に検出されることが明らかになり, 混合物中における含硫黄物質の同定が可能であることが示唆され, 本探索系

をモリブデン (Mo) 酸化を用いた硫黄 (S) 物質の探索系にちなみ, MoS-screening と名付けた.

最後に, MoS-screening を用いて微生物培養液中から含硫黄物質の探索を行なった. 北里生命科学研究所微生物機能研究室松本准教授および微生物資源研究センター野中講師により提供された放線菌および糸状菌それぞれ 150 株の培養液 (50% エタノールブロス) を 96 well plate に分注し, 2 枚作成した. 1 枚目には $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 水溶液を $10\mu L$ および 30% 過酸化水素水を $10\mu L$ 加え, 2 枚目 (未酸化用 plate) には濃度調整のため水を $20\mu L$ 加えた. 室温で 6 時間, プレートシェーカーで振盪後, 各サンプルを LC/MS で分析した. その結果, 放線菌 *Kitasatospora setae* KM-6054^T 株が生産する物質を含硫黄物質と推定した. 本物質は, RT 7.11min, $m/z=402.1103$ $[M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し, 分子式は $C_{19}H_{20}N_3O_5S$ (calculated value for m/z 402.1124) と推定され, 214, 242, 276, 310, 384nm に特徴的な UV 極大吸収を示す物質であった (Fig. 4A). これらの物理化学的性状を天然物データベース Dictionary of Natural Products で検索した結果, キタセタリン (Aroonsri *et al.*, 2012) と良く一致した. キタセタリンは, 2012 年に放線菌 *Kitasatospora setae* NBRC 14216^T 株から単離された

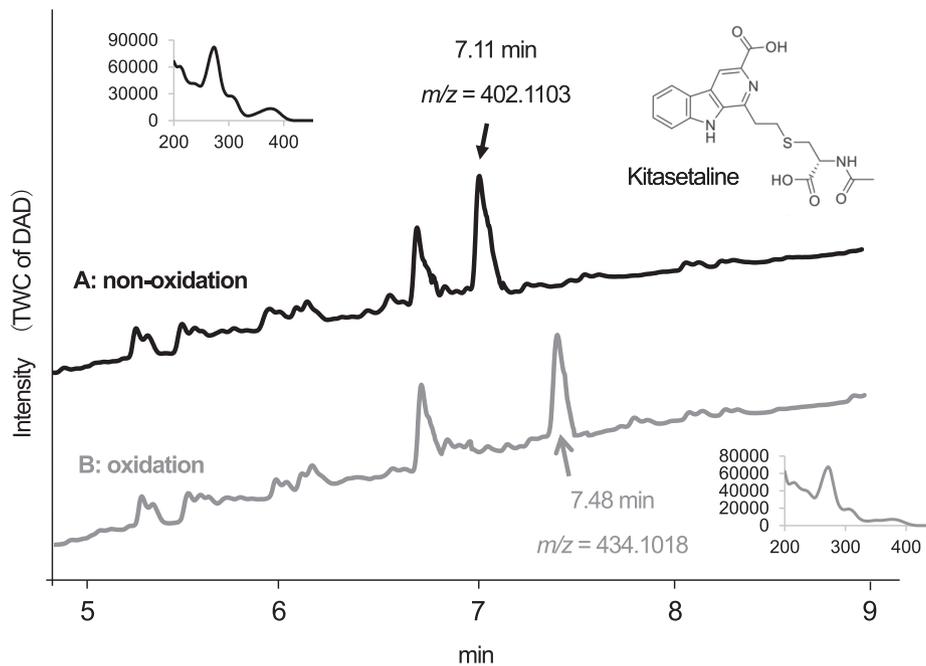


Fig. 4 LC/MS chromatograms of kitasetaline-containing broth for the control (non-oxidized) (A) and Mo-catalyzed samples (B). The physicochemical properties of kitasetaline are also shown. Mass-to-charge ratios (m/z) are indicated as $[M+H]^+$.

β -カルボリン物質である (Fig. 4). 各種物理化学的性状と生産菌が一致していることから, 本物質をキサセタリンと同一化した. キサセタリンは, 構造内に *N*-アセチルシステインを有しており, モリブデン酸化によってスルフィドがスルホンへと酸化され, 7.48min の $m/z=434.1018$ を示すピークとして出現したと考えられる (Fig. 4B). 以上のように, 微生物培養液中の含硫黄物質の同一化に成功し, MoS-screening が含硫黄物質の探索に有効であることが示された. そこで, MoS-screening による微生物培養液からの新規含硫黄物質の探索を行なった結果, *Trichoderma polyperi* FKI-7382 株から *N*-アセチルシステインを部分構造に有するチオポリジオール類, *Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961 株よりシスタチオンを部分構造に有するレプトチオニンを取得した.

チオポリジオール A および B

Trichoderma polyperi FKI-7382 株が F36SBM-AS 培地で生産する FKI-7382A および B 物質は, それぞれ UV 極大吸収 233nm, $m/z=372.1835$ $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{29}NO_5S$) および UV 極大吸収 232nm, $m/z=372.1837$ $[M+H]^+$ ($C_{18}H_{29}NO_5S$) の物性を示し, UV スペクトルが似ていることから, FKI-7382A および B 物質は類縁体の関係にあると推定された. DNP 検索の結果, これら物性と一致する既知物質はなく, 新規含硫黄物質と推定された. そこで, FKI-7382 株を大量培養後, 各種カラムクロマ

トグラフィーにより精製し FKI-7382A および B 物質それぞれを 15.4mg, 6.3mg 取得した. NMR 解析の結果, FKI-7382A および B 物質は互いに立体異性体の関係にあることが分かり, Fig. 5A および B に示す *N*-アセチルシステインを部分構造に有する新規含硫黄物質であることが明らかとなった. 生産菌の種名および部分構造からチオポリジオール A および B と命名した.

チオポリジオール A および B は, 1,2-ジオール部位および *N*-アセチルシステイン部位にキラル中心を有するため, 立体構造の検討を行った. 1,2-ジオール部位の相対立体構造は, Freire *et al.* (2007) らの報告を参考に, チオポリジオール A のアルファ-メトキシ-アルファ-(トリフルオロメチル) フェニル酢酸 (MPA) ジエステルを調製し, 25°C およびマイナス 30°C の 1H -NMR ケミカルシフトの差 (Fig. 6) から Fig. 7 のように決定した. また, チオポリジオール A をラネーニッケルにより脱硫し, 加水分解により生じたアラニンに FDLA を修飾後, 改良マーフィー法を適用することにより *N*-アセチルシステイン部分の絶対構造を Fig. 7 のように決定した. 残念ながら, 取得量が少なかったためチオポリジオール B の立体構造を決定することができなかった.

チオポリジオール A および B の抗菌活性, 細胞毒性, 抗マラリア活性を評価した結果, チオポリジオール B が *Candida albicans* に対して抗菌活性を示した. 6mm ペーパーディスクを用い, 30 μ g のチオポリジオール B

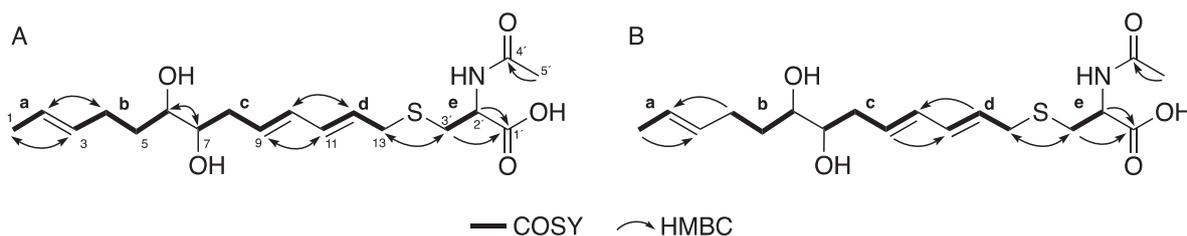


Fig. 5 1D and 2D NMR correlations of (A) thioporiol A and (B) thioporiol B

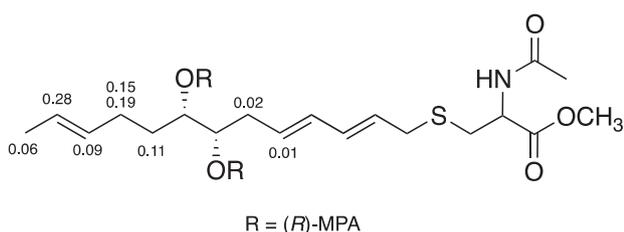


Fig. 6 $\Delta\delta^{T1T2}$ values (ppm, -30 and 25°C) obtained for bis-(R)-MPA ester of thioporiol A

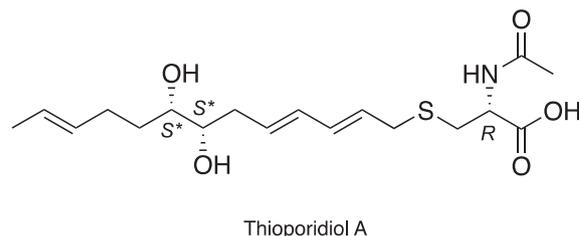


Fig. 7 The stereochemistry of thioporiol A

を用いたとき、8mmの阻止円を形成した。

糸状菌由来の二次代謝産物で、*N*-アセチルシステインを部分構造に有する物質の報告は、DNPで調べた限り、存在しない。放線菌では、*N*-アセチルシステインを部分構造に有する物質の報告は比較的多く、ナナオマイシンHのように、マイコチオールの一部として存在している (Nakashima *et al.*, 2017)。マイコチオールは、多くのアクチノバクテリアが生産していることが知られており、酸化ストレスに対する耐性に関与していると考えられている (Newton *et al.*, 1995)。糸状菌でも、*N*-アセチルシステインによるそのような作用を有することが考えられるが、その由来や役割などはまだ分かっておらず、今後の解明が期待される。

レプトチオニン

Leptobacillum leptobactrum FKI-7961株がF36SBM-AS培地で生産するFKI-7961A物質は、UV極大吸収207, 248, 288nm, $m/z=513.1313$ $[M+H]^+$ ($C_{25}H_{24}N_2O_8S$)の物性を示し、DNP検索の結果、これら物性と一致する既知物質はなく、新規含硫黄物質と推定された。そこで、FKI-7961株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製しFKI-7961A物質を6.3mg取得した。NMR解析の結果、Fig.8に示すシスタチオニン部分を部分構造に有する新規含硫黄物質であることが明らかとなり、生産菌の属名および部分構造からレプトチオニンと命名した。

レプトチオニンは、シスタチオニン部位に2つのキラル中心を有するため、絶対立体構造の検討を行った。レプトチオニンを加水分解後、生じたシスタチオンをラネーニッケルにより脱硫し、アラニンと2-アミノ酪酸の混合物を得た。次に、混合物をFDLAで修飾し、D, L-アラニンとD, L-2-アミノ酪酸もそれぞれFDLA修飾し、改良マーフィー法にてレプトチオニン由来のアラニンと

2-アミノ酪酸の立体構造を決定した。その結果、レプトチオニン由来の各アミノ酸はL-アラニンおよびL-2-アミノ酪酸であることが明らかとなったため (Fig.9)、レプトチオニンの絶対構造をFig.10のように決定した。

レプトチオニンの抗菌活性、細胞毒性、抗マalaria活性を評価した結果、6種の癌細胞、HL-60, THP-1, HeLa S3, A549, Panc1, HT-29, H1299に対し、それぞれ IC_{50} 18.1 ± 5.3 , 4.1 ± 0.4 , 33.0 ± 4.8 , 76.7 ± 8.5 , 52.6 ± 5.3 , 71.1 ± 8.2 , $87.7 \pm 6.9 \mu M$ で毒性を示した。

シスタチオニンは、メチオニンからシステインが合成される際の間体として知られている。これまでに、シスタチオニンを含む天然物の報告は1974年に報告されたエゾマイシン類のみである (Sakata *et al.*, 1974)。したがって、シスタチオニンを含む天然物の発見は、実に35年振りとなった。このように、MoS-screeningにより発見されたチオポリジオールやレプトチオニンは、非常にユニークな新規含硫黄物質であった。新規探索系の開発は、まだ見ぬ新規 (新奇) 物質の発見へと導いてくれるに違いない。

要 約

構造内に硫黄を含む天然物は、時にペニシリンのような強力な抗菌活性などを示すため、しばしば医薬品、農薬、試薬などに利用される。医薬品データベースであるKEGG MEDICUSによると、低分子医薬品の25%は硫黄を含んでいる。したがって、硫黄は重要な医薬品の構成元素である。そこで我々は、モリブデン酸化とLC/MSを組み合わせることにより、含硫黄物質の探索系を構築した (MoS-screening)。本報告では、その構築した方法と *Trichoderma polypori* FKI-7382および *Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961株より得られた2つの新規含硫黄物質について報告した。

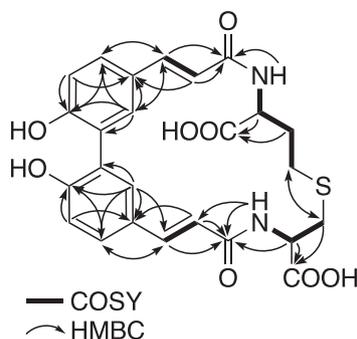


Fig. 8 1D and 2D NMR correlations of leptothonine

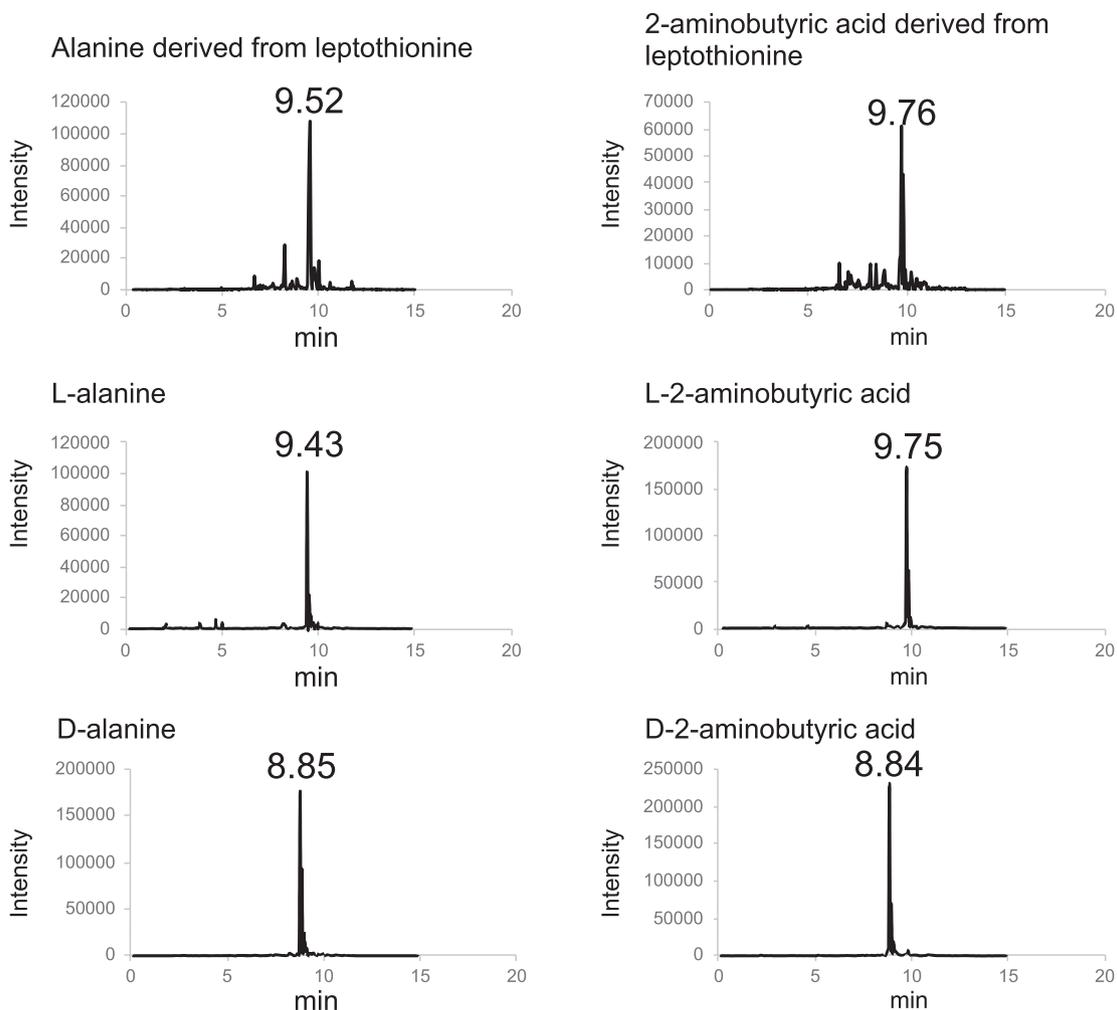


Fig. 9 LC/MS analyses of amino acids derived from 1 and standard preparation by advanced Marfey's method

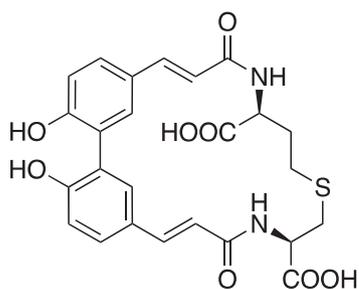


Fig. 10 Absolute structure of leptothionine

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Matsuo, H., Hanamure, Y., Miyano, R., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. The search for novel sulfur compounds using molybdenum-catalyzed oxidation with liquid chromatography-mass spectrometry. 3rd International Conference on Natural Products Discovery & Development in the Genomic Era, 12–16 Jan, San Diego, CA, USA.

原著論文

- 1) Matsuo, H., Hanamure, Y., Miyano, R., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Screening for sulfur compounds by molybdenum-catalyzed oxidation combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecules* **25**: 240.

- 2) Matsuo, H., Noguchi, Y., Miyano, R., Higo, M., Nonaka, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020. Thioporidiols A and B: two new sulfur compounds discovered by molybdenum-catalyzed oxidation screening from *Trichoderma polypori* FKI-7382. *Antibiotics* **9**: 236.

謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所の2014年度寄付講座助成により支援されたもので、この場を借りて感謝致します。NMRおよびMSを測定していただきました北里大学薬学部の佐藤倫子氏、長井賢一郎博士、モリブデン酸化についてご教授頂きました北里大学北里生命科学研究所の廣瀬友靖博士に深く感謝致します。また、本研究は当寄付講座に在籍した学生、北里生命研大村創薬グループの皆さんのご協力があったからこそ成し遂げられたもので、ここに感謝致します。

文 献

- Aroonsri, A., Kitani, S., Ikeda, H. & Nihira, T. 2012. Kitasetaline, a novel β -carboline alkaloid from *Kitasatospora setae* NBRC 14216T. *J. Biosci. Bioeng.* **114**: 56–58.
- Coyne, C. M. & Maw, G. A. 1964. The paper chromatography of aliphatic sulphonates. *J. Chromatogr.* **14**: 552–555.
- Freire, F., Calderoń, F., Seco, J.M., Fernández-Mayoralas, A., Quiñoá, E. & Riguera, R. 2007. Relative and absolute stereochemistry of secondary/secondary diols: low-temperature ^1H NMR of their bis-MPA esters. *J. Org. Chem.* **72**: 2297–2301.
- Hamill, R. L., Higgins, C. E., Boaz, H. E. & Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin: A new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* **49**: 4255–4258.
- Jeyakumar, K., Chakravarthy, R. D. & Chand D. K. 2009. Simple and efficient method for the oxidation of sulfides to sulfones using hydrogen peroxide and a Mo (VI) based catalyst. *Catal. Commun.* **10**: 1948–1951.
- Kajula, M., Ward, J.M., Turpeinen, A., Tejesvi, M.V., Hokkanen, J., Tolonen, A., Häkkänen, H., Picart, P., Ihalanen, J., Sahl, H-G., Pirttilä, A.M. & Mattila, S. 2016. Bridged epipolythiodiketopiperazines from *Penicillium raciborskii*, an endophytic fungus of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *J. Nat. Prod.* **79**: 685–690.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. & Hirakawa, M. 2010. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **38**: D355–360.
- Korte, F. & Vogel, J. 1962. Thin-layer chromatography of lactones, lactams and thiolactones. *J. Chromatogr.* **9**: 381–385.
- Kuramoto, M., Yamada, K., Shikano, M., Yazawa, K., Arimoto, H., Okamura, T. & Uemura, D. 1997. Tanzawaic acids A, B, C, and D: Inhibitors of superoxide anion production from *Penicillium citrinum*. *Chem. Lett.* **26**: 885–886.
- Matsuo, H., Hanamura, Y., Miyano, R., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T. 2020a. Screening for sulfur compounds by molybdenum-catalyzed oxidation combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecules* **25**: 240.
- Matsuo, H., Noguchi, Y., Miyano, R., Higo, M., Nonaka, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2020b. Thioporidiols A and B: two new sulfur compounds discovered by molybdenum-catalyzed oxidation screening from *Trichoderma polypori* FKI-7382. *Antibiotics* **9**: 236.
- Matsuo, H., Nakanishi, J., Noguchi, Y., Kitagawa, K., Shigemura, K., Sunazuka, T., Ōmura, S., Takahashi, Y. & Nakashima, T. 2020c. Nanaomycin K, a new epithelial-mesenchymal transition inhibitor produced by the actinomycete “*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*” OS-3966,” *J. Biosci. Bioeng.* **129**: 291–295.
- Mizushima, Y., Takeuchi, T., Kamisuki, S., Kuriyama, I., Sugawara, F. & Yoshida, H. Phenol compounds and their use for pharmaceutical compositions. 2012. DNA polymerase inhibitors, anti-cancer or anti-inflammatory agents, and food compositions. Japan patent JP2013–194048A. Mar 23.
- Nakabayashi, R., Sawada, Y., Yamada, Y., Suzuki, M., Yokota-Hirai, M., Sakurai, T. & Saito, K. 2013. Combination of liquid chromatography – fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry with ^{13}C -Labeling for chemical assignment of sulfur-containing metabolites in *Onion Bulbs*. *Anal. Chem.* **85**: 1310–1315.
- Nakashima, T., Kimura, T., Miyano, R., Matsuo, H., Hirose, T., Kimishima, A., Nonaka, K., Iwatsuki, M., Nakanishi, J., Takahashi, Y. & Ōmura, S. 2017. Nanaomycin H: A new nanaomycin analog. *J. Biosci. Bioeng.* **123**: 765–770.
- Newton, G. L., Bewley, C. A., Dwyer, T. J., Horn, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G., Davies, J., Faulkner, D. J. & Fahey, R. C. 1995. The structure of U17 isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its properties as an antioxidant thiol. *Eur. J. Biochem.* **230**: 821–825.
- Ōmura, S., Fujimoto, T., Otaguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H. & Sasaki, Y. 1991a. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neurogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot.* **44**: 113–116.
- Ōmura, S., Matsuzaki, K., Fujimoto, T., Kosuge, K., Furuya, T., Fujita, S. & Nakagawa, A. 1991b. Structure of lactacystin, a new metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J. Antibiot.* **44**: 117–118.
- Pollard, F. H., Nickless, G. & Burton, K. W. C. 1962. A spraying reagent for anions. *J. Chromatogr.* **8**: 507–509.
- Sakata, K., Sakurai, A. & Tamura, S. 1974. Isolation of novel anti-fungal antibiotics, ezomycins A₁, A₂, B₁ and B₂. *Arg. Biol. Chem.* **38**: 1883–1890.
- Tian, Y., Qin, X., Lin, X., Kaliyaperumal, K., Zhou, X., Liu, J., Ju, Z., Tu, Z. & Liu, Y. 2015. Sydoxanthone C and acremolin B produced by deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. *J. Antibiot.* **68**: 703–706.
- Trost, B. M. & Masuyama, Y. 1984. Chemoselectivity in molybdenum catalyzed alcohol and aldehyde oxidations. *Tetrahedron Lett.* **25**: 173–176.

エルゴステロール修飾シリカ (ESシリカ) を用いた新規物質の探索

松尾 洋孝, 中島 琢自

北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

The search for new compounds using ergosterol modified silica (ES silica)

Hiroataka Matsuo & Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan

Ergosterol is an essential component for fungal growth because it is included in fungal cell membranes and controls membrane fluidity. Antifungal drugs that target ergosterol, such as amphotericin B (a polyene compound), have been widely used to treat serious systemic fungal infections. Amphotericin B has been used clinically for more than five decades due to its potent fungicidal activity and relatively few examples of drug resistance. However, there are problems of medication methods by the drug's poor aqueous solubility. New antifungal drugs that improved physico-chemical properties and binding with ergosterol could give effective antifungal therapy more safely. Based on this concept, we developed silica-binding ergosterol (ES silica) resin and searched for natural products interacting with ergosterol from 859 actinomycete culture broths. The physico-chemical investigation in ES silica screening resulted in 94 known and 24 new compounds. It is suggested that not only polyene compounds but also various ones interact with ES silica. Heterocyclic compounds with nitrogen atoms such as piperazine and nucleic acid compounds were detected in multiple strains. Approximately 80 % of known compounds was microbial alkaloids. Dipyrimicins and Dietzamide C, new compounds interacted with ES silica, were discovered from culture extracts of *Amycolatopsis* sp. K16-0194 and *Streptomyces* sp. K16-0477, respectively. Dipyrimicins possess a 2,2'-dipyridine core skeleton. Dipyrimicin A, which is no interaction with ES silica, and B have the structural difference in carboxyl and amide groups. The amide group in dipyrimicin B could be the primary factor involved in the interaction with ES silica. Dietzamide C has a unique structure that possesses a *N,N,N*-trimethylpropan-1-aminium at the center of tetramic acid dimer.

Key words: Ergosterol, ES silica, new compounds, actinomycetes

緒 言

真菌症は水虫に代表される表在性真菌症, 皮膚の深部, 皮下組織に感染する深部真菌症と体の深部に感染する深在性真菌症に分けられる. 特に, 深在性真菌症は内臓真菌症といわれるように脳, 肺, 肝臓, 腎臓などの臓器に感染し, 診断が遅れた場合には重篤になる感染症である (山口, 2010a).

深在性真菌症の治療薬は1962年にポリエン系抗真菌

剤アンホテリシン B (AMPH-B) が臨床で使用され, 真菌症の治療が可能となった (Gold *et al.*, 1955-1956; Stiller *et al.*, 1955-1956; Tilley, 1962). *Streptomyces nodosus* が生産する AMPH-B は, 分子内にヘプタエンが存在し, この疎水領域が病原真菌の細胞膜の成分であるエルゴステロールと結合して細胞膜の透過性を高める. その結果, 細胞質成分の漏出を生じさせ, 抗真菌作用を発揮する (Abu-Salah, 1996). エルゴステロールは真菌細胞膜に普遍的に存在するので, AMPH-B はほぼすべての病原真菌に対して殺菌的に作用する (Kitajima, 2000).

近年, アゾール系やキャンディン系などの AMPH-B に代わる抗真菌剤が開発され臨床で用いられている. これら抗真菌剤は, AMPH-B に比べ狭域な抗真菌スペク

E-mail: matsu-h@lisci.kitasato-u.ac.jp, takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp

共同研究者: 高坂尚平 (富士シリシア化学株),

松本厚子 (北里大学北里生命科学研究所)

トルであり、細胞に取り込まれて真菌の重要な代謝系を阻害することにより抗真菌活性を発揮する。そのため、静菌的または代謝活性の高い細胞に対してのみ殺菌的効果を示す。一方、薬剤排出ポンプ (Bennett, 2004) などによる薬剤耐性菌の出現が問題視されている (Niimi & Niimi, 2009; 山口, 2010b)。

AMPH-Bは真菌の細胞膜に直接作用することで殺菌作用を示すため、耐性菌が生じにくい。一方、コレステロールとの選択性は完全なものではなく、投与時の発熱や悪寒、低カリウム血症や腎機能障害などの重篤な副作用を有する (Yamagishi & Mikamo, 2010)。さらに、水やエタノールに溶解しないため、経口投与ではほとんど吸収されない。エルゴステロールに結合し、適した物性を示す化合物を見出すことができれば、新たな抗真菌剤を開発が期待できる。

近年、二次代謝産物等の低分子化合物を極微量で網羅的に解析する技術が飛躍的に進歩し、多くの化合物を検出できるようになった。培養液抽出物に含まれている化合物のUV吸収スペクトル、分子量、分子組成、極性など物理化学的性状を収集し、外部の天然物データベース (Dictionary of Natural Products など) で検索することにより、ある放線菌の代謝産物の中に新規物質が含まれているかどうか予測できるようになった。この方法を physicochemical (PC) screening (Nakashima *et al.*, 2017; Takahashi & Nakashima, 2018) と称し、微生物代謝産物からの新規物質を探索した。PC screeningの一つとして、シリカゲルに生体低分子成分を修飾した樹脂を作製し、放線菌培養液からその生体成分と相互作用を示す化合物を抽出し、PC screeningで新規と推定した化合物を単離・構造決定する方法を考案した。本研究では、真菌の細胞膜構成因子で、AMPH-Bの標的分子であるエ

ルゴステロールをシリカゲルに修飾した樹脂 (ESシリカ) を作製し、ESシリカに結合する化合物を探索した。

実験材料と実験方法

ESシリカの作製

シリカゲルの表面の水酸基 (シラノール) にエルゴステロールを結合させたESシリカを富士シリシア化学(株)との共同研究で作製した。

シリカゲルにシランカップリング剤 (3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン) で処理してチオール修飾し、修飾したチオール基にエルゴステロールを反応させて固定化し、ESシリカを作製した。500 mLのセパラブルフラスコに20 gのシリカゲル (Chromatorex MB100-75/200, 富士シリシア化学) を入れ、トルエン 300 mLを加え、スラリーを攪拌しながら3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン 5.9 gを加えて窒素雰囲気還流条件下で80°Cで8時間反応させた。冷却後、生成物をトルエンおよびメタノールで洗浄した。さらに80°Cで12時間乾燥させ、チオール基を表面に有するシリカゲル (チオールシリカ) を21.5 g得た。次に、チオールシリカ 20 gを500 mLのセパラブルフラスコに入れ、1,4-ジオキサン 300 mLを加え、スラリーを攪拌しながら、エルゴステロールを4.0 g加えて完全に溶解させた後、ラジカル開始剤としてアゾビスイソブチロニトリルを80 mg加え、窒素雰囲気還流条件下で85°Cで14時間反応させた。冷却後、スラリーをろ過し、トルエン、テトラヒドロフランおよびメタノールで洗浄した。脱液し、80°Cで12時間乾燥させてエルゴステロール修飾シリカゲル (ESシリカ) を20.7 g得た (Fig. 1A)。

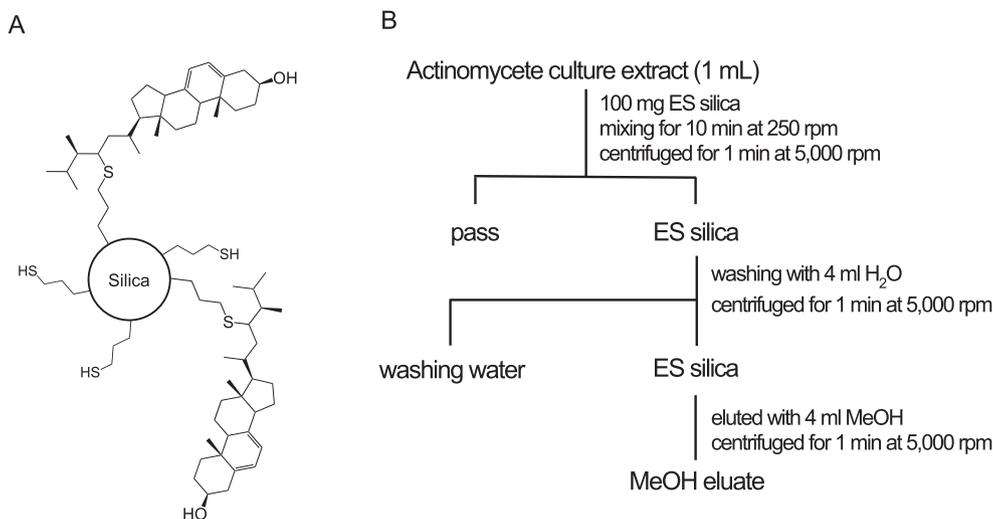


Fig. 1 Illustration of ES silica and screening flow.

放線菌培養液抽出物

スクリーニング源は、北里生命科学研究 微生物機能研究室で作製された放線菌培養液抽出物を使用した。放線菌用生産培地は 30 培地：2.4 % starch, 1.0 % glucose, 0.5 % yeast extract, 0.3 % meat extract, 0.3 % peptone, 0.4 % CaCO₃, 5 mL/L trace metals solution (0.1 % FeSO₄·7H₂O, 0.1 % MnCl₂·4H₂O, 0.1 % ZnSO₄·7H₂O, 0.1 % CuSO₄·5H₂O, 0.1 % CoCl₂·6H₂O), pH 7.0 を用いた。AMPH-B 生産のため、No.51 培地：0.5 % glucose, 0.5 % corn steep powder, 1.0 % oatmeal, 1.0 % pharmamedia, 0.5 % K₂HPO₄, 0.4 % MgSO₄·7H₂O, 1 mL/L trace metals solution (0.1 % FeSO₄·7H₂O, 0.1 % MnCl₂·4H₂O, 0.1 %

ZnSO₄·7H₂O, 0.1 % CuSO₄·5H₂O, 0.1 % CoCl₂·6H₂O), pH 7.0 を用いた。

LC/UV および LC/MS 測定条件

高速液体クロマトグラフィー (LC/UV) は ELITE LaChrome (日立ハイテクサイエンス) を使用した。LC/MS は LC に Agilent 1200 series (アジレントテクノロジー), 質量分析装置に QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System (エービー・サイエックス) および LC に ExionLC™ (エービー・サイエックス), 質量分析装置は TripleTOF® 5600+ System システム (エービー・サイエックス) を用いた。LC/MS の測定条件はそれぞれ Table 1 および 2 に記載した。

Table 1 LC/MS condition in QSTAR

Column	Inertsil® ODS-4 3.0 i.d. x 150 mm (GL science)
Eluate	5% MeOH + 0.1 % formic acid (0–5 min), 5–100% MeOH + 0.1 % formic acid (5–35 min), 100% MeOH + 0.1 % formic acid (35–40 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column Temp.	40°C
Detection	UV-Vis (200~600 nm), TOF-MS (m/z 100-2000)
Injection vol.	5 µL
Ionization mode	ESI positive
Ion spray voltage	5,500 V
Ion source gas	50 L/min
Curtain gas	30 L/min
Declustering Potential	50 V
Focusing potential	250 V
Temperature	450°C
Detector voltage	2300 V

Table 2 LC/MS condition in TripleTOF5600+ system

Column	Capcell Core C18 2.1φ x 100 mm (Osaka soda)
Eluate	5% MeOH in 0.1% formic acid (0 → 2 min); 5% → 100% MeOH in 0.1% formic acid (2 → 12 min); 100 % MeOH in 0.1% formic acid (12 → 14 min); detection, 254 nm.
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40°C
Detection	UV-Vis (200~600 nm), TOF-MS (m/z 100-2000)
Injection vol.	1 µL
Ionization mode	ESI positive
IonSpray Voltage Floating	5,500 V
Ion source gas 1	50 psi
Ion source gas 2	50 psi
Curtain gas	25 psi
Declustering Potential	80 V
temperature	500°C
Collision Energy	45 V
Collision Energy Spread	15 V
Ion Release Delay	30 µs
Ion Release Delay Width	15 µs

ES シリカスクリーニング

スクリーニングの流れを Fig.1B に示す. 放線菌培養液抽出物 1mL を水で平衡化した ES シリカ 300mg に供した. 4mL の水で洗浄の後, 4mL のメタノールで溶出した. このメタノール溶出画分を 4 倍濃縮して ES シリカ処理サンプルを取得した. このサンプルを LC/UV-MS で解析し, ES シリカと相互作用を示す化合物の物理化学的性状 (UV 吸収スペクトル, 分子量, 分子組成, 極性など) を収集した. 各 ES シリカ処理サンプルの LC/UV-MS データを解析し, 得られた情報をもとに天然物データベース (Dictionary of Natural Products, DNP) およびインハウスデータベースで検索し, 既知物質の同定および新規物質を探索した. 新規と推定された化合物は精製し, 構造解析を行った.

生物活性評価

抗菌活性試験は, ペーパーディスク法で測定した. 真菌として *Candida albicans* ATCC 64548, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Mucor racemosus* IFO 4581, グラム陽性菌としてとして *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, グラム陰性菌としてとして *Escherichia coli* NIHJ, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* KB 88 を検定菌とした.

細胞毒性試験は, Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて行った. ヒト子宮頸部類上皮癌細胞 HeLa S3, ヒト結腸腺癌細胞 HT29, ヒト肺腺癌基底上皮腺癌細胞 A549, ヒト肺腺癌細胞 H1299, ヒト膵臓腺癌 PANC-1, ヒト急性単球性白血病細胞 THP-1, ヒト T 細胞性白血病細胞 Jurkat, ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いた.

結果および考察

ES シリカスクリーニング系の確立

AMPH-B 生産菌 *Streptomyces* sp. K04-0037 株培養液抽出物を用いて, 結合・溶出試験を行った. ES シリカ 100mg に K04-0037 株培養液抽出物 1mL をチャージし, 4mL の水で洗浄後, 4mL のメタノールで溶出した. さらに, 4mL の 1mM エルゴステロール含有メタノール溶液で溶出させた. ES シリカ通過画分, 水洗浄画分, メタノール溶出画分およびエルゴステロール含有メタノール溶出画分を LC/UV で分析した. その結果を Fig.2 に示す. 樹脂量に対しチャージしたサンプル量が過剰だったため, ES シリカ通過画分に AMPH-B のピークが確認された. 水洗浄画分には AMPH-B のピークが確認されず, メタノール溶出画分に AMPH-B のピークが確認された. また, 1mM エルゴステロールメタノールで溶出した画分にはわずかに AMPH-B が検出された

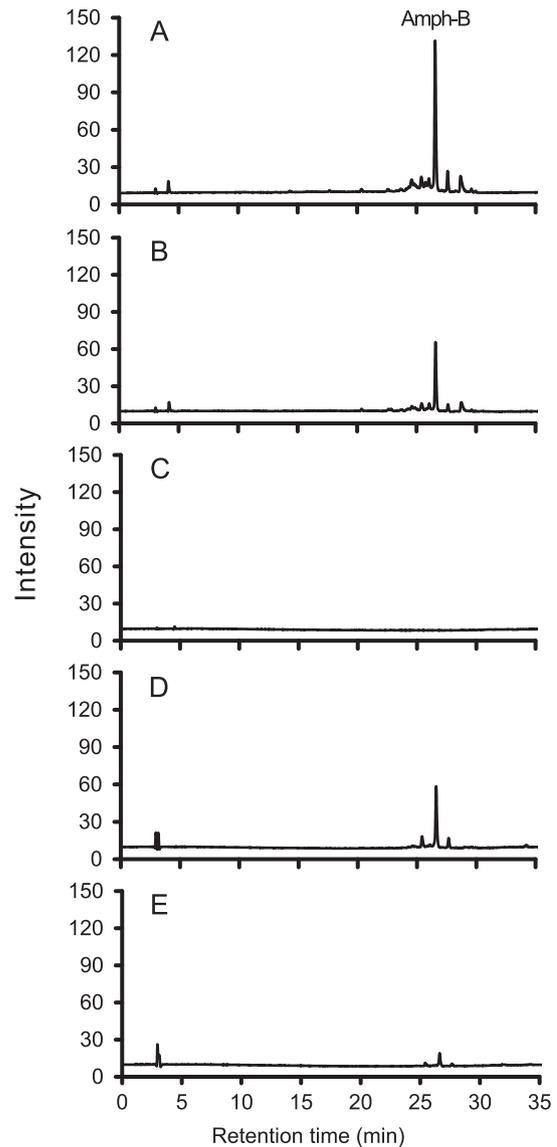


Fig. 2 LC/UV analysis of fractions treated with ES silica using culture extract including AMPH-B. Fifty percent EtOH extract (A) of *Streptomyces* sp. K04-0037 strain, AMPH-B producer, was subjected on ES silica. And then pass (B), washing with water (C), eluting with MeOH (D), and eluting with MeOH with 1mM ergosterol fractions (E) were analyzed by LC/UV. LC conditions are as follows: Inertsil ODS-4 (3×250mm); 5% → 100% MeOH in 0.1% formic acid (0→30min); 100% MeOH in 0.1% formic acid (30→35min); detection, 254nm.

ことから, 放線菌培養液に含まれている AMPH-B は ES シリカに結合し, メタノールで溶出することがわかった.

ESシリカスクリーニング

放線菌培養液抽出物 859 サンプルを ES シリカで処理し、ES シリカ処理サンプルを LC/UV-MS で解析した。化合物の物理化学的性状のデータをもとにデータベースで検索した結果、104 株から 94 化合物 (重複を含めると 167 化合物) を既知物質と同定した。もっとも多く 11 株の放線菌から生産が確認できたピロリジン含有ペプチド化合物タンブロマイシン類の同定について例を示す。放線菌 K18-0349 株の培養液抽出物および ES シリカ処理サンプルの LC/UV クロマトグラムを Fig. 3A および 3B に示す。ES シリカ処理することで、溶出時間 7.7 分、8.1 分および 8.4 分に 3 本のピークが観察された。これら 3 化合物は UV スペクトルが類似していることから類縁体であることが示唆された (Fig. 3B)。溶出時間 7.7 分は Na 付加体である m/z 558.1726 が観察され、親イオンを m/z 536.1931 $[M+H]^+$ と決定した (Fig. 3C)。溶出時間 8.1 分および 8.4 分の化合物も同様に親イオンをそれぞれ m/z 796.3394 $[M+H]^+$ および m/z 435.1499 $[M+H]^+$ と決定した。DNP で MS 値を 535.18 ~ 535.20 および UV 極大吸収を 280 nm ~ 320 nm の範囲で検索した結果、ジャドマイシン DNV ($C_{29}H_{29}NO_9$, Dupuis *et al.*, 2011) とタンブロマイシン A ($C_{24}H_{30}ClN_5O_7$, Izumikawa *et al.*, 2015; Goering *et al.*, 2016) の 2 件がヒットした。溶出時間 7.7 分の化合物の同位体ピーク $[M+H]^+ + 2$ (m/z 538) は親イオン (m/z 536) の約 30% の高さであることから、1 分子の塩素を含んでいることがわかる。よって、溶出時間 7.7 分の化合物は、塩素を含んでいるタンブロマイシン A と推定した。最終的に、2 つの MS/MS フラグメントイオン (m/z 263 および m/z 417) が一致し、既知物質タンブロマイシン A と同定した (Fig. 3D)。溶出時間 8.1 分および 8.4 分の化合物についても同様に検索した結果、溶出時間 8.1 分および 8.4 分の化合物は、それぞれタンブロマイシン C および B (Fig. 3E, Goering *et al.*, 2016) と同定した。

既知物質を同定した結果、ポリエン系化合物は、AMPH-B、ストレベルテン A やフィリピン III など 11 化合物が検出された。ポリエン系化合物以外にも様々な構造を有する化合物が同定できた。部分構造にヒドロキシサム酸を有する化合物トリコスタチン類は複数の株の代謝産物から検出された。ピペラジン構造を有するマレマイシン類やグリセオルテイン酸など、核酸系化合物サンギバマイシン類やシネファンギンなど窒素を含む複素環式化合物が多く検出され、既知物質 94 化合物のうち、75 化合物が微生物アルカロイドだった。

ES シリカで処理したメタノール溶出液に多くのポリエン系化合物が検出されることから、ES シリカのエルゴステロール分子を認識していることがわかった。一方、

ES シリカはチオールシリカにエルゴステロールを修飾させ、作製している。シリカに修飾したエルゴステロール量はシリカ 1g あたり約 $50 \mu\text{mol}$ であり、シリカ表面はチオール基が残存した状態である。検出された多くの微生物アルカロイドは、この残存したチオール基と相互作用を示している可能性があり、今後の検討が必要である。

ESシリカスクリーニングによる新規物質の探索

ES シリカを用いたスクリーニングの結果、29 化合物が新規物質と推定された。そのうち、新規性や生産性の再現などを考慮し、*Amycolatopsis* sp. K16-0194 株 (Izuta *et al.*, 2018) および *Streptomyces* sp. K16-0477 株が生産する推定新規物質の単離・精製を行った。

Amycolatopsis sp. K16-0194 の培養液抽出物には溶出時間 19.2 分および 20.1 分にピークが観察されたが、ES シリカで処理すると溶出時間 19.2 分のピークは消失し、溶出時間 20.1 分のピークが観察された (Fig. 4A)。2 つのピークは共に UV 極大吸収 240 nm および 320 nm を示し (Fig. 4B)、類縁物質と推定された。溶出時間 19.2 分の化合物 (ジピリマイシン A と命名) は、 m/z 247.0714 $[M+H]^+$ ($C_{12}H_{10}N_2O_4^+$) を示した。一方、溶出時間 20.1 分の化合物 (ジピリマイシン B と命名) は、 m/z 246.0771 $[M+H]^+$ ($C_{12}H_{11}N_3O_3^+$) を示した。

Amycolatopsis sp. K16-0194 を 6L の 30 培地で 9 日間培養し、培養上清と菌体に濾別した。その菌体をメタノールで抽出し、その抽出物をダイヤイオン HP-20 および ODS クロマトグラフィーで処理し、類縁体ジピリマイシン A を 86.7 mg 精製した。ジピリマイシン B は、培養上清を酢酸エチルで抽出し、その抽出物を ES シリカで処理し、目的物ジピリマイシン B を 16.6 mg 精製した。その精製フローを Fig. 5 に示す。

ジピリマイシン A および B の物理化学的性状を Table 3 に示す。HRESI-MS スペクトルによりジピリマイシン A は分子量 246、分子式 $C_{12}H_{10}N_2O_4^+$ (測定値: m/z 247.0714, 理論値: m/z 247.0719)、ピリマイシン B は分子量 245、分子式 $C_{12}H_{11}N_3O_3^+$ (測定値: m/z 246.0884, 理論値: m/z 246.0879) と推定した。ジピリマイシン A および B は、水、メタノールおよびエタノールに可溶であった。IR スペクトルではジピリマイシン A および B に存在するカルボン酸およびアミドのカルボニル炭素と酸素の二重結合由来の 1670 cm^{-1} のピークとカルボン酸およびアミドの酸素および窒素と水素の結合由来の 3300 cm^{-1} 付近のピークが観察された。また、融点ではジピリマイシン A は 112°C 、ジピリマイシン B は 84°C (decomp.) を示した。

ジピリマイシン A および B の NMR 解析の結果、構造内にピリジンが 2 つ結合したジピリジン骨格をコア構造

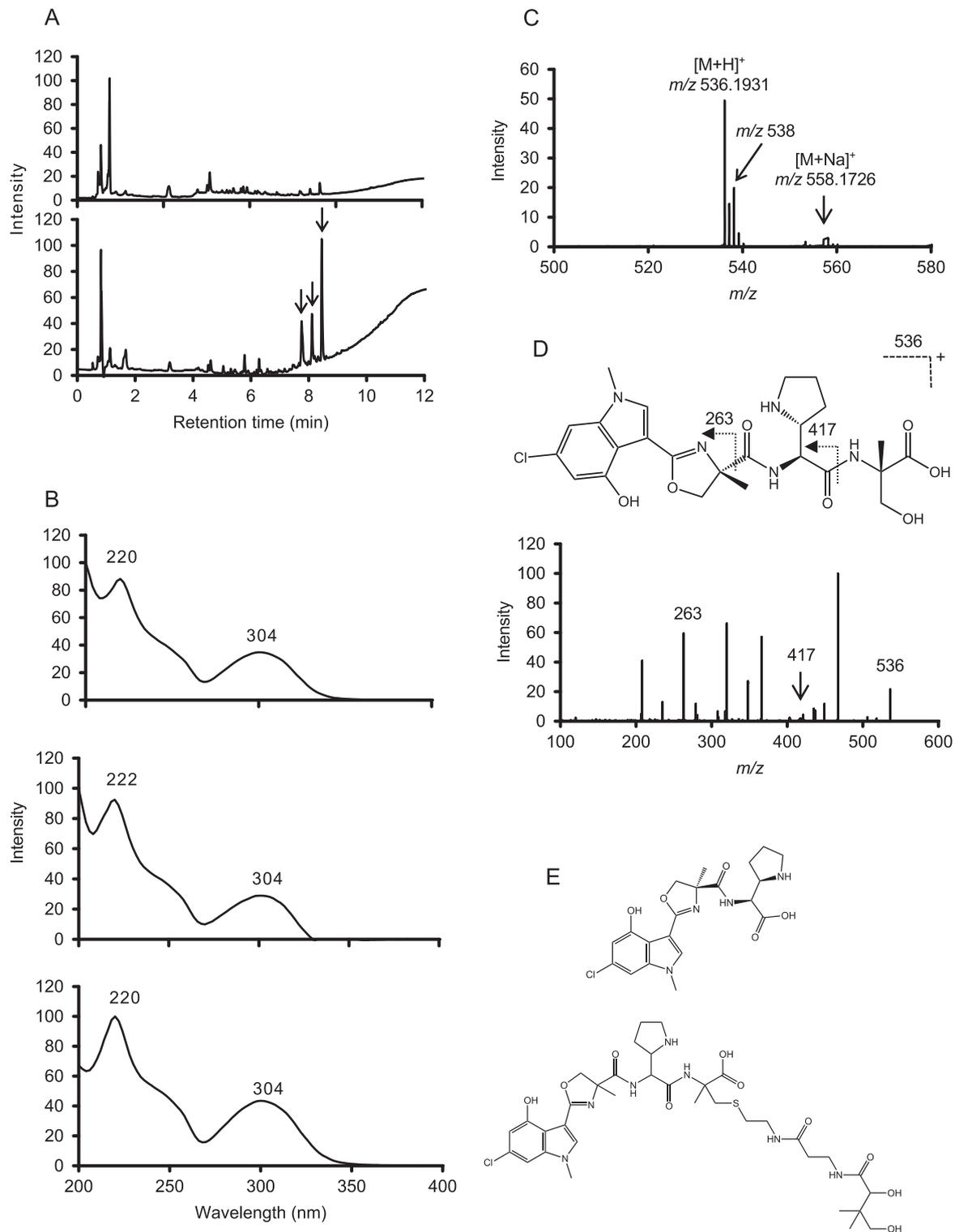


Fig. 3 Identification process of known compounds in ES silica screening. A, HPLC charts of culture extract of *Streptomyces* sp. K04-0037 (top) and MeOH eluate treated with ES silica (bottom); B, UV spectra of compounds eluted at 7.7 min (top), 8.1 min (middle) and 8.4 min (bottom); C, MS spectrum of compound 7.7 min; D, MS/MS spectrum of compound 7.7 min; E, Structures of tambromycin B (top) and C (bottom). LC conditions are as follows: Capcell Core C18 (2.1 ϕ x 100mm); 5% MeOH in 0.1% formic acid (0 \rightarrow 2 min); 5% \rightarrow 100% MeOH in 0.1% formic acid (2 \rightarrow 12 min); 100% MeOH in 0.1% formic acid (12 \rightarrow 14 min); detection, 254 nm.

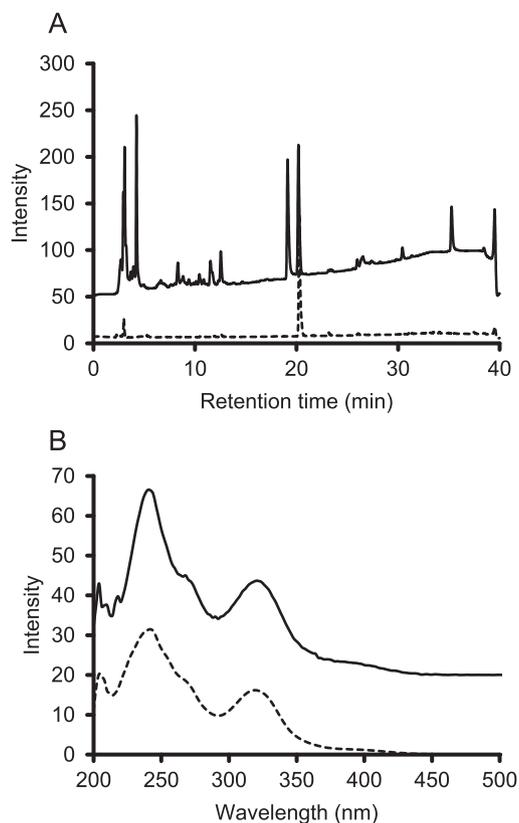


Fig. 4 Analysis of *Amycolatopsis* sp. K16-0194 metabolites. A, HPLC chart of culture extract of *Amycolatopsis* sp. K16-0194 (—) and MeOH eluate treated with ES silica (----); B, UV spectra of compounds eluted at 19.2 min (—, dipyrimicin A) and 20.1 min (----, dipyrimicin B). LC conditions are as follows: Inetsil ODS-4 (3 × 250 mm); 5 % → 100 % MeOH in 0.1 % formic acid (0 → 30 min); 100 % MeOH in 0.1 % formic acid (30 → 35 min); detection, 400 nm.

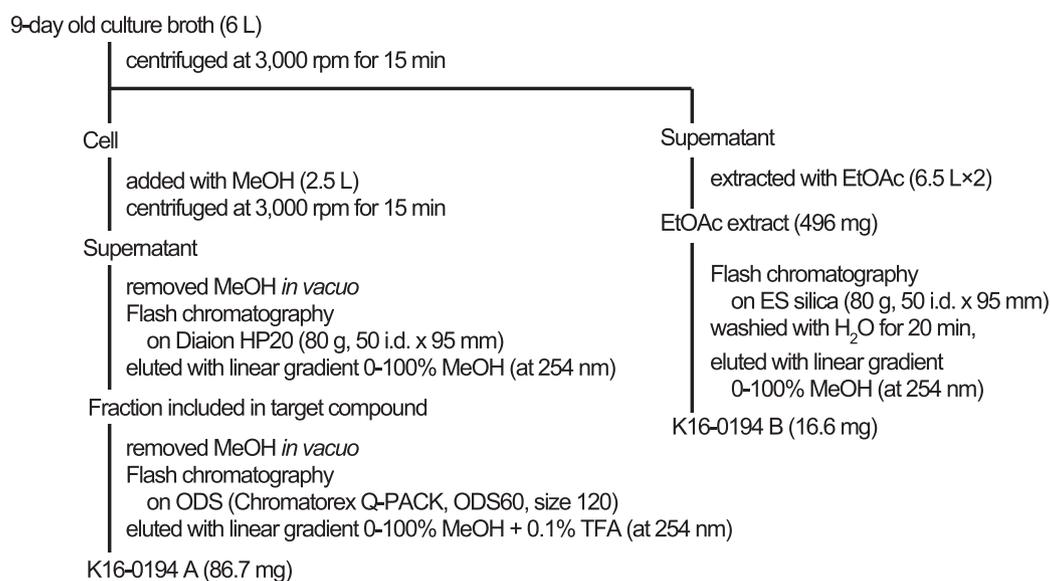
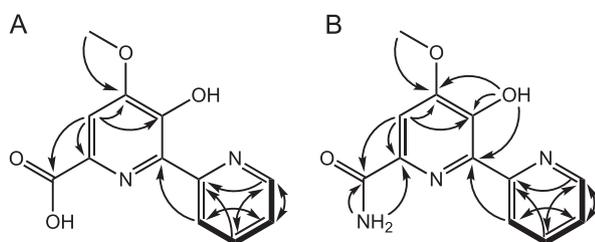


Fig. 5 Purification of dipyrimicin A and B.

Table 3 Physical and chemical data of dipyrimicin A and B.

	Dipyrimicin A	Dipyrimicin B
Appearance	Yellow powder	Yellow powder
Molecular formula	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₃
Molecular weight	246.2	245.2
ESI-MS (<i>m/z</i>)		
Calcd.	247.0719 (C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₄)	246.0879 (C ₁₂ H ₁₂ N ₃ O ₃)
Found	247.0714	246.0884
UV λ _{max} (MeOH) nm (ε)	204 (9,232), 241 (10,427), 269 (4,851), 318 (5,005)	204 (5,093), 242 (4,366), 294 (1,962)
IR ν _{max} ^{KBr} cm ⁻¹	3259, 1670, 1523, 1461, 1265	3340, 1670, 1577, 1473, 1403, 1272
Melting point	111.2–113.8 °C	decomp. 82.8–84.6 °C
Solubility		
Soluble	H ₂ O, MeOH, EtOH	H ₂ O, MeOH, EtOH
Insoluble	acetone, chloroform	acetone, chloroform

**Fig. 6** Structures of dipyrimicin A and B isolated from a culture broth of *Amycolatopsis* sp. K16-0194. Bold line, ¹H-¹³C COSY; arrows, ¹H-¹³C HMBC.

に有していた (Fig. 6). 側鎖に違いがあり, ジピリマイシン A はカルボン酸, ジピリマイシン B はアミドを有していた. ジピリマイシン B をチオールシリカ (ES シリカ作製の際にエルゴステロールを固定化する前のシリカ) に供すると水洗浄画分に検出され, 吸着しなかったことから, ジピリマイシン B はエルゴステロールに結合していることが示唆された.

ジピリマイシン A および B の抗菌活性および細胞毒性を測定した. その結果を Table 4 に示す. ジピリマイ

Table 4 Biological activities of dipyrimicin A and B.

Tested microorganisms	Dipyrimicin A		Dipyrimicin B	
	100 μg	30 μg	100 μg	30 μg
<i>Candida albicans</i> ATCC 64548	11*	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	26	16	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	-	-	-	-
<i>Mucor racemosus</i> IFO 4581	18	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	27	18	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	22	19	-	-
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	23	16	12	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> KB 88	27	21	-	-

*Numbers represent clear zone (mm) of growth inhibition (paper disk, φ 6 mm)

Cytotoxic activity

Cell lines	Dipyrimicin A	Dipyrimicin B
HeLa 3S	5.1 ± 0.5**	24.6 ± 13.9
HT29	6.2 ± 0.3	72.1 ± 27.0
A549	4.3 ± 0.2	>100
H1299	9.2 ± 0.5	6.8 ± 3.3
Panc1	9.4 ± 3.5	>100
THP-1	4.3 ± 0.6	>100
Jarkat	4.4 ± 0.5	>100
HL-60	3.9 ± 0.7	>100

**IC₅₀ values (μM)

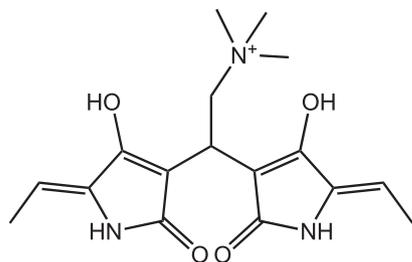


Fig. 7 Structure of dietziamide C

シンAは*A. niger* ATCC 6275 以外の真菌に対して、抗菌・抗真菌活性を示し、動物細胞株に対して10 μ M以下でIC₅₀値を示した。一方、ジピリマイシンBは、*E. coli* NIHJに対して弱い抗菌活性を示し、動物細胞株に対してジピリマイシンAより弱かった。ただし、H1299細胞に対して同等以上の細胞増殖抑制活性を示した。

Streptomyces sp. K16-0477の培養液抽出物にUV極大吸収270nmおよびHRESI-MSより m/z 334.1751を示し、分子組成C₁₇H₂₃N₃O₄と推定した化合物が含まれていた。本物質は、テトラミン酸の2量体で5位にプロパ-1-エンが結合し、*N,N,N*-トリメチルエチルアミニウムがテトラミン酸2量体の中心に結合した構造であった (Fig. 7A)。テトラミン酸のダイマー化合物は、希少放線菌 *Dietzia timorensis* MZ-3株から発見されたジエトジアミドAおよびBの報告 (Hoshino *et al.*, 2015) があり、本物質をジエトジアミドCと命名した (未報告)。ジエトジアミドCは抗菌活性および細胞増殖抑制活性は示さなかった。

AMPH-Bは真菌細胞膜成分エルゴステロールと結合し、イオンチャネルを形成することで膜障害を引き起こし、殺菌作用を示す (Borowski & Cybulska, 1967)。一方、Gray *et al.*, (2012)はAMPH-Bの水酸基をクロスカップリングで欠如させた誘導体を作製し、酵母に対する抗真菌活性を評価した。水酸基をはずした誘導体は、酵母からカリウムイオンの流出は認められなかったが、抗真菌活性を示した。この結果は、AMPH-Bは生理的に重要なエルゴステロールに結合することによって抗真菌活性を発揮することを示唆している。チャネル形成はAMPH-Bの抗真菌活性に必須ではなく、膜透過性を亢進させ、薬剤の感受性を相補的に向上させている。

しかし、ジピリマイシンBやジエトジアミドCはESシリカに結合するが、抗真菌活性は示さなかった。ジピリマイシンBやジエトジアミドCはAMPH-Bと比較して分子量が小さい。ゆえに、エルゴステロールと結合してもその生理的な機能は失わず、生育できるのかもしれない。

要 約

真菌の膜成分であるエルゴステロールは膜の流動性に関わり、生命維持に必須な膜成分である。ポリエン系抗真菌剤アンホテリシンBは強力な抗真菌活性を示し、薬剤への耐性化が起りにくいため、深在性真菌症の治療薬として50年以上使用されている。しかし、アンホテリシンBは水に対する溶解性が悪く、薬剤投与方法など様々な問題がある。アンホテリシンBの標的であるエルゴステロールと結合する化合物は、新たな抗真菌剤として期待できる。

このコンセプトをもとに、シリカゲルにエルゴステロールを修飾させた樹脂 (ESシリカ) を作製した。放線菌培養液抽出物からESシリカと結合する化合物を探索し、放線菌培養液抽出物859サンプルから既知物質94化合物を同定し、推定新規物質29化合物を見出した。

既知物質は、ポリエン化合物だけでなく、様々な化合物がESシリカに結合することがわかった。また、ピペラジン化合物や核酸系化合物など窒素を含む複素環式化合物が多く検出された。既知物質94化合物のうち75化合物が微生物アルカロイドだった。

ESシリカと結合する新規物質は、*Amycolatopsis* sp. K16-0194が生産するジピリマイシンBと *Streptomyces* sp. K16-0477が生産するジエトジアミドCが得られた。ジピリマイシンBはコア骨格にジピリジン構造を有する化合物であった。ESシリカ非結合物質である類縁体ジピリマイシンAは側鎖にカルボン酸、ジピリマイシンBは側鎖にアミド基が結合した構造的違いがあった (Fig. 6)。このことから、ESシリカに結合するためには、アミドが重要であることが示唆された。ジエトジアミドCは *N,N,N*-トリメチルエチルアミニウムがテトラミン酸2量体の中心に結合したユニークな構造であった。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 伊豆田祥子, 宮野怜, 松本厚子, 三浦宏美, 野中健一, 高橋洋子, 大村智, 中島琢白. 2017. エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索. 日本放線菌学会第32回大会 9月7-8日. 長野
- 2) 伊豆田祥子, 高坂尚平, 河合真ら. 2018. エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索. 日本農芸化学会2018年度大会 3月15-18日. 名古屋
- 3) Nakashima, T. 2018. Search for new microbial metabolites by physicochemical screening using new resin, ES-silica. Microbial Natural Products: Discovery of Novel Compounds and Biosynthetic Pathways. 27 November, Bangkok, Thailand
- 4) 伊豆田祥子, 宮野怜, 松本厚子, 高橋洋子, 大村智, 中島琢白. エルゴステロール修飾シリカゲルの特徴と新規化合物の

探索. 日本放線菌学会第34回大会 9月23-24日. 札幌

- 5) Izuta, S., Kosaka, S., Suda, M., Kanchanasin, P., Suzuki, Y., Miyano, R., Matsuo, H., Tanasupawat, S., Takahashi, Y., Omura, S. & Nakashima, T. 2020. Search for new compounds from actinomycetes using ES silica. 3rd Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era. 12-16 January, San Diego, USA

原著論文

- 1) Izuta, S., Kosaka, S., Kawai, M., Miyano, R., Matsuo, H., Matsumoto, A., Nonaka, K., Takahashi, Y., Ōmura, S. & Nakashima, T. 2018. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. *J. Antibiot.* **71**: 535-537.

その他 (特許)

- 1) 大村智, 中島琢自, 高橋洋子, 河合真, 高坂尚平, 本田博文. 2016. エルゴステロール修飾担体, 抗真菌剤の候補物質のスクリーニング方法, 及び抗真菌剤の原料の精製方法. 特開2018-4603 (富士シリシア化学株式会社, 学校法人北里研究所)

謝 辞

本研究は, 公益財団法人発酵研究所の2014年寄付講座助成により支援されたもので, この場を借りて感謝致します. NMRおよびMSを測定していただきました北里大学薬学部の佐藤倫子氏, 長井賢一郎博士に深く感謝致します. また, 本研究は当, 富士シリシア化学(株)寄付講座に在籍した学生, 北里生命研大村創薬グループの皆さんのご協力があったからこそ成し遂げられたもので, ここに感謝致します.

文 献

- Abu-Salah, K.M. 1996. Amphotericin B: an update. *Br. J. Biomed. Sci.* **53**: 122-133.
 Bennett, J.E., Izumikawa, K. & Marr, K.A. 2004. Mechanisms of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1773-1777.
 Borowski, E. & Cybulska, B. 1967. Potassiumless death of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with *N*-succinyl perimycin and the reversal of fungicidal action of the antibiotic by potassium ions. *Nature* **213**: 1034-1035.
 Dupuis, S.N., Veinot, T., Monro, S.M., Douglas, S.E., Syvitski, R.T., Goralski, K.B., McFarland, S.A. & Jakeman, D.L. 2011.

- Jadomycins derived from the assimilation and incorporation of norvaline and norleucine. *J Nat Prod.* **74**: 2420-2424.
 Goering, A.W., McClure, R.A., Doroghazi, J.R., *et al.*, 2016. Metabologenomics: Correlation of microbial gene clusters with metabolites drives discovery of a nonribosomal peptide with an unusual amino acid monomer. *ACS Cent. Sci.* **2**: 99-108.
 Gold, W., Stout, H.A., Pagano, J.F. & Donovick, R. 1955-1956. Amphotericins A and B. antifungal antibiotics produced by a streptomycete. 1. *In vitro* studies. *Antibiotics Annu.* **3**: 579-586.
 Gray, K.C., Palacios, D.S., Dailey, I., Endo, M.M., Uno, B.E., Wilcock, B.C. & Burke, M.D. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**: 2234-2239.
 Hoshino, S., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Okada, M. & Abe, I. 2015. Dietziamides, novel tetramic acid dimers from *Dietzia timorensis* MZ-3 with antioxidative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**: 3953-3955.
 Izumikawa, M., Kawahara, T., Kagaya, N., Yamamura, H., Hayakawa, M., Takagi, M., Yoshida, M., Doi, T. & Shin-ya, K. 2015. Pyrrolidine-containing peptides, JBIR-126, -148, and -149, from *Streptomyces* sp. NBRC 111228. *Tetrahedron Lett.* **56**: 5333-5336.
 Izuta, S., Kosaka, S., Kawai, M. *et al.*, 2018. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. *J. Antibiot.* **71**: 535-537.
 Kitajima, Y. 2000. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus; cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. *Jpn. J. Med. Mycol.* **41**: 211-217.
 Nakashima, T., Takahashi, Y. & Ōmura S. 2017. Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. *Biochem. Pharmacol.* **134**: 42-55.
 Niimi, K. & Niimi, M. 2009. The mechanisms of resistance to echinocandin class of antifungal drugs. *Jpn. J. Mycol.*, **50**: 57-66.
 Stillier, E.T., Vandeputte, J. & Wachtel, J.L. 1955-1956. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot. Annu.* **3**: 587-591.
 Takahashi, Y. & Nakashima, T. 2018. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics* **7**: pii: E45.
 Tilley, J.C. 1962. Clinical efficacy of amphotericin B lotion in the treatment of various cutaneous monilial infections. *J. La. State. Med. Soc.* **114**: 433-435.
 Yamagishi, Y. & Mikamo, H. 2010. Retrospective investigation on the cases treated with liposomal amphotericin B. *Jpn. J. Antibiot.* **63**: 347-364.
 山口英世 2010a. 真菌感染症. 臨床と微生物, **37**: 351-355.
 山口英世 2010b. 真菌の薬剤耐性化の現状は? そして今後は? モダンメディア, **56**: 119-138.

PC screening を活用した放線菌ゲノムからの 新規物質探索および生合成研究

稲橋 佑起, 中島 琢自

北里大学北里生命科学研究所創薬資源微生物学寄付講座

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

Search for new compounds from actinomycete genome using PC screening and their biosynthetic study

Yuki Inahashi, Takuji Nakashima

Laboratory of Microbiology for Drug Discovery,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108-8641, Japan

Genome mining of actinomycetes has revealed several uncharacterized biosynthetic gene clusters with potential of new secondary metabolites. It is known that actinomycetes harbor much more biosynthetic gene clusters than the compounds they produce. We employed both physicochemical (PC) screening and genetic approach to discover new compounds from actinomycetes and performed three experiments in this study. 1) we screened a unique biosynthetic gene, which was involved in aminovinylcysteine (AviCys) biosynthesis, from actinomycete strains in the Kitasato Microbial Library using a PCR method. Then those actinomycetes were characterized their production of new bioactive compounds by LC/MS analysis. As the results, two new AviCys compounds were discovered from "*Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis*" AM-3603 and *Streptomyces nitrosporeus* K93-0711. 2) positive pathway-specific regulator genes were selected from the genome sequence of actinomycetes and overexpressed in the corresponding hosts to achieve new metabolites. As the result, two new lipopeptides were discovered from *Streptomyces* sp. KO-7888. 3) biosynthetic gene clusters of trehangelin, actinoallolide and pyrizomicin, which were discovered by PC screening, were identified using heterologous expression. Furthermore, we revealed the biosynthetic pathway from acetyl-CoA to angelyl-CoA in trehangelin biosynthesis.

Key words: aminovinylcystein, transcriptional regulator, biosynthesis, heterologous expression

緒 言

微生物は酵素反応により有機合成では合成困難な化合物を効率よく生産する。特に放線菌の二次代謝産物は多様性に富んだ構造を有し、アミノビニルシステインやビニルアゾキシ等のユニークな構造の化合物が報告されており、それらは癌やMRSA、結核菌、線虫等に対しての活性が報告されている (Sit *et al.*, 2011)。しかし、その様な化合物の発見例はごく僅かであり、医薬品への応用に至っていないものが殆どである。近年、遺伝子工学の急速な発展により放線菌のゲノム解析が進み、様々な

化合物の生合成遺伝子が明らかとなってきた。従来は生物活性を指標に新規物質の探索が行なわれていたが、放線菌のゲノム情報から二次代謝産物の生合成遺伝子を探索することで、新規物質や目的の構造を有する物質を効率良く取得することが可能になってきている。

一方、放線菌のゲノムには、菌株によって30以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有することが明らかとなっているが (Nett *et al.*, 2009)、殆どの生合成遺伝子クラスターは休眠状態にある。放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子の発現を活性化するレギュレーターとして *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP) や large ATP-binding regulators of the LuxR family (LAL family) といったタンパク質が知られており (Bibb, 2005)、レギュレーター遺伝子を導入し、休眠状態の生

E-mail: y-ina@lisci.kitasato-u.ac.jp, takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp
共同研究者：葛山智久 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

合成遺伝子クラスターを目覚めさせることで、スタンボマイシンなどの新規物質が発見されている (Laureti *et al.*, 2011).

本編では、放線菌ゲノムからの生合成遺伝子の探索(いわゆるゲノムマイニング)とPC screeningを組み合わせることで新規物質の取得を試みた。具体的には、ユニークな骨格であるアミノビニルシステイン系化合物の探索およびレギュレーター遺伝子を利用した新規物質の探索について報告する。さらに、PC screeningにより得られた新規物質トレハンジェリン、アクチノアロライドおよびピリゾマイシンの生合成研究について報告する。

実験方法

探索源

放線菌ゲノムからのアミノビニルシステイン系化合物の探索には、北里生命科学研究所微生物機能研究室より提供された放線菌768株を使用した。レギュレーター遺伝子発現による新規物質探索には *Streptomyces* sp. KO-7888株(フィトキサゾリン生産菌)を使用した。生合成遺伝子クラスター解析には *Polymorphospora rubra* K07-0510株(トレハンジェリン生産菌)、*Actinoallomurus fulvus* K09-0307株(アクチノアロライド生産菌)および *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216株(マンダロマイシン、ピリゾマイシン生産菌)を使用した。

アミノビニルシステイン系化合物の探索

アミノビニルシステイン(AviCys)はアミノ基とチオール基がビニレンを介して結合したユニークな構造を有する化合物である。AviCys系化合物を放線菌ゲノムよりPCRを用いて探索するために、*Streptomyces* sp. OH-4156株が生産するAviCys系化合物であるサイペマイシンのAviCys合成酵素であるCypD(Claesen & Bibb, 2010a)およびそのオルソログであるGrmD(Claesen & Bibb, 2010b)の遺伝子塩基配列よりAviCys合成遺伝子の特異プライマーを設計した(Table 1)。放線菌768株より、菌体をTris-EDTA buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)に懸濁し超音波で10分間処理することでDNAを抽出し、Taq DNA polymerase(ニュー・イングランド・バイオラボ)を用いて、熱変性:95℃ 10秒、アニーリング:52℃ 30秒、伸長:68℃ 1分を35サイクル行うことでPCRを行い、目的の遺伝子を保有する菌株をスクリーニングした。ヒットした菌株についてはサイペマイシンの前駆体ペプチドをコードする *cypA* (Claesen & Bibb, 2010a)と相同な遺伝子の塩基配列を解析することで、その構造を推定した。

ゲノムシーケンスからの生合成遺伝子クラスターの探索

ドラフトゲノムシーケンスをantiSMASH(Medema *et al.*, 2011)で解析することで、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索を行なった。antiSMASHでヒットしない遺伝子に関してはLocal BLASTを用いて、相同な生合成遺伝子を検索することで遺伝子クラスターの探索を行なった。

生合成関連遺伝子のクローニングおよび発現株作製

Table 1のプライマーを用いて、Phusion High-Fidelity DNA polymerase(ニュー・イングランド・バイオラボ)にて、熱変性:95℃ 10秒、アニーリング:68℃ 30秒、伸長:72℃ 1分の反応を35サイクル行うことで各種生合成関連遺伝子を増幅後、放線菌用発現ベクターpOSV556(Prof. Gregory. L. Challis, Warwick University, UK)あるいは大腸菌用発現ベクターpET15b(シグマアルドリッチ)にクローニングした。放線菌用ベクターについては、エレクトロポレーションにより *E. coli* ET12567/pUZ8002に導入後、接合伝達により放線菌宿主(*Streptomyces albus* J1074, *S. coelicolor* M1152または *S. lividans* TK24)へ導入することで遺伝子発現株を作製した。

生合成酵素の機能解析

生合成遺伝子をクローニングしたpET15bを *E. coli* BL21(DE3)にエレクトロポレーションで導入後、LB培地で培養し、IPTGでタンパク質の発現誘導した。培養液から菌体を回収し、超音波により菌体を破碎することで、タンパク質を溶出させた。生産されたHis 6-組換えタンパク質をNiカラムで精製後、各基質と反応させることでその機能解析を行った。

ゲノムのコスミドライブラリー作製および生合成遺伝子クラスターの取得

生合成遺伝子クラスターのサイズが30kb以上でPCRによる増幅が困難な場合は、放線菌ゲノムのコスミドライブラリーを以下の方法で作製し、生合成遺伝子クラスターの取得を行った。コスミドベクターpOJ446(Bierman *et al.*, 1992)のBamHI消化物および放線菌ゲノムDNAのMboI部分消化物をライゲーションさせ、LAMBDA INN(ニッポンジーン)を使用してパッケージングを行った後、*E. coli* XL1 Blue MRF'へ導入することでコスミドライブラリーを作製した。

コスミドライブラリーからの生合成遺伝子クラスターの探索は、遺伝子クラスターの左端、真中、右端をそれぞれ特異的に増幅させるプライマー(Table 1)を用いて行なった。PCRはTaq DNA polymerase(ニュー・イ

ングランド・バイオラボ)にて、熱変性：95℃ 10秒、アニーリング：59℃ 30秒、伸長：68℃ 1分の反応を35サイクルで行なった。取得したコスミドに生合成遺伝子クラスターの全領域が含まれていない場合は、複数のコスミドから切り出した領域およびPCRで増幅させた領域をGibson Assembly (Gibson *et al.*, 2009)によって繋ぎ合わせることで、クラスターの全領域を含むベクターを作製した。

培養および培養液のLC/MS解析

生産培地にはNo.43培地(5% maltose, 1.5% dry yeast, 2.5% ebios, 1% KBr, 0.05% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH7.0), No.43-2培地(No.43培地のmaltoseを0.5%に変えた組成), YD培地(1% yeast extract, 1% glucose, pH未調整), No.58培地(0.5% glucose, 5.0% soluble starch, 0.3% CaCO₃, 1.0% dry yeast, 1.0% 脱脂小麦胚芽, pH未調整)を使用した。生産培地に種培養液を1%となるように植菌し、27℃で6日間振とう培養した。生産培養後、培養液に等量のエタノールを加え、菌体成分を抽出し、3,000rpmで10分間

遠心分離し、上清を回収し、QSTAR Elite Hybrid LC/MS/MS System (ABサイエックス)を用いてLC/MS解析した。

レギュレーター遺伝子発現による新規物質探索では、レギュレーターの発現により生産誘導される物質の物理化学的性状を天然物データベース Dictionary of Natural Productsで検索することでその新規性を予測した。

単離精製および構造解析

培養液をHP20, シリカゲルおよびODSカラムクロマトグラフィーで粗精製し、分取HPLCにより単離した。得られた物質についてQSTAR (ABサイエックス)を用いて高分解能質量分析およびMS/MSフラグメント解析を行い、Agilent 400-MR DD2 (アジレント・テクノロジー)を用いて各種NMR解析を行うことにより、その平面構造を決定した。また、改良マーフィー法によりアミノ酸の絶対立体配置を決定した。

生物活性評価

抗菌活性試験は、グラム陽性菌として *Bacillus subtilis*

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence
<i>Screening primer for AviCys synthetic gene</i>	
<i>cypD</i> -64F	CGCTCGTGCCGTGGTGGAT
<i>cypD</i> -416R	TTGCTCTCGACGATCTCGTT
<i>Heterologous expression of trehangelin biosynthetic gene</i>	
<i>thgHIJK</i> -F	AAAGGGCTGCAGAGGAGGCGTACCGTGACCCGACCCGG
<i>thgHIJK</i> -R	AAAGGGAGGCCTGCTCAGCCCAGGCCGTAG
<i>Functional analysis of trehangelin biosynthetic enzyme</i>	
<i>thgH</i> -F	AAAGGGCATATGGTGACCCGACCCGGACGCC
<i>thgH</i> -R	AAAGGGGGATCCTCAGTCATCGGCGCGGAA
<i>thgI</i> -F	AAAGGGCATATGTCGACCTCGACGGTG
<i>thgI</i> -R	AAAGGGCTCGAGTCACCTCACGCAGTTGGA
<i>thgK</i> -F	AAAGGGCATATGGTGACCCGCGGTACGGGC
<i>thgK</i> -R	AAAGGGCTCGAGTCAGCCCAGGCCGTAGCC
<i>Screening for actinoallolide biosynthetic gene cluster</i>	
<i>aal</i> -LF	CCAAGAAGTGCGCAATTCCC
<i>aal</i> -LR	CATGGGCGTTTCTCCGCAT
<i>aal</i> -CF	AGAAGCTCCGTGAACACCTG
<i>aal</i> -CR	CGCGTAGTCGTGGTACATCA
<i>aal</i> -RF	CGGTACCGGCGGCTGCTC
<i>aal</i> -RR	CCTCCCCGCCACCTCCAC
<i>Screening for pyrizomicin biosynthetic gene cluster</i>	
<i>pyr</i> -LF	CGCCTTCAAGAACGACAAGT
<i>pyr</i> -LR	CTTCGGACAATCCTGTGGTC
<i>pyr</i> -CF	CACGGTGAACATCCTGTGCTG
<i>pyr</i> -CR	GAGCAGGTCGTCCAGCAAC
<i>pyr</i> -RF	ACAGAATCCCAGTGGTGGAC
<i>pyr</i> -RR	TCCAACAGTTGACTGCGTTT

Underlines indicate PstI (CTGCAG), StuI (AGGCCT), NdeI (CATATG), BamHI (GGATCC) or XhoI (CTCGAG) site.

KB-211, *Kocuria rhizophila* KB-212 を, グラム陰性菌として *Escherichia coli* KB-213, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KB-88 を, 真菌として *Candida albicans* KF-1, *Mucor racemosus* KF-233 を用いた.

結果および考察

放線菌ゲノムからのアミノビニルシステイン系化合物の探索

AviCys 生合成遺伝子をターゲットとし, 放線菌 768 株に対して PCR でスクリーニングを行なった結果, “*Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis*” AM-3603 株 (イルマイシン生産菌) および *Streptomyces nitrosporeus* K93-0711 株 (マジンドリン生産菌) の 2 株がヒットした. ヒットした 2 株について前駆体ペプチドをコードする *cypA* に相同な遺伝子の塩基配列解析を行なった結果, サイペマイシンと比較して, AM-3603 株では 8 番目の Val が Ala に, K93-0711 株では 13 番目の Ile が Val に置き換わっていた (Fig.1). AviCys でこのような配列のペプチドの報告はなく, AM-3603 株および K93-0711 株はそれぞれ分子量 2067 および 2081 の新規 AviCys を生産することが示唆された.

AM-3603 株および K93-0711 株の培養液を LC/MS 解析した結果, それぞれ No.43 培地および No.43-2 培地培養液より推定した分子量を示す化合物 AM-3603A および K93-0711A の生産が確認された. 大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製し AM-3603A および K93-0711A を 0.2mg および 9.0mg 取得した. 高分解能質量分析および MS/MS フラグメント解析の結果, AM-3603A および K93-0711A を Fig.1 に示す構造と決定した. 抗菌活性試験の結果, AM-3603A および K93-0711A は *K. rhizophila* KB-212 に対して活性を示した.

構造的にユニークな AviCys に着目し, PCR ならびに

LC/MS 解析を組み合わせた手法で探索した結果, 放線菌 768 株より AviCys 生産菌 2 株を効率良く選択することができた. この手法は AviCys 以外にも幅広く適用でき, 今後, PC screening 等で発見された新規骨格物質の類縁体探索にも応用したい.

レギュレーター遺伝子発現による新規物質探索

Streptomyces sp. KO-7888 株のゲノムより 16 個のレギュレーター遺伝子を選択し, それぞれ pOSV556 にクローニング後, KO-7888 株に導入した. レギュレーター発現株の培養液を LC/UV および LC/MS 解析した結果, SARP family 転写制御因子発現株である *Streptomyces* sp. KO-7888/pOSV556::*speR* の YD 培養液においてコントロールにはない化合物ピーク 2 本 (KO-7888A および KO-7888B) を検出した. 両ピークとも UV 極大吸収 268 nm, 分子量はそれぞれ 920 および 934 であり, Dictionary of Natural Products 検索した結果, 該当する化合物は無く, 新規物質と推定された.

Streptomyces sp. KO-7888/pOSV556::*speR* を大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーで単離精製し, KO-7888A および KO-7888B を 6.9mg および 12.9mg 取得した. 高分解能質量分析により, KO-7888A は $m/z = 921.4106$ $[M+H]^+$ ($C_{47}H_{60}N_4O_{15}$), KO-7888B は $m/z = 935.4356$ $[M+H]^+$ ($C_{48}H_{62}N_4O_{15}$) であった. MS/MS フラグメント解析, NMR 解析および改良マーフィー法によるアミノ酸分析により, 脂肪酸側鎖にグリシン, グリシン, 3-ヒドロキシアスパラギン酸, L-チロシン, L-スレオニンおよび D-ロイシンおよび 3-ヒドロキシアスパラギン酸アミドが縮合した新規リポペプチドと決定した (Fig.2). SARP family 転写制御因子の発現により得られた物質からサーペプチン A および B と命名した. サーペプチン A および B の抗菌活性試験を行なった結果, いずれの検定菌に対しても活性を示さなかった.

二次代謝産物生合成遺伝子の発現を制御するレギュ

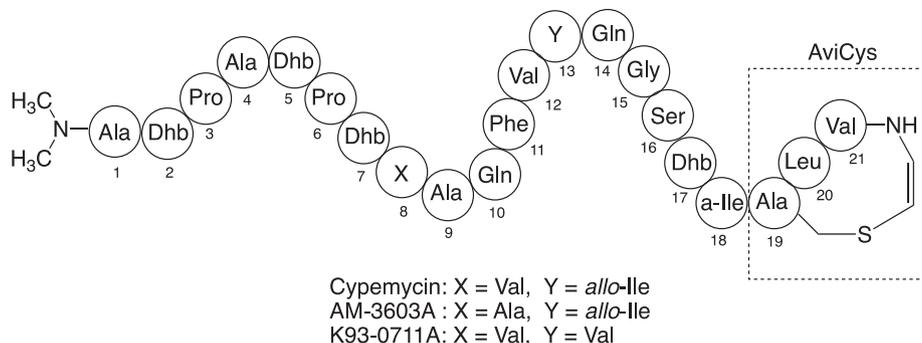


Fig. 1. Structures of cypemycin, AM-3603A and K93-0711A.

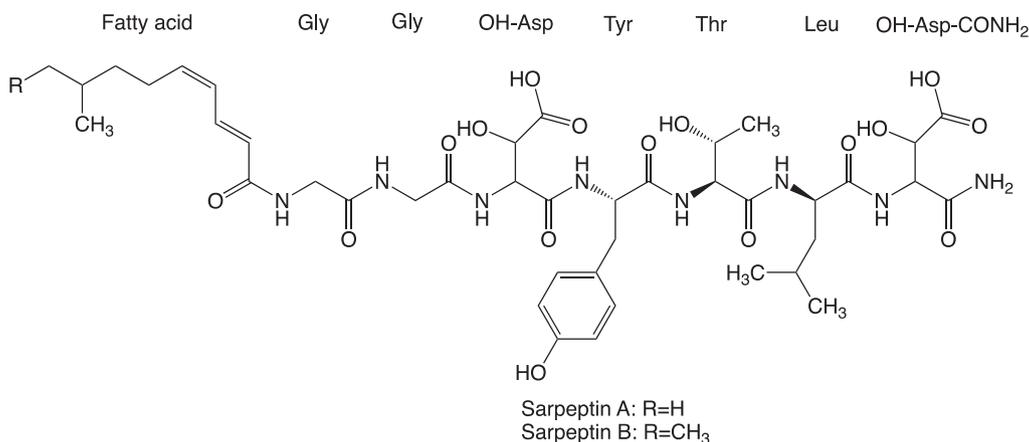


Fig. 2. Structures of sarpeptins A and B.

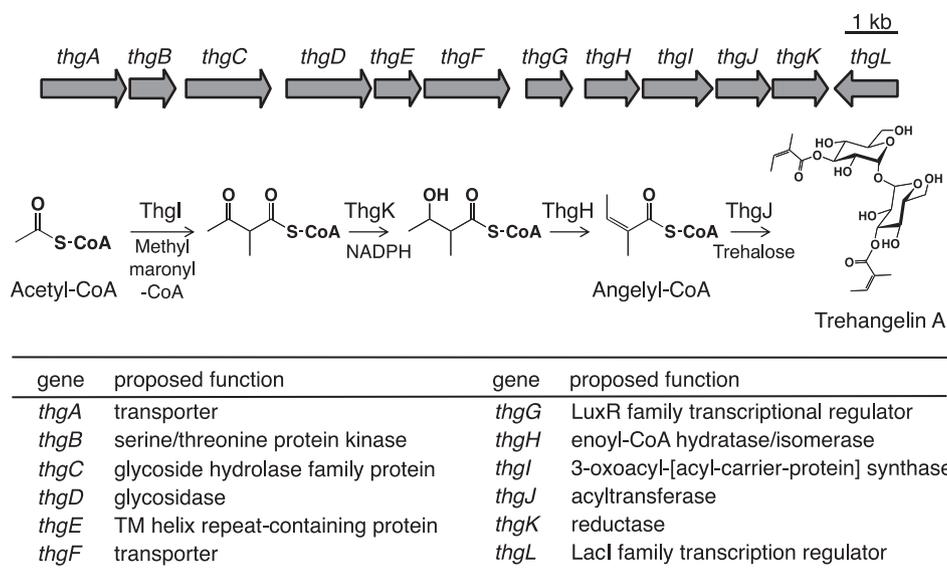


Fig. 3. Gene cluster and proposed pathway for trehangelin biosynthesis.

レーター遺伝子の発現と PC screening を組み合わせることで、新規物質サーペプチン A および B を取得した。今後、様々な生物活性評価系にて評価を行うことで生物活性が見出されることを期待する。

トレハンジェリン生合成遺伝子クラスターの同定

トレハンジェリンは *P. rubra* K07-0510 株が生産するトレハロースに 2 分子のアンジェリカ酸が縮合した新規物質である (Nakashima *et al.*, 2013)。アンジェリカ酸はカモミールなどの植物成分として有名であるが、アンジェリカ酸を有する微生物由来天然物はトレハンジェリンと SF2575 のみであり、Pickens *et al.* (2009) により SF2575 の生合成遺伝子クラスターが報告されている。

Local BLAST を用いて K07-0510 株のドラフトゲノムシーケンスから SF2575 のアンジェリル CoA 合成酵素と推定されるタンパク質 (SsfN, K, J) と相同性の高いタンパク質を含む遺伝子クラスターを検索することで、トレハンジェリン生合成遺伝子クラスターを推定した。本遺伝子クラスターは 16kb の DNA 領域からなり、12 種類の遺伝子が含まれていた (Fig. 3)。その内、アンジェリル CoA 合成酵素およびアンジェリル CoA 転移酵素と推定される遺伝子 (*thgH, I, J, K*) を PCR で増幅後、放線菌の発現用ベクター pOSV556 にクローニングし、*S. albus* J1074 株に導入した。遺伝子導入株をトレハロース含有 YD 培地で培養し、培養液を LC/MS 解析したところ、トレハンジェリンの生産が確認されたため、当該遺

伝子クラスターをトレハンジェリン生合成遺伝子クラスターと同定した。さらに、それぞれの組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、Niカラムで精製後、その機能解析を行った結果、ThgI, KおよびHが順次反応することにより、メチルマロニル CoA からアンジェリル CoA が合成されることを確認した (Fig.3)。アンジェリカ酸の生合成に関する報告は複数あるものの (Basey & Woolley, 1973; McGaw & Wooley, 1979), それらは推定のみで、今回の結果が酵素によるアンジェリル CoA 生合成経路の初の証明となる。

アクチノアロライド生合成遺伝子クラスターの同定

アクチノアロライドは *A. fulvus* MK10-036 株および K09-0307 株が生産する抗トリパノソーマ活性を示すマクロライド化合物である (Inahashi *et al.*, 2015)。K09-0307 株のドラフトゲノムシーケンスを antiSMASH で解析することで、アクチノアロライド生合成遺伝子クラスターを推定した。推定されたアクチノアロライド生合成遺伝子クラスターは約 50kb の DNA 領域からなり、I 型ポリケチド合成酵素 (PKS) やシトクロム P450 を含む 7 種類の遺伝子から構成されていた (Fig.4)。コスミドライブラリーより得られた遺伝子クラスターの一部

と PCR 産物を連結させることでアクチノアロライド生合成遺伝子クラスターの全領域を含むベクターを作製した。得られたベクターを接合伝達により *S. coelicolor* M1152 へと導入し、作製した放線菌を YD 培地で培養し LC/MS 解析した結果、アクチノアロライドの生産が確認された。以上の結果より当該遺伝子クラスターをアクチノアロライド生合成遺伝子クラスターと同定した。アクチノアロライドは I 型 PKS によりポリケチド鎖が合成された後に、12 員環ラクトン形成ならびに P450 による 5 員環ヘミアセタール形成によって合成されることが推測される (Fig.4)。

ピリゾマイシン生合成遺伝子クラスターの同定

ピリゾマイシンは *L. aerocolonigenes* K10-0216 が生産するピリジン環とチアゾール環が連結した特徴を有する化合物であり (Kimura *et al.*, 2018), 生合成経路の報告はない。K10-0216 株のドラフトゲノムシーケンスを antiSMASH で解析することで、ピリゾマイシン生合成遺伝子クラスターを推定した。推定されたピリゾマイシン生合成遺伝子クラスターは約 40kb の DNA 領域からなり、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) および PKS 等の 16 種類の遺伝子を含有しており、ピリゾマイ

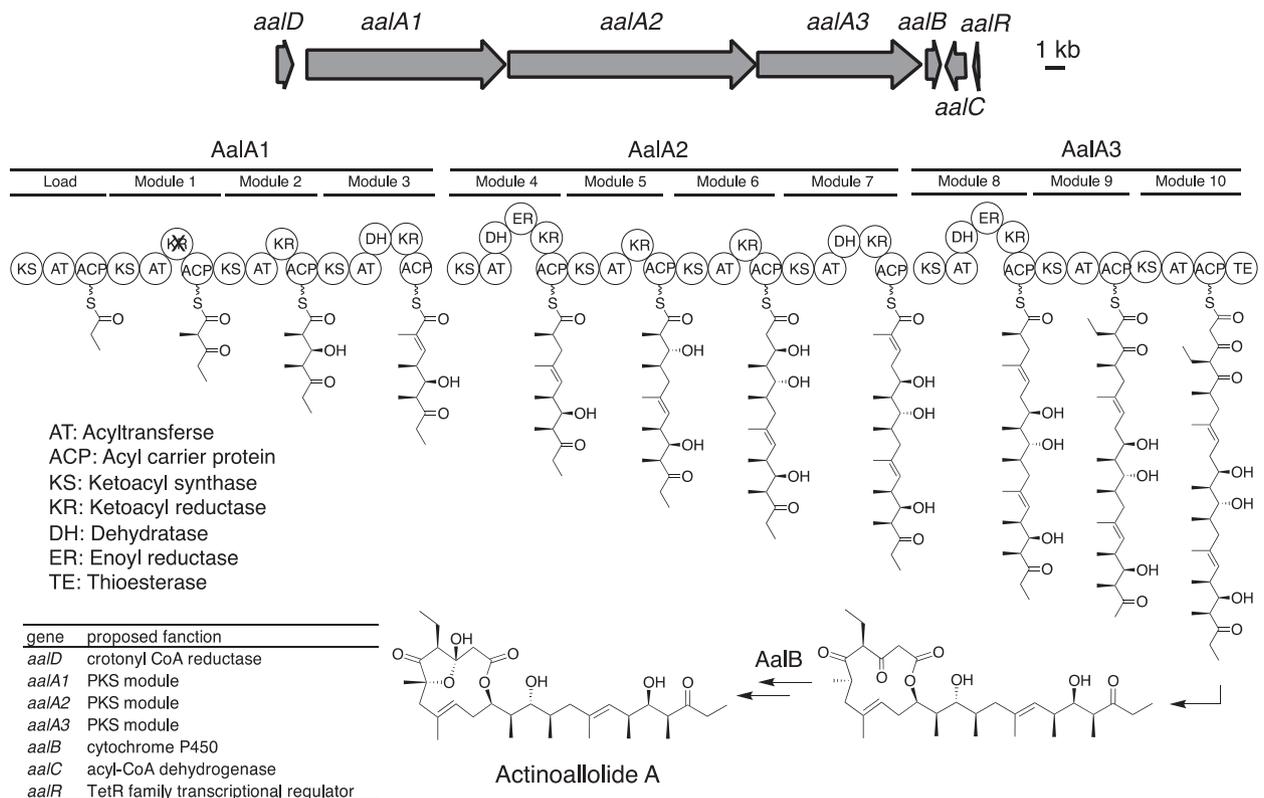


Fig. 4. Gene cluster and proposed pathway for actinoallolide biosynthesis.

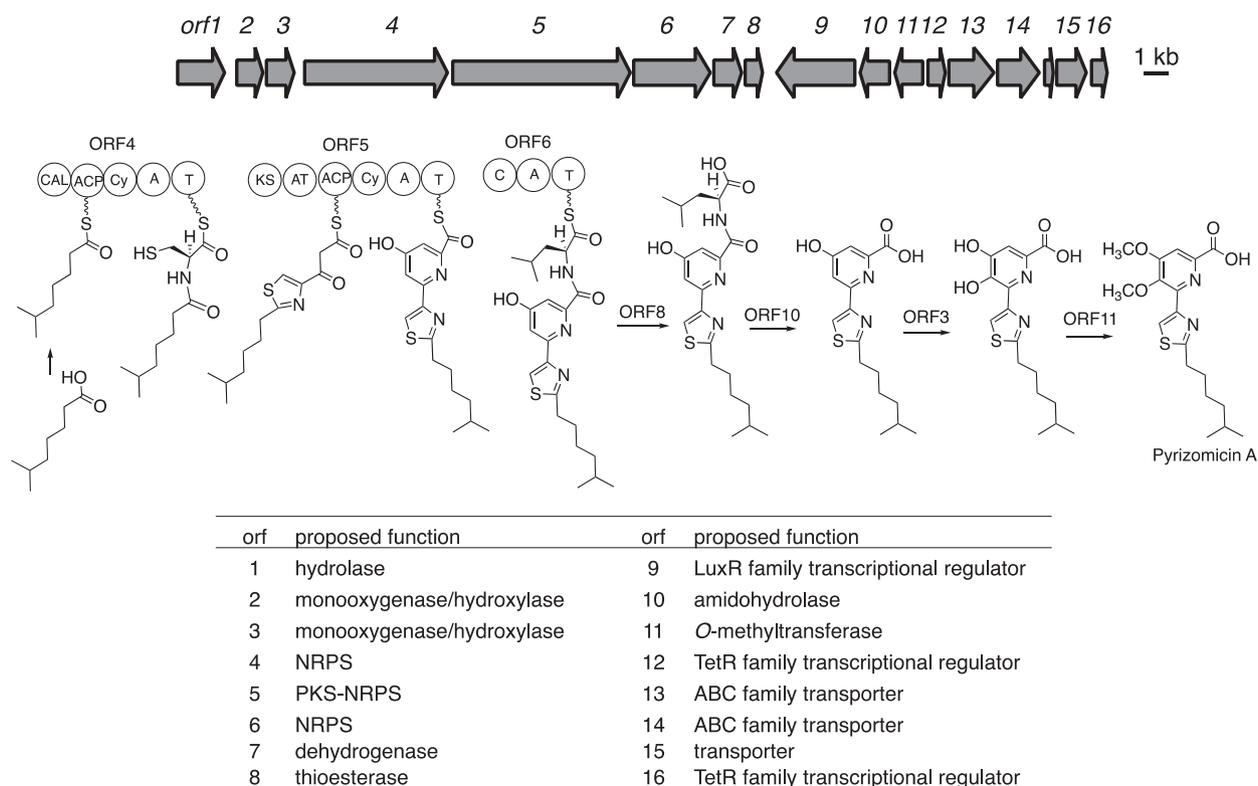


Fig. 5. Gene cluster and proposed pathway for pyrizomicin biosynthesis.

シンは脂肪酸をスターターとし、システイン2分子、マロニル CoA およびロイシンを基質に合成されることが示唆された (Fig. 5). コスミドライブラリーより得られた遺伝子クラスターの一部と PCR 産物を連結させることでピリゾマイシン生合成遺伝子クラスターの全領域を含むベクターを作製した. また, 当該遺伝子クラスターに含まれる LuxR family 転写制御因子の遺伝子を発現用ベクターに別途クローニングした. 得られたベクターを *S. lividans* TK24 へと導入し, 作製した放線菌を No. 58 培地で培養し LC/UV 解析した結果, 当該遺伝子クラスターのみ導入した株ではピリゾマイシンの生産が確認されなかった一方, 遺伝子クラスターと転写制御因子を共発現させた株においてピリゾマイシンおよびその類縁体である AFA0320 物質 (菅原ら, 1999) の生産が確認された (Fig. 6). 以上の結果より当該遺伝子クラスターがピリゾマイシン生合成遺伝子クラスターであり, その発現はクラスター内の LuxR family 転写制御因子により正に制御されていることが明らかとなった. ピリゾマイシンのピリジン環およびチアゾール環の形成については未解明なため, 今後, 遺伝子破壊や酵素反応によりその生合成機構が解明されることを期待する.

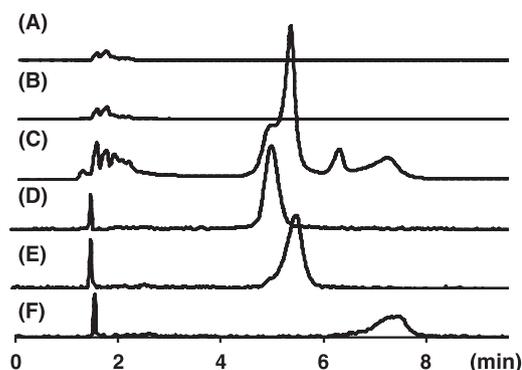


Fig. 6. The LC/UV chromatogram of pyrizomicin production. (A) the cultured broth of TK24 introduced the empty vector, (B) the cultured broth of TK24 introduced pyrizomicin biosynthetic gene cluster, (C) the cultured broth of TK24 introduced pyrizomicin biosynthetic gene cluster and co-expressed with the transcriptional regulator, (D) pyrizomicin A, (E) AFA0320, (F) pyrizomicin B.

要 約

放線菌のゲノム情報より新規物質生合成に関わる未知の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索が可能となってきた。菌株によって30以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有することが明らかとなっているが、殆どの生合成遺伝子クラスターは休眠状態にある。本研究では、放線菌ゲノムからの生合成遺伝子の探索とPC screeningを組み合わせて、新規物質の取得を試みた。まず、ユニークな骨格であるアミノビニルシステインの生合成遺伝子を放線菌768株から探索することで“*Streptomyces subflavus* subsp. *irumaensis*” AM-3603株および*S. nitrosporeus* K93-0711株よりサイペマイシン新規類縁体を発見した。次に、*Streptomyces* sp. KO-7888株よりレギュレーター遺伝子を利用した新規物質探索を行うことで新規リポペプチド、サーペプチン類を発見した。最後に、PC screeningにより得られた新規物質の生合成研究を行い、トレハンジェリン、アクチノアロライドおよびピリゾマイシンの生合成遺伝子クラスターを同定した。さらに、トレハンジェリンの生合成におけるアンジェリルCoAの生合成経路を特定した。

本助成で得られた研究成果の報告

原著論文

- 1) Inahashi, Y., Shiraishi, T., Palm, K. *et al.* 2016. Biosynthesis of trehangelin in *Polymorphospora rubra* K07-0510: identification of metabolic pathway to angelyl-CoA. *Chembiochem*. **17**: 1442-1447.
- 2) Inahashi, Y., Shiraishi, T., Také, A. *et al.* 2018. Identification and heterologous expression of the actinoallolide biosynthetic gene cluster. *J Antibiot*. **71**: 749-752.
- 3) Inahashi, Y. 2019. Isolation of endophytic actinomycetes and the search for new secondary metabolites. *Actinomycetologica* **33**: S56-S63.
- 4) Koomsiri, W., Inahashi, Y., Leetanasaksakul, K. *et al.* 2019. Sarpeptins A and B, lipopeptides produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 overexpressing a specific SARP regulator. *J. Nat. Prod.* **82**: 2144-2151.

その他

- 1) 大村 智, 中島 琢自, 高橋 洋子, 稲橋 佑起. 2017. トレハンジェリンの製造法. 特開2017-158546, (学校法人北里研究所, 長瀬産業株式会社)

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の一部は北里大学学術奨励資金により成されました。本研究の遂行にご協力いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の白石太郎博士、タイ王国カセサート

大学のArinthip Thamchaipenet博士, Wilaiwan Koomsiri博士, 北里大学北里生命科学研究所の松本厚子博士, 野中健一博士, 岩月正人博士, 武見博士ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Basey K., Woolley J. G. 1973. Biosynthesis of the tigloyl esters of *Datura*: cis-trans isomerism. *Phytochem*, **12**: 2883-2886.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K. *et al.* 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**: 43-49.
- Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 208-215.
- Claesen, J. & Bibb, M.J. 2010a. Genome Mining and Genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of post-translationally modified peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 16297-16302.
- Claesen, J. & Bibb, M.J. 2010b. Biosynthesis and regulation of grisemycin, a new member of the linaridin family of ribosomally synthesized peptides produced by *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **193**: 2510-2516.
- Gibson, G. D., Young, L., Chuang, R. *et al.* 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods*. **6**: 343-345.
- Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Ishiyama, A. *et al.* 2015. Actinoallolides A-E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. *Org. Lett.* **17**: 864-867.
- Kimura, T., Inahashi, Y., Matsuo, H. *et al.* 2018. Pyrizomicin A and B: structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J. Antibiot.* **71**: 606-608.
- Laureti, L., Song, L., Huang, S. *et al.* 2011. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 6258-6263.
- McGaw, B. A., Woolley, J. G. 1979. The biosynthesis of angelic acid in *Cynoglossum officinale*. *Phytochem*, **18**: 1647-1649.
- Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P. *et al.* 2011. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **39**: W339-346.
- Nakashima, T., Okuyama, R., Kamiya, Y. *et al.* 2013. Trehangelins A, B and C, novel photo-oxidative hemolysis inhibitors produced by an endophytic actinomycete, *Polymorphospora rubra* K07-0510. *J. Antibiot.* **66**: 311-317.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 1362-1384.
- Pickens, L.B., Kim, W., Wang, P. *et al.* 2009. Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *J. Am. Chem. Soc.* **131**: 17677-17689.
- 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.
- 菅原孝子, 丹羽智宏, 金田佳枝ら. 1999. チアゾリルピリジン系化合物. 公開特許公報. 特開平11-60572.

2018年度一般研究助成の研究報告

助成期間：2018年4月～2020年3月

緑藻クロレラの細胞内共生による 繊毛虫の進化と多様性のメカニズムの解明

児玉有紀

島根大学生物資源科学部
kodama@life.shimane-u.ac.jp

目的：ミトコンドリアや葉緑体を生み出した細胞内共生は現在でも多くの生物同士で見られ真核細胞の進化や多様化の原動力となっている。しかし細胞内共生の成立や維持の機構はほとんど明らかにされていない。この謎を解明するためのモデル生物が繊毛虫のミドリゾウリムシである。ミドリゾウリムシの細胞質内に約700細胞存在している共生クロレラは、1細胞ずつ宿主食胞膜由来のPV膜と呼ばれる共生胞に包まれている。ミドリゾウリムシとクロレラは相利共生関係であるが、それぞれ単独での生存が可能である。これは両者の関係が細胞内共生による進化の初期段階にあることを示している。クロレラはゾウリムシ以外の多種原生動物やヒドラやカイメン等にも共生しており、クロレラと動物細胞の細胞内共生は普遍的現象である。本研究はミドリゾウリムシを用いた細胞内共生による真核細胞の進化と多様化のメカニズムの解明を目的としている。

方法：共生クロレラは宿主ミトコンドリアとPV膜との接着によって細胞表層直下に固定されている。共生の成立や維持における宿主ミトコンドリアの機能を調べるために、抗ミドリゾウリムシミトコンドリアモノクローナル抗体を作製した。その抗体を使用して、クロレラ除去株（白色株）と保持株（緑色株）の抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。さらにミドリゾウリムシのトランスクリプトームデータから、抗酸化物質の一つであるグルタチオンを付加する反応を触媒するグルタチオンS-トランスフェラーゼの部分塩基配列を使って合成ペプチドを作製し、それを抗原にした抗血清を使用して抗原の局在性を蛍光抗体法で比較した。

結果・考察：モノクローナル抗体を使用した蛍光抗体法の結果、緑色株と比較して白色株のミトコンドリア数が多いことが分かった。緑色株のミトコンドリアはクロレ

ラを取り囲んでいた。ミトコンドリア選択的蛍光色素のMito Tracker® Green FMを使い同様の結果を得た。抗血清を使用した蛍光抗体法の結果、白色株と緑色株の差異は検出できなかった。藻類と共生することで宿主は、光合成による酸化ストレスを受ける。共生藻を持つ複数種の宿主において、活性酸素種の発生源となる宿主ミトコンドリアの機能の低下と、抗酸化酵素遺伝子の発現の上昇が報告されている。一方ミドリゾウリムシにおいては白色株で抗酸化酵素遺伝子が高発現し、その理由は不明であったが、本研究からミトコンドリア数の減少が酸化ストレスを軽減している可能性が示唆された。トキソプラズマやレジオネラの寄生胞も宿主ミトコンドリアと密着・融合している。これは相利共生関係や寄生関係における共生胞や寄生胞と宿主ミトコンドリアとの関連の重要性や普遍性を示唆している。今後はクロレラの共生過程におけるマイトファジーの可能性などを調べ、元は共生細菌由来であるミトコンドリアと共生クロレラの関係に迫りたい。

かつお節かび付け工程で働く好乾性糸状菌の 分類と菌叢解析に関する研究

竹中慎治

神戸大学大学院農学研究科
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

目的：日本の伝統食品である鰹節は、荒節と枯節に大別できる。カツオ肉を煮熟・焙乾ものが荒節であり、さらに *Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）にてかび付け発酵・熟成させたものが枯節である。かび付け工程は、約6か月間かけて「かび付け⇒天日干し⇒かびの払落し」を4回ほど繰り返す作業であり、脂肪の分解、香味の付与、色相の変化などをもたらすとともにもろやかな風味や上品な色合いを有する節に変えてくれる。鰹節カビは、*A. glaucus* およびその類縁種と言われてきたが、かび付け工程で、どのような *Aspergillus* 属糸状菌がこれを担っているか明らかではない。本研究では、かび付け工程やサンプルの違いによる好乾性糸状菌の優占種やそれらの加

水分解酵素の生産特性の解明を目的とした。

方法：ゲノム DNA は、「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」と「問屋から入手した製造元の異なる 4 番枯節」を鯉節カビ分離源とし、MY20 平板培地で培養して得られた菌糸体から混合ゲノム DNA として調製した。PCR-DGGE 法は β -チューブリン遺伝子 (*BenA* 部分断片、約 400bp) を増幅し、変性剤濃度 5% から 35%、60°C の条件で行った。リパーゼ、ペプチダーゼおよび酸性・中性プロテアーゼの酵素活性測定は鯉節（荒節）粉による固体培養（0.85 および 0.95_{aw}）で得られた細胞抽出液を用いて行った。

結果・考察：枯節から *A. amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. pseudoglaucus*, *A. ruber*, *A. sydowii* の 5 種を分離・同定した。次に、混合培養・ゲノム DNA 調製法を検討後、*BenA* 遺伝子の増幅と DGGE で菌叢解析した。DGGE のマーカーは、同定した 5 種のカビより調製した *BenA* 部分断片とした。「同じ製造元から入手した 1 番から 4 番枯節」について優占種の推移を調べた結果、*A. pseudoglaucus* および *A. chevalieri* が優占種であり、かび付け発酵が進むとともにこれらの構成比が徐々に 1:1 に収束した。また、「製造元が異なる 4 番枯節」については、上述の 2 種の他に *A. amstelodami*, *A. ruber*, *A. sydowii* も優占種となっていた。さらに、鯉節の水分含量が 15% 程度の鯉節サンプルでは *A. amstelodami* が、脂質含量が 3.5% の鯉節サンプルでは *A. chevalieri* が優占種となる傾向が見られた。つづいて、「製造元が異なる 4 番枯節（13 サンプル）」から回収した孢子（カビ混合サンプル）を水分含量の異なる鯉節固体培地（0.85 および 0.95_{aw}）で培養し、得られた抽出液（粗酵素液）について加水分解酵素活性を調べた。その結果、低水分下（0.85_{aw}）で培養して得られた抽出液において測定した加水分解酵素活性値が高い傾向が見られた。特に、脂質の加水分解に関わるリパーゼの活性だけでなく、筆者が提唱した鯉肉の脱色に関わるアスパルティックプロテアーゼの活性は、低水分活性下で培養したサンプルにおいてそのほとんどが高活性であった。

日本産海岸生地衣類の種多様性解明と 同定ツールの開発および分類

原 田 浩

千葉県立中央博物館植物学研究科
harada@chiba-muse.or.jp

目的：ほとんどの生物にとって過酷な環境となる、岩石海岸の潮間帯から飛沫帯にかけては、地衣類が卓越し時に明瞭な分布帯を形成することから、生態学をはじめとする様々な分野において研究対象として期待されるが、国内での研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では、その基礎となる種多様性解明を進めるとともに、分類学者以外にも利用可能とするための、図鑑・化学成分データベース・DNA データベースの 3 つの同定ツールの構築を目指した。

方法：長崎周辺・千葉・秋田県周辺を 3 重点地区として、原田らが野外調査を行い採集した新規標本と、千葉県立中央博物館に保管されている既存標本を用いた。新規標本から削り出した試料について、アセトンにより抽出し、LC/MS による分析を行い、含有化学成分を同定した。抽出後の乾燥試料（あるいは採集後まもなく冷凍した（一部は冷蔵、常温保存））は、市販のキットを用いて DNA を抽出した。その後、地衣菌の核リボゾーム DNA の ITS 領域を増幅し、塩基配列を決定した。既に分類が解明された群については、新規標本に既存標本を加え、形態等の観察を行い、分類学的再検討と同定を進めた。分類が未解明の群については、DNA 配列と文献から得られた形態形質との間に矛盾が見られた標本について同定を進めた。確認された全種について、生物顕微鏡・実体顕微鏡に装着したデジタルカメラにより画像を取得し、Adobe®Photoshop による画像処理を行い、原図とした。

結果・考察：日本産海岸生地衣類として 11 目 17 科 34 属 55 種を同定し、この他未同定種を含めると計 12 目 20 科 41 属 72 種を認めた。同定された 55 種について概ね図（写真）と記載をそろえ、群ごとに図鑑として誌上で公表するとともに、ウェブ図鑑の公開準備を進めた。未同定種についても同様に進めている。DNA バーコーディ

ングを目的として、約半数の26種のITS領域を取得し(この他、検討を要する種として約10種から得ている)、データベース公開の準備を進めた。化学成分(LC/MS等)は、ダイダイゴケ科等について解析を概ね完了し、残る群についてもまもなく完了する予定である。

既存のDNA情報と得られた情報を比較することによって、同定が可能になった分類群、従来の同定に疑問が生じた分類群などがあった。これまで日本産の分類がよく分かっていなかったダイダイゴケ科Teloschistaceaeについては、近年韓国で研究が進みDNA情報が充実していたため、3種を新たに日本産として同定することができた。アナイボゴケ科Verrucariaceaeについては、一通り形態分類が終了した結果をまとめたが、認められた複数の種について、学名の修正の必要が生じた。チャシブゴケ属*Lecanora*については、日本と周辺地域のDNA情報が貧弱であり、また海岸生種の研究が進んでいないため、ほとんど確実な同定ができなかったため、未同定種としてデータベース化することとした。

熱帯アジアで猛威を振るうぶどうサビ病菌の 生態学的・分類学的研究

小野 義隆

茨城大学教育学部
yoshitaka.ono.grapes@vc.ibaraki.ac.jp

目的：ぶどうサビ病（GLR）は、東南アジアにおいて、栽培規模が大きくなく計画的な薬剤散布が充分でないブドウ園で猛威を振るい、早期落葉とともに果実の収量と品質の低下をもたらしている。本研究は、東南アジアとオーストラレーシアに広く分布し、南アメリカにも侵入・定着したGLR病原菌の宿主範囲・生活環及び分類学的位置を明らかにすることを目的とした。

方法：東南アジアとオーストラレーシアに分布するGLR菌と東アジアに分布する2種のGLR菌との比較研究にはタイ国立公園・野生動物・植物保護局 Forestry Herbarium: BKF, 茨城大学菌類標本庫: IBAR, 筑波大学菌類標本庫: TSH 所蔵の標本を用いた。宿主範囲と生

活環の研究は、タイ・チェンマイ県、ナコンラチャシマ県、及びカンチャナブリ県にある国立公園とその隣接地域での調査と収集した標本に基づいた。これらの調査・研究は、タイ国家学術調査委員会 (the National Research Council of Thailand) の承認のもとに実施した。国立公園内での調査と標本収集は、タイ国立公園・野生動物・植物保護局の許可を得た。ベトナムのGLR菌標本は、ベトナム国立農業大学及びホーチミン市バイオテクノロジーセンターの研究者の協力を得てハノイ、ニントゥアン省、タイニン省で収集した。分子系統解析にはITS2及びLSU rRNA(D1/D2領域)の配列を用いた。

結果・考察：BKF, IBAR, TSH 所蔵標本、及びタイでの野外調査と新たに収集した標本を精査したが、東南アジア・オーストラレーシア GLR 菌が栽培ぶどう以外の野生ブドウ科植物に寄生している事実は確認できなかった。しかし、夏孢子堆側糸の形態が異なることと、分子系統解析で推定した系統樹で東アジア GLR 菌2種とは明確に異なるクレード (clade) を構成することから、東南アジア・オーストラレーシア GLR 菌は *Neophysopella* 属の新種であると結論した。これまでの接種試験による研究から、ブドウ科 *Ampelocissus* 属植物が東南アジア・オーストラレーシア GLR 菌の野生宿主である可能性を推定していたが、タイで新たに見出した *A. araneosa* に寄生するサビキノは東南アジア・オーストラレーシア GLR 菌とは形態的にも分子系統的にも異なる *Neophysopella* 属の新種であることを明らかにした。タイにおいて GLR 菌の異種寄生宿主となりえるアワブキ (*Meliosma*) 属植物に寄生するサビキノを調査した結果、*M. simplicifolia* にさび孢子世代形成するサビキノを見出したが、本菌は *Neophysopella* 属菌であることが明らかになった。また、*M. arnottiana* に寄生しさび孢子世代を形成するサビキノも見出したが、本菌も *Neophysopella* 属の新種であることが明らかになった。

木材腐朽菌の進化仮説を実験室内で実証する

中 沢 威 人

京都大学大学院農学研究科
tnakazaw@kais.kyoto-u.ac.jp

目的：近年旺盛に行われた木材腐朽菌（担子菌の一部）の比較ゲノミクス解析の結果、木材分解機構の進化、変遷ならびに多様性に関する幾つかの興味深い仮説が提唱された。例えば、褐色腐朽菌が進化して白色腐朽菌が発生したと考えられる。特にタマチョレイタケ目（Polyporales）においては、木材中の多糖をほとんど分解しない選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* が、*Trametes versicolor* などの他の白色腐朽菌よりも褐色腐朽菌に進化的に近く、これらの一般的な白色腐朽菌から選択的の白色腐朽菌へと変化し、その後褐色腐朽菌へと進化した可能性も考えられる。しかし、この仮説を実験的に実証する（再現する）ことは行われていない。このことを踏まえて本研究では、この進化仮説を実験室内で再現および実証することを目的として行った。

方法：タマチョレイタケ目に分類される木材腐朽菌では、効率的な遺伝子ターゲティング実験系が開発されていない。そこで *C. subvermispora* において CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子変異導入を行うため、本菌の野生モノカリオン株由来のプロトプラストに、ハイグロマイシン耐性遺伝子、gRNA および Cas9 の発現カセットを有するプラスミドを導入した。本研究で *C. subvermispora* に変異を導入した遺伝子は、*fcy1*（変異株は 5-fluorocytosine 耐性を示すため、表現型で変異導入を簡便に調査可能な遺伝子）に加えて、ヒラタケでリグニン分解能を顕著に低下させる遺伝子（*pex1* および *gat1*）である。*pex1* および *gat1* の単独遺伝子変異がリグニン分解能に及ぼす影響を評価するために、各 *C. subvermispora* 株をブナ木粉培地上で 11 日間および 20 日間培養し、Klason 法に従って残存リグニン量を比較した。

結果・考察：得られたハイグロマイシン耐性形質転換体

の概ね 70% 以上が *fcy1*, *pex1*, *gat1* の単独遺伝子変異株であることが判明したため、*C. subvermispora* における効率的なゲノム編集法が確立できたと考えられる。また、当研究室の先行研究と同様に、形質転換体を継代すると、その約半数のハイグロマイシン耐性が消失した。また、PCR による耐性消失株からのハイグロマイシン耐性遺伝子の増幅がみられなくなった。このことは、本研究におけるハイグロマイシン耐性遺伝子の発現は一過性であることが示唆される。そのため、ハイグロマイシン耐性形質転換を繰り返すことにより、多重遺伝子変異株の作成が可能であると考えられる。このことは、この *C. subvermispora* におけるゲノム編集系が、ゲノム上に多コピー存在する木質分解系酵素遺伝子群の大規模変化に有効であることを示唆する。次に、親株と *pex1* および *gat1* 単独遺伝子変異株の間でブナ木粉培地中のリグニン分解量を比較したところ、これらの株における分解能の低下が確認された。このことは、本手法で作製した遺伝子変異株と親株との間で、木質分解能の比較解析が可能であることを示す。今後は、本研究で確立したゲノム編集系を用いて、実際に実験室内での進化仮説の実証を行う予定である。また、*T. versicolor* におけるゲノム編集系の確立にも取り組んでいる。

難分解性物質を利用する昆虫における共生酵母とその機能

土 岐 和 多 瑠

名古屋大学大学院生命農学研究科
tokiw@agr.nagoya-u.ac.jp

目的：昆虫類は、様々な環境へ進出するばかりでなく、普通の動物では利用困難な餌資源を利用するものまで知られる。これらの昆虫は微生物と共生関係を結ぶことでそのような利用困難な資源を利用可能になったことがわかりつつある。昆虫の中でも特に顕著な多様化を遂げた甲虫では、多くの種類で消化管などから様々な酵母が見出されている。しかしながら、甲虫-酵母共生系の研究は緒に就いたばかりであり、酵母の役割についてはほと

んどわかっていない。木材は森林に豊富に存在するが、難分解性物質（セルロース、ヘミセルロース、リグニン）に富み、利用困難な資源である。本研究は、木材依存性甲虫が木材を資源として利用可能になったのが、それらを分解する酵母と共生関係を持つことによるものかどうかを明らかにすることを目的とした。

方法：木材依存性甲虫（主にツツシンクイムシ科、オオキノコムシ科コメツキモドキ亜科）を野外よりサンプリングし、成虫体内、幼虫体表面より酵母を分離し、DNA情報に基づいて同定した。これらの培養菌株を用いて難消化性物質の資化活性の有無を実験的に調べた。コメツキモドキ亜科のうち、タケの空洞内で幼虫が栽培した酵母を食べて成長するニホンホホビロコメツキモドキ（ニホンホホビロ）については、酵母の増殖基質を明らかにするため、タケの髓組織、酵母培養後の髓組織、幼虫飼育後の髓組織に含まれる糖組成をイオンクロマトグラフィー分析によって調べた。

結果・考察：ニホンホホビロについて、タケの髓組織にはアラビノース、ガラクトース、グルコース、キシロースを主として10種の糖が含まれ、酵母培養後のサンプルではマンノースの増加が見られた一方、幼虫飼育後のサンプルではマンノースが少量検出された。炭素源の資化性試験により、酵母はグルコースに強い資化性を示し、キシラン、セロビオース、キシロースに弱い資化性を示し、セルロース、アラビノース、ガラクトースには資化性を示さなかった。これらの結果から、ニホンホホビロ共生酵母はタケに含まれる難分解性物質を積極的に分解するものではない可能性が考えられた。海外産ホホビロコメツキモドキ由来の3種の酵母はキシロースに強い資化性を示し、そのうちの2種ではキシランにも強い資化性を示した。これらは、積極的に難分解性物質を分解し、幼虫の成長に寄与する可能性を示唆する。ツツシンクイムシについては、枯死木利用性のクシヒゲツツシンクイ由来の酵母4種を炭素源の資化性試験に供試したところ、全てがキシロースとキシランに資化性を示し、1種についてはガラクトン酸にも資化性を示したことから、材中の様々な難分解性物質を分解して幼虫の成長に

寄与する可能性が示唆された。以上より、昆虫による木材利用には、共生菌の難分解性物質利用能力が重要な役割を果たす場合が多いことを示唆する。

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

矢部 修平

東北大学大学院農学研究科
shuheiyabe.b2@tohoku.ac.jp

目的：近年、多剤耐性菌による感染症が拡大する中、創薬資源「放線菌」からの新規抗生物質の創出は急減しており、探索源の開拓が急務である。2006年に創設された「クテドノバクテリア（綱）」は、放射状の気菌糸に胞子を形成し種々の生物活性を示すことから、放線菌の次の世代の探索源として期待できる。しかしながら、この分類群は培養株が少なく遺伝資源として未開拓であるため多様な培養菌種を得ることが課題であった。本研究は、クテドノバクテリア綱の選択的分離法を改良するとともに、本綱の新しい系統に属する細菌の分離と分類及びゲノム解析、新規二次代謝物の探索に取り組んだものである。

方法：宮城県鬼首温泉地熱地帯の泥土、蔵王山御釜湖付近の土壌、浅間・烏帽子火山群に棲息し「食べられる土」として知られる微生物塊「天狗の麦飯」を採集した。10倍希釈R2A培地にアジ化ナトリウムを30-60mg/L添加し、1.5%ゲランガムにより固化したものを選択培地として直接接種法により培養した。培養は30-60℃にて7-60日間行い、分離株は16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づき同定した。基準株は培養生理学的、化学分類学的、ゲノム解析及び分子系統分類学的解析を行い系統分類した。また*in silico*による新規二次代謝物生合成ポテンシャルの解析に加え、培養法による探索、精製、構造解析も併せて行った。

結果・考察：計19株のクテドノバクテリアの分離に

成功した。それらの分類学的性質を解明し、1新科 (*Dictyobacteraceae* fam. nov.), 1新属・1新種 (*Tengunoibacter tsumagoiensis* gen. nov., sp. nov.), 5新種 (*Thermogemmatispora aurantia* sp. nov., *T. argillosa* sp. nov., *Dictyobacter kobayashii* sp. nov., *Dictyobacter alpinus* sp. nov., *Dictyobacter vulcani* sp. nov.)を提唱した。さらに一部の菌種は孢子嚢を形成することを見出した。孢子嚢を形成する細菌系統の発見は、放線菌、粘液細菌に次いで3例目である。これら分離株のゲノム中には二次代謝物生合成遺伝子群が最大で22個と放線菌に匹敵するほど多く、それらのほとんどは新規であることが示唆された。分離株はグラム陽性菌から陰性菌まで幅広く抗菌活性を示し、その培養物から新規と推定されるアントラキノン化合物を見出した。以上、本研究により、本系統を拡充することに成功し、その生合成ポテンシャルの高さを証明するに至った。

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

桑原 宏和

東京工業大学生命理工学院
hkuwahara@bio.titech.ac.jp

目的：シロアリ腸内には、微生物間、特に原核生物と真核生物（原生生物）間での多様な共生関係が存在しており、細胞共生研究の格好のモデルとなっている。ヤマトシロアリ腸内原生生物 *Trichonympha agilis* に共生する未培養細菌 “*Candidatus Desulfovibrio trichonymphae*” Rs-N31は、宿主細胞表層に埋没し、直径50nmの穴でのみ外界に通じている。我々は、同細菌ゲノムの解読に成功し、サイズが1.4Mbに縮小しているものの、水素酸化による硫酸還元能力とアミノ酸、補酵素合成能力を保持することを明らかにした。一方、ネバダオオシロアリの腸内に共生する *T. collaris* の細胞表面には、細胞体が完全に露出した状態で “*Ca. D. trichonymphae*” ZnDsv-02が付着共生している。本研究では、*Desulfovibrio* 属細菌と *Trichonympha* 属原生生物の細胞

共生に着目し、その共生進化過程を明らかとするため、ほぼ細胞内共生細菌であるRs-N31と、完全に細胞体が露出した状態で原生生物細胞表面に付着共生するZnDsv-02の比較ゲノム解析を行った。

方法：ネバダオオシロアリの腸内に共生する *T. collaris* 1細胞を顕微操作により物理的に単離し、洗浄後マイクロメスで解剖し、目的のZnDsv-02を含む細胞前部をマイクロチューブ回収した。回収したサンプルにたいして全ゲノム増幅を行い十分量のゲノムDNAを取得後、次世代シーケンサー（MiSeq）用のライブラリー（ペアエンドとメイトペア解析用）を調製した。ライブラリーをイルミナMiSeqでシーケンスを行った。さらにPacBioでのロングリードの取得も行った。ZnDsv-02のゲノムを再構成し、ゲノム解析および、比較ゲノム解析を行った。

結果・考察：得られた配列をアッセンブルした結果、ZnDsv-02のほぼ完全長のゲノムの取得に成功した。ZnDsv-02のゲノムサイズは1.6Mbであり、Rs-N31の1.4Mbよりやや大きい。近縁の自由生活型 *Desulfovibrio fairfieldensis* (3.7Mbp)、*D. desulfuricans* (2.9Mbp) と比べ大幅に縮小していることが明らかとなった。遺伝子を機能分類し比較解析した結果、ZnDsv-02とRs-N31の遺伝子欠失のパターンはよく似ていた。興味深いことにZnDsv-02は宿主細胞外の環境に曝されているにもかかわらず、Rs-N31と同様にシグナル伝達に関わる遺伝子の多くを欠失していた。しかしながら、ZnDsv-02は、Rs-N31では偽遺伝子化しているCRISPR-Casシステムや制限修飾系に関わる遺伝子を保持しており、外環境のファージや外来DNAに曝されているためだと考えられる。また、ZnDsv-02には接合伝達に用いられるtype IV分泌システムに関する遺伝子が存在するが、Rs-N31では失われていた。現在のZnDsv-02は、type IV分泌システムのDNA伝達に関わる遺伝子 (*virB4*, *B7*, *traI*) を失っており、現存の構成成分を用いて宿主原生生物細胞に接着していると考えられる。さらにZnDsv-02は乳酸利用経路を保持していたが、Rs-N31では偽遺伝子化していた。一般的な *Desulfovibrio* 属細菌

は乳酸を炭素源やエネルギー源とするが、ほぼ細胞内共生している Rs-N31 は乳酸の取り込みが困難だと考えられ、またエネルギー源として水素を使用することは宿主原生生物にとってより有益な可能性がある。本研究により、細胞表面細菌であってもゲノム縮小が起こっており共生進化過程の一端が明らかとなった。

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

佐久間 大 輔

大阪市立自然史博物館学芸課
sakuma@mus-nh.city.osaka.jp

目的：今日、日本の菌類学の担い手として市民科学者の存在は無視することができない。特に、大型担子菌類においてはアマチュア研究者の存在は大きい。地方菌類相の解明にとどまらず、新種探索や系統解析など、多くの研究にアマチュア研究者の協力・参画がある。南方熊楠、原摂祐の時代から、近年でも青木実などアカデミア外の研究者たちの活躍が日本の菌類多様性情報の基礎となっている。これら過去の研究者の知見に触れる手段として、文献とともに標本や記録資料がある。しかし、必ずしも整理された情報ばかりでもなく、未発掘な資料も多い。本研究では将来の研究資料となる過去の標本及び描画、顕微鏡記録など「学術的レガシー」の活用をすすめることを目的とした。

方法：2018年に大阪市立自然史博物館で行われた特別展に向けて、所在調査をした未発掘資料を対象とした。特に研究上重要と思われた在野の市民科学者の資料、未発掘の研究者資料に注目し、現在および将来の研究者が利用できる体制構築を試みた。具体的には、各種の記録類について標本や発表著作との関係を中心とした資料研究を行うとともに、劣化の危険の大きい1970年代以前のポジフィルム、水彩画を中心にデジタル化をすすめた。近年採取された標本との対比なども行い、未記載の分類

群の記載に役立てる試みをおこなった。

結果・考察：多くの未活用資料について、整理を進め活用可能な状況とした。未記載分類群を多く取り扱った『日本きのこ図版』に関わる青木実資料のうち、ポジ写真1900枚およびネガ1100枚あまりをデジタル化、記載との整合を取り、利用可能な整理をした。普及版図鑑著者であった上田俊穂氏の標本資料750点、描画資料など400点の公開に向けた準備を行った。さらに香川県の研究者豊嶋弘氏の図譜など未公表資料1200枚の発掘を行い、また保育社『原色菌類図鑑』の本郷次雄氏の初期の描画資料800枚など研究資料群の収集整理を行った。成果は日本菌学会などでの発表の他、順次資料研究の成果として公表をしていく。標本利用の活性化にはアカデミア所属研究者の利用だけでなく市民科学者の利用拡大が鍵を握る。このため、幅広い菌類教育プログラムを展開し、成果を集約して山と溪谷社より菌類研究の手引となる一般書として、『きのこの教科書 観察と種同定の入門』の刊行した。ほかにも、参加者からの要望を受けて切片観察、DNA配列決定、参考資料提供など市民科学者の観察力を引き上げる環境構築を図った。

市民科学者による菌類研究を進展させるためにも、アカデミアによる研究にアマチュア資料の活用を促進するためにも、博物館はかなめとなる必要がある。今回の取り組みで生態観察から一歩深めた、標本・資料を活用する研究へと進めることができた。

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

春 田 伸

東京都立大学大学院理学研究科
sharuta@tmu.ac.jp

目的：*Thermoplasmata* 綱において、2013年に新目提案された *Methanomassiliicoccales* は、メチル化合物利用性の新しいメタン菌グループである。しかし、純粋分離に成功した例は中温環境からの一例のみである。本研究では、特に高温環境に注目し、*Thermoplasmata* メタン菌

の生態、多様性および代謝生理を明らかにすることを目的とした。

方法：ゲノム解析には、DNBSEQ-G400 (MGI社) および GridION XS (Oxford Nanopore社) を用いて塩基配列データを取得しアセンブルした。PCRアンプリコン解析では、MiSeq (Illumina社) によるペアエンド法で得たデータを QIIME を用いて解析した。

結果・考察：高温嫌気消化汚泥から取得した *Thermoplasma* メタン菌 *Ca. Methanogranum caenicola* についてゲノム解析したところ、ゲノムサイズは 1,130,161 bp、ORF 数は 1,158 であり、既報の *Thermoplasma* メタン菌のなかでも最小であった。DNA G+C 含量 (mol%) が 62.2% と高い特徴も見られた。またそのゲノムには、メタノール還元メタン生成に必要な *mtaABC* および *mcrA* 遺伝子が揃っていたが、いくつかの代謝経路に欠失があると考えられた。本菌は未だ純粋分離に成功していないが、共存他菌による代謝補完があると予想される。

日本各地の陸上温泉から 50℃～90℃の温泉水が噴出する高温土壌を採取し、全 DNA を抽出して、16S rRNA 遺伝子、メタン生成の鍵酵素遺伝子 *mcrA*、メチル化合物代謝を担う酵素遺伝子 *mtaBC* を対象とする PCR アンプリコン解析を行った。系統解析の結果、弱アルカリ性の高温土壌から、メチル化合物利用性と考えられる複数系統の *Thermoplasma* メタン菌が検出された。宮城県鬼首温泉郷からは、既報の *mcrA* との相同性が 85% 以下の配列も検出され、新しい系統群の存在が示唆された。陸上温泉の高温土壌をメタノールを主要炭素源とする嫌気培地に接種して集積培養を繰り返し、これらメチル化合物利用性メタン菌の分離を試みた。鬼首温泉土壌から得た 50℃の培養系から *Thermoplasma* メタン菌が検出され、その 16S rRNA 遺伝子塩基配列は、既知菌の配列との相同性が 93% と低く、*Thermoplasma* 綱の新属新種と考えられた。

これまで *Thermoplasma* メタン菌は主に動物腸内から見つかっていたが、本研究により、広く高温自然環境にも多様な種が分布していることが、培養法および非培養法によって明らかになった。これらメタン菌について得

られているゲノム情報はまだ少ないが、部分的な代謝経路の欠損が考えられ、他菌と強い共生関係を築いて生存している可能性がある。

酵母の接合型遺伝子のグローバルな機能とホモタリズムとの相互作用

前川 裕美

九州大学大学院農学研究院
hmaekawa@agr.kyushu-u.ac.jp

目的：一般に酵母には明らかな性的二型は見られず、ほぼ同じ大きさの細胞間で接合する。一方、メタノール資化酵母 *Osogataea polymorpha* ではサイズの異なる細胞間での接合がみられるが、接合型との関係は明らかでない。接合型遺伝子は転写因子をコードしており、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では接合フェロモンおよびその受容体遺伝子などが標的遺伝子として知られているが、広範な遺伝子発現が影響を受ける例も報告されている。本研究では、メタノール資化酵母 *O. polymorpha* の性差の理解を目指して、2つの接合型細胞での遺伝子発現の全体像を明らかにすることを目的とした。

方法：*O. polymorpha* 野生型株は接合が誘導される飢餓条件では接合型を変換するホモタリック株である。接合型に依存した遺伝子発現解析のために、本研究では接合型変換不能とした **a** 型および α 型一倍体人工ヘテロタリック株を用いた。また、 α 型細胞中で **a1** 遺伝子を発現することにより接合しなくなった擬似二倍体株 (**a**+ α 型) も併せて解析した。これまでに *O. polymorpha* では液体培養の富栄養および栄養飢餓条件での遺伝子発現解析が報告されているが、本研究では接合率が比較的高い MAME 固体培地上での培養を飢餓条件とした。遺伝子発現解析には CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法を用いた。

結果・考察：富栄養条件において **a** 型細胞と α 型細胞で 4 倍以上の発現量の差を示すのは接合型遺伝子を含めて 19 個と少なかったが、全遺伝子の約 6% に相当する 300 以上の遺伝子が有意差を示した。このことから、

O. polymorpha の接合型遺伝子は飢餓条件で接合に関与する遺伝子発現を制御するだけでなく、多くの遺伝子発現レベルに影響を与えていることが示唆された。

a型細胞、 α 型細胞、**a**+ α 型の全ての株において、飢餓条件での多数の遺伝子の発現誘導・抑制がみられたが、約半数は共通しており、**a**型細胞または α 型細胞でのみ発現誘導される遺伝子は各々約40個であった。接合型特異性が高く、転写開始点が明確な遺伝子を抽出し、未同定の14遺伝子を同定した。*S. cerevisiae* にホモログが存在する遺伝子は主に代謝に関与すると予想され、機能未知の遺伝子の中には子嚢菌酵母に保存されていない遺伝子が含まれていた。また、接合型変換に必須のDNA損傷修復因子 *RAD17* 遺伝子は飢餓条件で **a**型特異的に高発現していた。本研究により、各接合型の遺伝子発現プロファイルを取得、新たに接合型特異的に発現する遺伝子を同定することができた。

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

邊 見 久

名古屋大学大学院生命農学研究科
hhemmi@agr.nagoya-u.ac.jp

目的：高温や高塩濃度、低 pH といった極限環境に生育するアーキアにとって、それらが生産する特殊な構造のイソプレノイド膜脂質によって構成される、広い温度領域で低いイオン透過性を保つことのできる細胞膜は生育に有利な形質である。我々は、このアーキア膜脂質を大腸菌に生産させることで細胞膜の性質を変化させ、塩や有機溶剤に耐性を持つ菌株を構築するという、大腸菌の細胞膜エンジニアリングに取り組んでいる。アーキア膜脂質の生合成系を導入した大腸菌は既に構築済みであるため、本研究では生合成前駆体供給経路の強化による、アーキア膜脂質の生産強化を目的とした。

方法：大腸菌はイソプレノイド生合成の前駆体供給経路としてメチルエリスリトールリン酸経路のみを有してい

る。そこで、同経路とは完全に独立した前駆体供給経路であるメバロン酸経路の導入により、アーキア膜脂質の生産量の大幅な向上を図ることとした。酵母由来の古典的メバロン酸経路、および近年アーキアなどから見出されている変形メバロン酸経路を大腸菌に導入し、イソプレノイド生産に与える影響を検証した。検証にはカロテノイド色素の生産系を導入した大腸菌を用い、カロテノイド生産量を指標とした分析を行った。

結果・考察：酵母のメバロン酸経路遺伝子については、プラスミドを用いた方法だけでなく、CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノムへの挿入によっても大腸菌への導入を図ったが、プラスミドの方がはるかに高いイソプレノイド生産向上効果をもたらしたため、以降の遺伝子導入にはプラスミドを利用した。真正細菌のメバロン酸経路はフィードバック阻害により活性調節されており、それがイソプレノイド大量生産の妨げになるとされている。そこでその代替として、我々が近年好熱性アーキア *Thermoplasma acidophilum* より見出した変形メバロン酸経路の利用を試みた。同経路そのものの導入はほとんど効果を上げなかった一方で、その一部酵素の機能改変によって構築した人工的な変形メバロン酸経路は、酵母由来のメバロン酸経路と同等のイソプレノイド生産向上効果を有していた。我々はさらに、超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* より ATP 要求性の低い新型の変形メバロン酸経路を見出し、これをアーキア型経路と命名した。その大腸菌への導入は、興味深いことに、パラフィンを重ねて振とうすることで達成した準嫌気培養条件においてのみイソプレノイド生産を向上させ、特に常温性メタン生成アーキアである *Methanosarcina mazei* の遺伝子を用いた場合には強い効果が見られた。準嫌気条件における機能発揮の原因としては、同経路が他のメバロン酸経路には無い酸素感受性の酵素を含むためだと考えられた。同経路の性質は、大腸菌での生産に嫌気条件が望まれるアーキア膜脂質の増産に適しており、細胞膜エンジニアリングでの有用性が期待できる。

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

高 妻 篤 史

東京薬科大学生命科学部
akouzuma@toyaku.ac.jp

目的：本研究では、大気成分（CO₂, N₂）と電気エネルギーから含窒素有機化合物を合成する革新的発酵プロセスを創出するための技術基盤を確立することを目的とした。具体的には、電気エネルギーを利用して炭酸固定と窒素固定を行うことが可能な細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の遺伝子操作技術を確立し、本細菌の窒素固定能力（ニトロゲナーゼ活性）を増強することにより、様々な含窒素有機化合物の電気合成のベースとなる遺伝子改変株の構築を目指した。

方法：*nifA* 遺伝子を広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 にクローニングし、接合伝達法によって *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株に導入することにより、*nifA* 過剰発現株（*nifA*-OE 株）を作成した。*nifA*-OE 株における遺伝子発現変動は DNA マイクロアレイにより解析した。ニトロゲナーゼ活性の評価はアセチレン還元法によって行った。アンモニウムイオン（NH₄⁺）濃度はイオンクロマトグラフィーにより定量した。電気化学培養にはグラフナイトフェルト（12cm²）を作用極、Ag/AgCl 電極を参照極、白金線を対極とした三電極系二槽式電気化学セル（培地容量 150ml）を用いた。作用極電位は 0V（vs. Ag/AgCl）に設定した。

結果・考察：*A. ferrooxidans* のニトロゲナーゼ遺伝子（*nifHDK*）の近傍には転写制御因子をコードすると推定される遺伝子（*nifA*）が存在し、その遺伝子産物が窒素固定系の制御に関与していると予想された。そこで *A. ferrooxidans* の *nifA* 過剰発現株（*nifA*-OE 株）を作製し、本変異株の遺伝子発現を野生型株と比較することにより、NifA の窒素固定制御への関与を調べた。その結果、*nifA*-OE 株では *nifHDK* を含む多くの窒素固定関連遺伝子の発現が顕著に増加していることが確認され、NifA

がこれらの遺伝子の転写活性化因子として働くことが示唆された。また、*nifA*-OE 株は野生型株よりも高いニトロゲナーゼ活性を示した。*nifA*-OE 株を電気化学培養した結果、野生型株の培養液中には NH₄⁺ が検出されなかったのに対して、*nifA*-OE 株の培養液中からは有意量の NH₄⁺ が検出された。また、電極に電位を印加しなかった場合には NH₄⁺ が生産されなかったことから、NH₄⁺ の合成は電気エネルギーに依存することが確認された。以上の結果から、*nifA* の過剰発現によって *A. ferrooxidans* の窒素固定能力が向上し、これにより大気成分と電気からの窒素化合物生産が促進されることが示された。また、本細菌が保持可能なプラスミド（pBBR1MCS-2）をベースとしたゲノム編集用ベクターを開発した。今後はこれらの知見を元に、アミノ酸等の含窒素有機物を生産可能な遺伝子改変株の構築を行う予定である。

微生物が備える可逆的ゲノム改編による 環境適応メカニズムの解明

田 中 誠 司

高知工科大学環境理工学群
tanaka.seiji@kochi-tech.ac.jp

目的：微生物の多くは、個々の細胞が直接的環境に晒されており、外的環境の変化に敏感、かつ即座に対応・適応するためのプログラムを備える。例えば、栄養飢餓の環境下では、細胞周期停止・胞子形成等の飢餓対応プログラムが発動することは広く知られている。その実体は、ほとんどの場合、環境適応に関わる因子・経路の活性化や抑制であり、生命の設計図であるゲノム情報、すなわちその生物のアイデンティティに影響が及ぶことはない。これに対し、少数ではあるがゲノム情報を直接改編することで環境変化に対応する例も知られている。このような環境適応戦略は、ゲノム不安定化のリスクを伴う可能性があるが、実際には部分的な改編のみでゲノム全体を不安定化させることは無い。このような特殊な機構の解明は、微生物の環境適応戦略の全体像の理解やゲノム編成の進化的理解につながることを期待できる。そ

ここで、環境中の銅イオン濃度によりコピー数変動が起きることが知られている出芽酵母 *CUP1* 遺伝子をモデルとして、ゲノム改編を伴う環境適応戦略を支える分子メカニズムの解明を目指した。

方法： *Saccharomyces cerevisiae* 研究室株 W303 をもとに、*CUP1* 遺伝子 (ORF 長 184bp) を含む約 2kb のリピートユニットをそれぞれ 0, 1, 2 コピー持つモデル細胞を作製した上で、ダメージ応答に関わる因子や、転写で生じる R-ループ (DNA:RNA ハイブリッド) 解消に働くことされる RNase H の破壊株を作製した。これらを用いて、銅イオン添加後のゲノム改編状況を調べた。

結果・考察：解析の結果、i)ゲノム改編には 2 コピー以上の *CUP1* ユニットが必要で、ii)改編は *CUP1* 遺伝子ではなく、リピートユニットの整数倍として起きること、iii)相同組換え関連遺伝子の欠損株では、コピー数増加が顕著に抑制されること、iv)非相同末端結合に関与する因子の欠損株では影響は見られないこと、v)RNase H の欠損株では、コピー数の増加が促進されること、を見出した。

以上の結果は、銅イオンの添加により *CUP1* 遺伝子の転写活性化の結果生じる R-ループと複製フォークの衝突による DNA2 本鎖切断と、その後の相同組換え修復がコピー数変動の主因であることを示唆する。しかし、従来より *CUP1* リピートユニット内にあるとされていた複製起点は、転写とすぐさま衝突するような位置関係にはない。そこで、ユニット内の複製起点活性を調べたところ、従来報告されていた位置ではなく、ORF 3' 側直下に活性があるという、上記モデルを支持する結果が得られた。

本研究により、遺伝子コピー数の増加が、その遺伝子産物の必要量に応じた段階的な発現レベルの制御に関わる機構の一環となっているという、出芽酵母が備える非常にスマートな環境応答戦略のメカニズムが明らかとなった。

変動環境下における葉面細菌の ストレス対処と増殖に関する研究

井口博之

京都先端科学大学バイオ環境学部
iguchi.hiroyuki@kuas.ac.jp

目的：自然環境中では気象変動により微生物の生息環境は絶えず変化している。植物葉面など表面に生息する微生物はその変化の影響を大きく受け、生育に適さない環境時には細胞損傷もしていると考えられるが、その様な中での増殖状況は不明である。そこで本研究では、葉面細菌の温度変動環境下での生理状態や変動環境への適応機構の解明を目指した。

方法：主要な葉面微生物である *Methylobacterium* 属細菌 (近年の再分類により別属となった菌種も含む) を対象とし、詳細な解析には本属のモデル株 *M. extorquens* AM1 を使用した。生育至適温度 30℃ と、夏期に達する高温 37℃ の間での周期的な温度変動環境の下、寒天培地にて本属細菌の培養を行い、増殖・細胞生理・転写などの解析を行った。

結果・考察：*Methylobacterium* 属菌種の各基準株を培養した結果、37℃での生育可 26 株・不可 14 株となり、3分の1が 37℃で生育できないことを確認した。30/37℃のサイクル時間を様々設定して、37℃で生育不可の AM1 株を培養したところ、30℃ 6hr/37℃ 18hr では 60% 程度が生育 (コロニー形成) したのに対し、30℃ 3hr/37℃ 21hr では全く生育が認められず、生育には 30℃ 下で 3 時間より長時間を必要と考えられた。また 37℃ で一定時間保持してから 30℃ へ移行したときの生存率は 48hr 保持で 32% など、37℃ は亜致死温度であることが分かった。顕微鏡で細胞を観察すると、37℃ 時には桿状の細胞が異常に伸張していた。30℃ に移すと 4hr 程度で細胞長は正常に戻ったことから、37℃ では細胞分裂の異常が示唆された。しかし、シロイヌナズナ葉上で生息する細胞を 37℃ に置いても、異常伸張の細胞はほとんど見られなかった。これは、寒天培地上と葉上との細胞分裂の活発さの違いを表していると考えられる。

次に、温度変動環境への適応機構を調べるため、温度サイクル環境で生育する細胞についてDNAマイクロアレイ解析を行った。30℃時に比べて37℃時には約8%の遺伝子の転写量が2倍以上に上昇し、約10%が半分以下に減少していた。これら遺伝子のうち、転写減少では鞭毛と細胞分裂、転写増加ではシャペロンの機能が注目された。温度サイクル環境での生育に寄与する制御因子を明らかにするため、37℃時と30℃時に顕著に転写増加する制御遺伝子をそれぞれ2個、3個抽出し、各遺伝子破壊株を構築した。1個の遺伝子の破壊株は37℃恒温培養での生存率が減少し、2個の遺伝子の破壊株はサイクル培養での生育割合が上昇した。後者の遺伝子破壊株の1つは、シャペロン遺伝子の転写量が増加していたことから、本遺伝子はシャペロンの制御を介して生育に寄与することが示唆された。

以上の研究により、*Methylobacterium* 属細菌の温度変動環境下における生理状態や生育に寄与する制御遺伝子を明らかにできた。今後、これら制御遺伝子の変動環境での生育・生存を高めるような機能や制御機構について、さらなる解析を進めていきたい。

人工ゲノム再編系による酵母発酵性能の改良

太田 邦史

東京大学大学院総合文化研究科
kohta2@bio.c.u-tokyo.ac.jp

目的：酵母の発酵性能の改良では、変異源処理や自然変異、胞子形成を伴う遺伝的な交配によってゲノムを改変し、醸造に好適な形質を持つ酵母を選択する方法が主流である。しかし、従来手法では新規の形質が飽和状態を迎えつつあり、また醸造酵母の多くが胞子形成能を失っていることから、新しい方法の開発が必要である。醸造用酵母で交配時のようなゲノム再編成を活性化できれば、新しい有用発酵形質を持つ酵母の獲得が期待できる。

筆者らは、新規ゲノム再編成システム TAQing システムを確立した。TAQing システムでは、高熱菌由来の制

限酵素 Taq I を細胞内に導入して一過的に加温することで、ゲノム中に多数の DNA 切断を誘発し、転座や変異、ヘテロ接合性喪失などのゲノム再編成を誘発できる。この方法により新規表現型を持つ実験室出芽酵母や植物の作出に成功した。そこで今回、TAQing システムを醸造酵母株に適用し、醸造や物質生産に適した株を構築する方法を確立し、最終的に責任遺伝子を同定する道筋を得たいと考えた。本研究では、特に酵母細胞内に TaqI タンパク質を直接送致して TAQing システムを実現するため、醸造酵母に好適な条件の探索と実施例の獲得を目的とした。

方法：醸造酵母として清酒酵母・ワイン酵母・トルラ酵母、対照株として実験室出芽酵母株を用いた。培養条件は出芽酵母の標準的方法を用いた。TaqI タンパク質は、大腸菌内で発現させたヒスチジンタグ付き TaqI をコバルトレジンにより精製した。TaqI タンパク質の酵母細胞への導入は、クロンテック社の Xfect トランスフェクション試薬を用い酵母に最適な条件を見出して行なった。

結果・考察：実験室株での TAQing システム処理条件を最適化し、その条件を参考に各種醸造酵母での条件の検討を行った。その結果、各種醸造酵母を G1 期に同調させたのち、SD 培地中にて 42 度で 30 分間加温する条件が最適であることがわかった。次に、TaqI タンパク質を Xfect トランスフェクション試薬により酵母細胞内へ導入する条件を検討した。この実験には定量的分析のため、GFP タンパク質を用いた。試薬の標準プロトコルに従ったところ、酵母の種類を問わず、約 3 割の細胞で GFP 蛍光が認められた。種々の導入条件を検討しさらに改良したところ、トルラ酵母と清酒酵母で 9 割の細胞に導入する条件を見出した。この条件で清酒酵母およびトルラ酵母に TaqI を導入し、新形質を有する株を含む 30 クローン以上の変異株を得た。パルスフィールド電気泳動法を用いてゲノム再編成を簡便に視覚化する泳動条件を決定し、トルラ酵母変異株については、パルスフィールド電気泳動法で染色体再編成の発生を確認した。以上から、TAQing システムの醸造酵母での実施法が確立できたと判断した。

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

宮 腰 昌 利

秋田県立大学生物資源科学部,
現 筑波大学医学医療系
mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp

目的：グリシンによって誘導される small RNA GcvB は腸内細菌科細菌に広く保存され、アミノ酸代謝に関与する複数の mRNA を転写後レベルで制御する。GcvB の細胞内存在量は新生転写速度と分解速度によって決定される。GcvB の合成はグリシンによって誘導される一方、その分解速度はグルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーター mRNA から生成する small RNA SroC に依存する。本研究は GcvB の制御メカニズムを明らかにし、天然アミノ酸であるグリシンによる腸内細菌叢の制御に応用することを目的とする。

方法：Salmonella enterica serovar Typhimurium もしくは Escherichia coli 由来の GcvB を構成的に発現するプラスミドを構築し、S. Typhimurium SL1344 株もしくは E. coli BW25113 株を形質転換した。それぞれの菌株を 0.2% グルコースを炭素源とする MOPS 最少培地で培養し、OD₆₀₀ を 10 分毎に測定した。また、GcvB の発現をアラビノースによって誘導するプラスミドを構築し、GcvB およびその変異体の過剰発現による SL1344 株のトランスクリプトーム変化を RNA-seq 法によって解析し、新規標的遺伝子を探索した。抽出された標的遺伝子について GFP 翻訳融合体を作製し、GcvB 発現による GFP 蛍光強度の変化をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

結果・考察：GcvB の過剰発現によって S. Typhimurium と E. coli の生育阻害が観察された。グルコースを炭素源とする場合には、S. Typhimurium は E. coli よりも顕著な遅滞期の延長が見られた。また、GcvB を安定化する sroC 破壊株ではより顕著な遅延を引き起こした。このことから、GcvB レギュロンは S. Typhimurium と E. coli では相違があり、S. Typhimurium では GcvB が代

謝主要経路をより強く阻害することが示唆された。その相違の一つとして、GcvB は E. coli の二成分制御系因子をコードする phoP mRNA と塩基対を形成して発現を抑制する一方で、S. Typhimurium の phoP は GcvB と塩基対形成せず制御を受けないことを明らかにした。PhoP は S. Typhimurium の病原因子の発現を司る二成分制御系因子であることから、GcvB は S. Typhimurium の病原性発現には関与しないことが示唆された。また、RNA-seq 解析によって S. Typhimurium の GcvB レギュロンを探索し、GFP 翻訳融合体による発現解析を用いて複数の新規標的遺伝子を同定した。

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

押 木 守

長岡工業高等専門学校環境都市工学科
oshiki@eng.hokudai.ac.jp

目的：以下の二種類の微生物群がこれまでに報告されていない新奇な亜硝酸還元酵素を有することを見だし、本研究ではタンパク質工学的手法によってこれらの細菌が保有する亜硝酸還元酵素を同定することを目指した：1) 嫌気性アンモニウム酸化細菌 Candidatus Brocadia 属細菌、2) 乳酸菌 Lactobacillus 属細菌。

方法：Ca. Brocadia 属細菌については、大型カラムリアクターで本菌を大量培養し、培養物 (20g-wet) をフレンチプレスで破碎し、粗抽出液を得た。メチルバイオロゲンを電子供与体、亜硝酸を電子受容体とする比活性試験を行い、亜硝酸還元 (Nir) 活性を測定した。粗抽出液をイオン交換、疎水性相互作用、ヒドロキシアパタイト、ゲル濾過クロマトグラフィーへ供し、Nir 活性を指標としたタンパク質精製を行った。Lactobacillus 属細菌については、L. brevis, L. farciminis, L. buchneri, L. suebicus を培養し、菌体および粗抽出液の Nir 活性を上述と同様に測定した。

結果・考察：Ca. Brocadia について、粗抽出液の Nir 総

活性の大半が可溶性画分に存在したため、可溶性画分から Nir の精製を試みた。陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、約 1 割の Nir 活性が担体へ吸着し、本画分をさらにヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーで精製した。精製物を Native PAGE へ供し、活性染色によって Nir 活性を示すタンパク質バンドを可視化した。Nir 活性を示したバンドを切り出し、現在、LC-MS/MS 解析によって同定を試みている。一方、陰イオン交換クロマトグラフィーを素通りした 9 割の Nir 活性は、興味深いことに、我々が検討したいずれの担体（陽イオン交換、疎水性相互作用）にも吸着が認められなかった。さらに、本 Nir 活性は極めて安定であり、例えば、プロテアーゼ処理を行っても Nir 活性の減少は認められなかった。我々は *Ca. Brocadia* の Nir がタンパク質分子以外によって構成されるきわめて新規性が高い触媒分子でないかと想像し、現在、同定作業を進めている。乳酸菌 *Lactobacillus* 属細菌について、MRS 培地へ $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加して 33 時間培養した結果、 $^{15}\text{NO}_2^-$ の大部分が ^{15}NO まで還元された。一方、Nir 活性を示した菌体を破碎して得られた粗抽出液は Nir 活性を示さなかった。細胞破碎の過程で Nir が失活した可能性を考え、様々な検討実験を実施したが、いずれにおいても Nir 活性を見いだすことはできなかった。この結果から、 $^{15}\text{NO}_2^-$ から ^{15}NO への還元反応が非生物的に生じていたのではないかと我々は着想し、検証を行った。MRS 培地の pH を 5.5 程度（乳酸菌の培養終了時と同程度）に調整し、菌体を添加せず、 NO_2^- を添加して培養したところ、 NO_2^- が顕著に消失することを確認した。従って、乳酸菌の培養過程で認められた $^{15}\text{NO}_2^-$ から ^{15}NO への還元は非生物的な反応に由来することが明らかとなった。非生物的な NO_2^- の消費が生じることは従来広く認知されてこなかったが、本研究によって、化学反応も窒素代謝へ寄与していることが明らかとなった。

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

丸山 千登勢

福井県立大学生物資源学部
c-maruyama@fpu.ac.jp

目的：近年、一部の微生物が生命活動に必須な一次代謝であるタンパク質翻訳システムからアミノアシル-tRNA^{アミノ酸} (aa-tRNA^{aa}) をハイジャックし、抗生物質などの二次代謝産物を生合成することが認められた。最近申請者らにおいても、放線菌が aa-tRNA^{aa} 依存的なアミド合成酵素により抗生物質を生合成していることを見出した。本酵素 Orf11 は、Gly-tRNA^{Gly} を基質として利用し、抗生物質 glycythricin (GT) における Gly 側鎖のアミド合成を触媒することを明らかにした。タンパク質翻訳システムにおいては、Gly-tRNA^{Gly} を含め 20 種の aa-tRNA^{aa} が存在する。従って Orf11 ホモログ酵素の中に Gly 以外の aa-tRNA^{aa} を基質として認識する同様の酵素が存在すれば、『tRNA 依存型アミド合成酵素における tRNA 基質認識機構の解明』が可能である。実際に、放線菌ゲノム情報より Orf11 に高い相同性を示す酵素遺伝子を探索したところ、最近 Orf11 ホモログ酵素遺伝子 *sba18* を新たに見出した。そこで本研究では、Sba18 組換え酵素を用いた tRNA 基質認識機構の解明を試みた。

方法：大腸菌由来の aa-tRNA^{aa} を基質に、Sba18 組換え酵素による *in vitro* 反応を行い、Sba18 の基質を網羅的に探索した。次に Sba18 の tRNA^{aa} 構造に対する基質認識機構を詳細に理解するために tRNA^{aa} を *in vitro* 合成し、人工 RNA 触媒 Flexizyme を用いてアミノアシル化した人工基質 Gly-tRNA^{aa} を基質に酵素反応を行った。

結果・考察：Sba18 組換え酵素による *in vitro* 反応の結果、Sba18 は Gly-tRNA^{Gly} だけでなく Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質認識することが判明し、新規 GT 類縁化合物の酵素合成に成功した。さらに人工合成した aa-tRNA^{aa}、Gly-tRNA^{Gly}、Gly-tRNA^{Ala}、Gly-tRNA^{Ser} を基質とした反応では、Sba18 は全ての Gly-tRNA^{aa} を基質認

識し、GTを生成した。また興味深いことに、tRNA^{Gly}の acceptor stem 構造のみからなる tRNA mimic 基質 Microhelix RNA を基質とした場合においても、Sba18はGTを生成したことから、Sba18の tRNA^{Aaa} 基質認識には、acceptor stem 構造が重要であることが判明した。従って Orf11と Sba18は高い相同性（75%）を示しながらその基質特異性は大きく異なり、Sba18は広い基質特異性を有するアミド合成酵素であることを明らかにした。

分裂酵母における細胞壁ホメオスタシスの 化学遺伝学的解析

西村 慎一

東京大学大学院農学生命科学研究科
anshin@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

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

方法：分裂酵母のほぼ全てのタンパク質（約5000）について整備されている、蛍光タンパク質との融合タンパク質の発現株コレクションを用いて、蛍光顕微鏡下で細胞内局在を観察した。

結果・考察：セオネラミドは分裂酵母細胞の成長端及び隔壁周辺の細胞膜エルゴステロールに結合する。タンパク質の細胞内局在データベースによると約350のタンパク質が細胞表層に、約130のタンパク質が細胞の成長端と隔壁部分に局在すると注釈されている。それらについて一株ずつ、セオネラミドを処理して細胞内局在の変化を観察したところ、100余りのタンパク質が局在変化を示すことを見出した。それらを局在変化パターンによって4つのグループに分類して集計すると、30余りのもの

のがセオネラミドによる細胞壁の異常蓄積部位にリクルートされ（グループ1）、別の30余りのものは細胞表層から細胞内に局在を変化させた（グループ2）。約10のタンパク質は細胞表層にとどまるものの、壁異常個所から排除されていた（グループ3）。残りの30余りについてはそれ以外の局在変化を示した（グループ4）。それぞれのグループについて構成因子をタンパク質間相互作用情報や Gene Ontology により解析すると、グループ1のタンパク質には細胞骨格形成に関連するものが濃縮されていることが示された。別な実験からセオネラミドの処理によりいくつかのグルカン合成酵素が細胞壁異常部位に集積することが分かっており、これは細胞骨格の変調に起因する可能性が考えられる。一方、細胞壁成分の分析では、細胞壁中の1,3-β-グルカンの比率がセオネラミドの処理時間依存的に上昇することが明らかになった。今後、細胞骨格関連因子を含むグループ1に含まれるタンパク質の1,3-β-グルカン合成における機能を解明することで、真菌の細胞壁合成の全貌と詳細を理解したい。また、グループ2にはトランスポーターが濃縮されており、抗真菌化合物セオネラミドの作用機序の新たな側面の存在が示唆された。グループ3および4については有意な機能や構造の濃縮は見られていないが、セオネラミドが標的にするエルゴステロールとの機能的な関連があるはずであり、今後、詳細な解析を行う予定である。

自然界からは未発見の有用アミノ酸 脱水素酵素の酵素工学的創製

櫻庭 春彦

香川大学農学部
sakuraba.haruhiko@kagawa-u.ac.jp

目的：本研究では酵素の構造情報を踏まえ、産業に有用なD-グルタミン酸、D-フェニルアラニンおよびL-トリプトファンなどの合成に利用できる人工アミノ酸脱水素酵素を創製することを目的とした。

方法：2種のアミノ酸脱水素酵素を対象に、基質特異性を変換した人工酵素の創製を検討した。対象とする酵素

は *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) から作成した人工 D-アミノ酸脱水素酵素 (DAADH) と L-フェニルアラニン脱水素酵素 (L-PheDH) である。これらの酵素は好熱菌由来で高い安定性を保持する。DAADH は、主に分岐鎖 D-アミノ酸や D-リジンなどに高い活性を示し、逆反応を利用してこれらを 1 ステップで合成できるが、他の D-アミノ酸に対する反応性が低くその利用が限られる。L-トリプトファン脱水素酵素 (L-TrpDH) はラン藻などに存在するが、不安定で利用が困難である。我々が見出した耐熱性 L-PheDH は弱いながらも L-トリプトファンに対する反応性を示す。この 2 つの酵素の基質結合ポケットを形成するアミノ酸に変異を加え基質特異性の改変を図った。

結果・考察：DAADH の構造解析 (アポ型：5gz1) を行い、*Symbiobacterium thermophilum* 由来の DAPDH の構造 (NADPH/基質結合型：3wbf) と比較すると Asp94 が基質結合部位の一部を形成する可能性が示された。D94A を作成したところ変異酵素は基質特異性を大きく変え、D-フェニルアラニンに対する活性が親酵素と比べて約 50 倍上昇した。また、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファンに対する活性も上昇していた。基質結合ポケットの拡大と疎水性の増大により、かさ高い側鎖を持つ疎水性 D-アミノ酸に対する反応性が上昇したと考えられる。一方、DAADH および D94A は D-グルタミン酸に全く反応性を示さない。*Clostridium symbiosum* 由来 L-グルタミン酸脱水素酵素の構造 (基質結合型：1bgv) を参考に D-グルタミン酸に活性を示す変異酵素の候補として、D94A/W148K 二重変異体と D94A/W148K/D124S 三重変異体を作製した。その結果、三重変異体は D-グルタミン酸に対する反応性を獲得した。また好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来 L-PheDH の構造解析 (アポ型) を行い、すでに構造を明らかにしている常温性ラン藻 *Nostoc punctiforme* 由来の L-TrpDH (アポ型：5b37) と比較したところ、L-PheDH において基質の側鎖周辺に存在する Leu50 および Leu313 が、L-TrpDH ではメチオニンに置換されていた。L-PheDH の L50M/L313M 変異体を作製したところ、L-トリプト

ファンに対する反応性が上昇した。

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

東村 泰希

石川県立大学生物資源環境学部
yasuki@ishikawa-pu.ac.jp

目的：大腸管腔は、粘液分泌細胞から分泌された粘液で覆われており、有害な微生物やその代謝物から宿主を保護するバリア層を形成している。悪質な食習慣に伴うバリア機能の低下が叫ばれる昨今、本邦における大腸がんや潰瘍性大腸炎などの罹患率は劇的に上昇している。マウスを用いたこれまでの研究において、我々は、腸内に生育する *Bifidobacterium* 属細菌の中に、粘液分泌細胞からの粘液産生を促進する働きを有する細菌がいる可能性を見出している。従って、本研究では、腸粘液産生を促進する *Bifidobacterium* 属細菌の同定とその作用機序の解明を目的とした。

方法：ヒトおよびげっ歯類の腸内に存在する 12 菌種の *Bifidobacterium* 属細菌を用いた。培養した各菌について、粘液産生能を有するヒト大腸がん細胞株である LS174T 細胞との共培養を実施した。評価項目としては、ムチン糖鎖を標的としたアルシアンブルー染色および過ヨウ素酸シッフ染色、大腸粘液を構成する主要タンパク質である Mucin 2 (MUC2) の発現変動を指標とした定量的 PCR 法およびレポーターアッセイ系を用いた。レポーターアッセイ系に関しては、ヒト *MUC2* プロモーター領域 (-1131~+20) を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを作製し、*MUC2* の発現変動をルシフェラーゼ活性として測定した。また、LS174T 細胞からの粘液産生促進におけるポジティブコントロールとして Notch 経路阻害剤である LY411575 (LY) を使用した。

結果・考察：LS174T 細胞を LY の存在下で 6 日間の培養することで粘液分泌細胞への分化を促進させた。得られ

た細胞をアルシアンブルー染色および過ヨウ素酸シッフ染色で染色した。画像解析による染色面積の評価ならびに、細胞破碎液を用いた吸光度測定をおこなった結果、上述の染色法を用いた解析ではLYによる分化促進作用を検出することができなかった。続いて、*MUC2*の発現変動を指標とした定量的PCR法およびレポーターアッセイ系を用いて、LYの分化促進効果を評価した。その結果、LY存在下において、*MUC2* mRNA発現およびルシフェラーゼ活性の有意な上昇が確認された。以上の結果より、当該評価系は粘液産生促進を有する *Bifidobacterium* 属細菌の探索に際して効果的なスクリーニング系であることが示唆された。従って、各 *Bifidobacterium* 属細菌と共培養したLS174T細胞において、当該評価系を用いて *MUC2* の発現変動を解析した。その結果、*MUC2* mRNAの発現レベルを有意に亢進させる細菌として、*Bifidobacterium angulatum* と *Bifidobacterium faecale* を同定した。今後は、有効成分の同定ならびに作用機序の解明を目指す。

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

浅水 俊平

東京大学大学院農学生命科学研究科
asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

目的：放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) はミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 (Tp) の細胞間接触を介した刺激に应答し、赤色二次代謝産物 (RED) を生産する。この微生物間相互作用には異属細菌の細胞間接触が要求されることから未知の機構が存在することが示唆された。本研究では順遺伝学的手法を用い、すなわち *S. coelicolor* の RED 生産応答性変異株を選抜、ゲノム中の変異点を同定し、更にその遺伝学的解析から応答機構に関与する原因遺伝子の同定を目指した。

方法：重イオンビーム ($^{12}\text{C}^{5+}$) 照射により作製した変異胞子ライブラリー (約 15 万個) より 59 株の RED 応答生産に異常を示した変異株をスクリーニングにより選

抜した。このうち 16 株について次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンス解析を行った。この 16 株からは応答機構に直接的に関与する有望な原因遺伝子を見出すことが出来なかった。そこで、59 株の表現型の再評価を行った後、形質の安定した 51 株の中で未解析の 26 株についてゲノムリシーケンス解析を更に行い、変異点が確認された遺伝子について遺伝子相補及び標的遺伝子破壊による確認を行った。

結果・考察：変異点の同定及びその遺伝子相補を行い、最初の 16 変異株のリシーケンス解析では、グルタミン酸合成酵素 (*gltB*)、翻訳伸長因子 (*fasA*)、機能未知膜蛋白質 (*sarA*) の遺伝子相補実験の結果、表現型の回復が確認でき、RED 生産応答に異常を起こす原因遺伝子であることが示唆された。次の 26 変異株のリシーケンス解析では、モリブドプテリン合成酵素 (*moeA*)、機能未知 TetR 様転写制御因子 (*sco1718*) の遺伝子相補実験の結果、表現型の回復が確認できた。この中で転写制御因子と推定された TetR 様蛋白質遺伝子について注目し、標的遺伝子破壊株を作製し、野生型株との表現型の比較解析を行った。その結果、破壊株ではランダム変異株と同様に、生育能に変化はなく RED 生産が遅延する表現型が確認された。またバイオインフォマティクス解析の結果などから本 TetR 様蛋白質は低分子化合物をリガンドとするリプレッサー蛋白質であると推定され、近傍に存在する ABC 輸送体の転写抑制を担うと考えられた。つまり変異株では ABC 輸送体が構成的に発現していることが予想され、なんらかの低分子化合物が排出されていることが考えられた。以上の結果から、複合培養では Tp の接触依存的な作用により *S. coelicolor* 細胞内に未知小分子が蓄積し、それがストレスとなり RED 生産が起こる機構の存在が示唆された。今後は応答機構の全容の解明に向けてまずは ABC 輸送体により排出される未知小分子の同定を行う予定である。

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

谷 元 洋

九州大学大学院理学研究院
tani@chem.kyushu-univ.jp

目的：近年、スフィンゴ脂質の疎水性部の構造であるセラミドの産業応用に大変注目が集まっている。本研究では、出芽酵母を用いたセラミド大量生産の基盤技術構築を目指した。酵母にセラミドを大量に蓄積させるためには、スフィンゴ脂質代謝系を大きく改変する必要があるが、代謝バランスに変動が生じると致死となる。我々は、これまでにスフィンゴ脂質の代謝系が破綻すると高浸透圧ストレス応答経路（HOG 経路）が活性化され、代謝破綻に対する防御応答をしていることを見出している。この防御応答機構を強化できれば、セラミドを大量生産できる酵母の創成に繋がるのが期待される。そこで、スフィンゴ脂質代謝破綻下における HOG 経路の救済メカニズムを明らかにすることを試みた。

方法：複合スフィンゴ脂質合成酵素遺伝子 (*AUR1*) の発現抑制によって生育阻害を誘導した際に HOG 経路依存的に転写が増大する遺伝子を DNA マイクロアレイによって網羅的に検索した。特に発現誘導の高かった遺伝子に関して、*AUR1* 発現抑制株に過剰発現させ、生育阻害抑制能の評価をおこなった。

結果・考察：*AUR1* 発現抑制下で HOG 経路依存的な発現が上昇する遺伝子 30 個の中から、過剰発現によって生育を補填（救済）する遺伝子として、機能未知の *FMP48*, *UIP4* 遺伝子を同定した。*UIP4* 過剰発現による生育補填効果は、*FMP48* 欠損によって見られなくなったが、*UIP4* 欠損は *FMP48* 過剰発現の生育補填効果に影響を及ぼさなかった。このことより、Fmp48 と Uip4 は共同で救済に寄与するが、Fmp48 が主要な役割を担うことが示唆された。*AUR1* 発現抑制下で Fmp48 は HOG 経路の MAP kinase (Hog1) とその下流の転写因子である Msn2/4 を介して発現が上昇することが確認された。

一方で、*AUR1* 発現抑制下では活性酸素種 (ROS) の増加が観察されることが以前から知られていた。今回、ミトコンドリア呼吸鎖欠失変異株 (*rho^o*) では、*AUR1* 発現抑制による ROS 増加及び生育阻害効果が弱まることが新たに判明し、ROS の発生源がミトコンドリアであることが示唆された。さらに *FMP48* 過剰発現は、*AUR1* 発現抑制下での ROS の増加を抑制することが分かった。Fmp48 は転写調節因子である Mks1 と相互作用することが、網羅的タンパク質相互作用解析でわかっている。*AUR1* 発現抑制下での *FMP48* 過剰発現による生育補填効果および ROS の抑制効果は、*MKS1* 欠損で見られなくなった。これらのことより、酵母は *AUR1* 発現抑制下で HOG 経路依存的に Fmp48 の発現を上昇させ、Mks1 を介してミトコンドリア由来の ROS の増加を抑制していることが考えられた。

光による大腸菌組換えタンパク質 大量発現系の開発

華 岡 光 正

千葉大学大学院園芸学研究所
mhanaoka@faculty.chiba-u.jp

目的：大腸菌を用いた組換えタンパク質の大量発現系は、現在も広く利用され多くの実績がある。しかし、この技術の基盤となる転写誘導系については、今のところバリエーションは少なく、薬剤処理などによる従来法に加え、簡便で発現効率の高い新たな技術の創出が期待される。本研究では、光合成微生物であるシアノバクテリアの光応答転写制御系をさらに明らかにするとともに、その知見を利用して大腸菌における組換えタンパク質の発現を光で誘導することができる「光発現システム」の開発を目的とした。

方法：本研究では、光依存的な発現調節に関わる転写因子として、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 のレスポンスレギュレーター RpaB に着目した。*S. elongatus* を様々な光強度で培養した後、より強い光条件にシフトした際の遺伝子発現パターンと RpaB

のリン酸化状態の変化を調べた。また RpaB を中心に、その標的プロモーターや対応するセンサーキナーゼなどを導入した大腸菌を作出し、RpaB による光発現誘導システムの構築を試みた。

結果・考察：これまでの研究で、RpaB は強光ストレス応答に関わることが示されている。通常条件では RpaB はリン酸化され *hliA* など標的遺伝子のプロモーターに結合し転写を抑制するが、強光条件では速やかに脱リン酸化され転写が開始することから、発現系における優れたリプレッサーとしての利用が期待された。しかし、RpaB が活性酸素など光ストレスに応答するのか、あるいは光自身に応答するのかわからないため、多様な光強度変化に際した転写制御を詳細に調べた。その結果、強光のみならず、暗→明や弱光→通常光など他の光条件においても *hliA* などの発現が上昇し、それに伴い RpaB が脱リン酸化されることを明らかにした。続いて、これらの知見も踏まえ、大腸菌における光発現誘導系の構築を行った。RpaB に対するセンサーキナーゼは NblS であることが示されているため、NblS・RpaB を恒常的に発現させるとともに、RpaB に認識されるプロモーターの下流に目的遺伝子が連結されるようなプラスミドを作出した。一方、NblS は強光に伴って生じる酸化ストレスや光合成レドックスの変化により調節される可能性も指摘されているため、光環境を直接認識する別のセンサーキナーゼ Cph1 にも着目し、N 末端の光認識ドメインは Cph1、C 末端のキナーゼドメインは NblS というキメラセンサーを発現させる複数のプラスミドも作出し、大腸菌に導入した。これらの系において、光による目的遺伝子の発現誘導を一定のレベルで検出することに成功したが、誘導効率や安定性には多少の課題が残され、光照射条件や発現誘導のタイミング、あるいはプロモーター配列の改変など、実験条件のさらなる最適化が必要であると考えられた。

酸素耐性ビフィズス菌が有する 抗酸化機構の解明

山本裕司

北里大学獣医学部
yyamamot@vmas.kitasato-u.ac.jp

目的： *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。ビフィズス菌の中には、*Bifidobacterium asteroides* や *Bifidobacterium indicum* のように SOD やカタラーゼを持ち、酸素に耐性を示す菌種も報告されているが、*B. animalis* は両酵素を持たず、なぜ酸素に耐性を示すかわかっていない。本研究では、*B. animalis* JCM 10602 株より酸素感受性株と耐性株を分離し、それらの性状を解析することで、本菌の抗酸化機構の解明を試みた。

方法：酸素感受性株と耐性株の分離には変異剤である 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine を用いた。酸素感受性株については、大気下で振盪培養した際の増殖能が低下した株を取得した。酸素耐性株については、通常寒天培地上でコロニーを形成できない微好気条件下でもコロニーを形成できる株を分離した。分離株のゲノム解析には Illumina HiSeq を用いた。また、もう一つの解析手法として、酸素に感受性を示す *Bifidobacterium longum* 105A 株に *B. animalis* のゲノムライブラリーを導入し、大気下での生育能あるいは低温生残性を向上させる遺伝子を選抜した。

結果・考察：酸素感受性株については、振盪培養時の増殖能が有意に低下した株を 5 株取得することができた。取得した 5 株のゲノムを解析した結果、3 株で共通して細胞壁合成系遺伝子に、1 株でストレス耐性への関与が報告されている *clpP* 遺伝子に変異が認められた。同定された遺伝子の野生型遺伝子をそれぞれの酸素感受性株に導入したところ、好気条件下での生育能が回復したことから、これらの遺伝子が酸素耐性に寄与していることが確認された。また、細胞壁合成系遺伝子に変異が認めら

れた株は、リゾチームやペニシリンに感受性を示し、細胞壁に何らかの異常が生じていると推定された。酸素耐性株については、取得した3株のうち、2株で共通して転写制御因子Xに変異が見られ、酸素耐性への関与が示唆された。酸素に感受性を示す *B. longum* 105A株を用いたスクリーニングでは、*B. longum* 105A株の生育能を向上させる遺伝子を取得することはできなかったが、低温生残性を向上させる遺伝子としてジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を同定することに成功した。

以上より、細胞壁やClpPの正常な機能を保つことが *B. animalis* の酸素耐性に寄与していることが明らかとなった。また、ジヒドロ葉酸還元酵素が大気下の生残性の維持に関与することが見出された。本研究で同定された遺伝子は酸素耐性との関係について不明なものが多いことから、今後さらに解析を進めることで、*B. animalis* の抗酸化機構の解明につながると期待される。

海洋性紅色光合成細菌による バイオポリエステル生産システムの開発

樋口 美栄子

理化学研究所環境資源科学研究センター
mieko.higuchi@riken.jp

目的：海洋性紅色光合成細菌は、二酸化炭素固定と窒素固定を行うことが知られており、地球上に豊富に存在する海水を原材料とし、太陽エネルギーを利用できる、環境負荷低減のための理想的な生物生産システムである。また、バイオプラスチックの一種であるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）合成を行う微生物のひとつである。しかし、紅色光合成細菌の二酸化炭素と窒素固定反応が、どれくらい生育に寄与するのか、またPHA生産にどのように影響するのかは精査されていない。そこで、海洋性の紅色光合成細菌（*Rhodovulum sulfidophilum*）のPHA生産について解析した。

方法：紅色光合成細菌の培養光には、近赤外光（730, 800, 850nm）のLEDを用いた。生育は濁度（OD₆₆₀）により測定し、PHA量はガスクロマトグラフィー質量

分析計により測定した。

結果・考察：培養光は、生育とPHA生産のいずれにおいても800nmの照射が有効であった。ピルビン酸とリンゴ酸を炭素源として培養すると、好気培養ではPHAを生産しないが、酢酸ナトリウムを添加するとPHA生産量が大きく増加することを発見した。好気培養時の遺伝子発現解析を行った結果、TCAサイクルの主要な酵素の発現レベルが低下しており、TCAサイクルの低下によりPHAが生産されないことが示唆された。また炭素代謝などの制御に関与する転写因子の転写量が、酢酸の添加により強く誘導されており、酢酸誘導性のPHA生産の制御に関与していることが示唆された。

二酸化炭素を炭素源とした生育について、複数の還元剤と炭酸水素ナトリウムの濃度の効果を検証したところ、8mMチオ硫酸ナトリウムと20mM炭酸水素ナトリウムの存在下で、最も良い生育を示した。さらに、安定同位体標識した炭酸水素ナトリウムのアミノ酸への取り込みを調べた結果、どのアミノ酸へも炭酸水素ナトリウムが取り込まれていた。また炭酸水素ナトリウムを炭素源としたPHA生産を検証し、チオ硫酸ナトリウム濃度の増加により、PHA生産も増加することを見出した。

窒素固定能検証のため、窒素ガスを唯一の窒素源とした条件における生育を観察した結果、数株の紅色光合成細菌について生育が認められた。窒素のアンモニアへの変換を触媒するニトロゲナーゼの活性を評価した結果、窒素制限条件下でよい生育を示した株は、高いニトロゲナーゼ活性を示した。またニトロゲナーゼ欠損株は窒素ガスのみでは生育できなかったことから、ニトロゲナーゼによる窒素固定により生育することが示唆された。窒素固定培養条件におけるPHA生産を解析した結果、リンゴ酸を炭素源とするとPHAを生産しないが、酢酸を炭素源とするとPHAを生産することを見出した。

このように海洋性紅色光合成細菌は、窒素、二酸化炭素、光を利用した環境負荷の軽減に貢献できる物質生産システムとなり得る微生物であることが示された。

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

若井 暁

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科,
現 海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門
wakais@jamstec.go.jp

目的：再生可能エネルギーを利用した物質生産技術は、持続可能社会形成に重要なピースの一つである。本研究では、金属腐食を加速させる鉄腐食性メタン生成菌の固体金属から電子を受け取ってメタンガスを生産するという能力に注目し、再生可能エネルギーの一つである光エネルギーを利用した光駆動型の二酸化炭素変換技術を開発することを目的とした。

方法：本実験には、鉄腐食性メタン生成菌 *Methanococcus maripaludis* NBRC 102054 (KA1 株) を使用した。本菌は、水素をエネルギー源として培養できることに加えて、金属鉄を電子供与体として培養することも可能である。耐食性の高いステンレス鋼板 (SUS316: 30×10×0.1mm) にエナメル被覆銅線を接続し、絶縁シリコン樹脂で露出面が2cm²残るように被覆して電極を作成した。このステンレス鋼電極に鉄腐食性メタン生成菌を固定化して作用極とし、白金ワイヤーあるいは純鉄試験片で作成した対極を太陽電池 (単結晶シリコン, 最大出力1.9W) に接続し、通電後のガス生産量をガスクロマトグラフィーにより分析した。

結果・考察：これまでの研究により、鉄腐食性メタン生成菌は金属鉄を用いて生育する際に著量の付着物が金属表面や培養瓶の内壁に形成されることが分かっており、この能力を用いて電極表面への固定化を検討した。ステンレス鋼電極を浸漬し、金属鉄顆粒を用いて鉄腐食性メタン生成菌を培養することで、電極表面に固定することに成功した。

一槽式電気化学セルを想定した対照実験として、嫌気瓶中に固定化処理をしていないステンレス鋼電極と対極を浸漬し、通電した。対極に白金を用いた結果、気相部に水素が有意に検出されたが、同時に酸素も検出された。

酸素発生はメタン菌に有害であるため、対極を純鉄試験片電極とすることで、陽極反応をガス発生から金属鉄の溶解反応へと置換した。次に、鉄腐食性メタン生成菌固定化電極と純鉄試験片電極を太陽電池に接続して通電した結果、気相にメタンが確認された。したがって、当初目標としていた光エネルギー駆動による二酸化炭素からのメタン生成に成功したと言える。一方で、副産物として著量の水素も検出された。これは、ステンレス鋼電極の露出面が小さく、固定化されているメタン生成菌のメタン生成速度を超過して過剰な電流が流れたことにより水素が生じたと考えられる。

最後に、二槽式電気化学セルを用い、対極を白金電極としたシステムも構築した。電極からの気泡の発生は確認できたが、電気化学セル全容量が大き過ぎて気相部にメタンを検出することが出来なかった。陽極の劣化消失を防ぐためには二槽式電気化学セルを用いた耐食性の高い電極を使う必要があるが、今後、鉄腐食性メタン生成菌固定化電極の表面積拡張や単位面積当たりの固定化量の増加、細胞外電子伝達系の高発現株の作成などにより、二槽式電気化学セルでの高効率生産が可能であると考えている。

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

渡邊 崇人

京都大学生存圏研究所
takahito@rish.kyoto-u.ac.jp

目的：我々はこれまでに土壤中より *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属を始めとするピフェニル/ポリ塩化ピフェニル (PCB) 分解細菌を十数株単離し、それらの遺伝生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた。その結果、これらの細菌は、ピフェニル/PCB 等の環境汚染物質だけでなく、様々な芳香族化合物の分解・代謝に関与する遺伝子を有していると予想された。一方、これらの環境汚染物質分解細菌は新規な芳香族化合物分解系を獲得し

た末端リグニン分解細菌の一種とも考えられている。本研究は、リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産を行う上でビフェニル/PCB分解細菌を利用できるのかどうか、その可能性について探ることを目的とした。

方法：ゲノム解析を終了した12株のビフェニル/PCB分解細菌について、様々なリグニン由来の芳香族化合物等に対する資化性を調べ、資化性が良好である株を選抜した。その選抜した株については、基質（芳香族化合物）を添加及び非添加の条件で培養後、調製したタンパク質を異なる波長を持つ2種類の蛍光色素でそれぞれ標識し、蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動に供した。泳動後、それぞれの蛍光波長でゲルイメージを異なる色で取得し、これらを重ね合わせることで発現量に差があると予想されるタンパク質を優先的にペプチドマスフィンガープリンティング法により同定した。一方、ゲノム解析や今回得られたプロテオミクスの情報により、リグニン由来の芳香族化合物の分解等に有用と推定される遺伝子については、個々にクローニングし、大腸菌や*Rhodococcus*属細菌の発現系を用いて異種発現を行った。

結果・考察：今回用いたビフェニル/PCB分解細菌のリグニン由来の芳香族化合物の資化性については、種や株によって大きく異なることが分かった。その内、比較的多くの基質を資化する株について蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動に供した結果、発現量の変化を視覚的に捉えることや基質添加によって誘導されるタンパク質を容易に特定でき、さらに、質量分析及びデータベース検索による同定も可能となった。同定できたタンパク質を推定される機能によって分類した結果、芳香族化合物の分解・代謝酵素や輸送等に関与するタンパク質が多かった。一方、今回用いたビフェニル/PCB分解細菌より、リグニンの化学結合様式で最も多いβ-O-4結合の開裂に有用と推定される細菌由来のリグニンペルオキシダーゼ遺伝子を複数発見し、高発現に成功した。以上、ゲノム情報の精査やプロテオミクスを詳細に行うことにより、ビフェニル/PCB分解細菌は芳香族化合物の分解・代謝に有用な酵素や遺伝子を数多く有することがより明

確となり、リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産への利用価値が高まると考えられる。

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

宮田直幸

秋田県立大学生物資源科学部
nmiyata@akita-pu.ac.jp

目的：有害化合物である1,4-ジオキサン（以下、DIOX）を含有する廃水や汚染地下水を効率的に浄化できる生物処理技術の開発が求められている。本研究では埋立処分場の浸出水処理槽において、流入濃度約2mg/LのDIOXが生物分解されていることに着目した。この生物処理槽におけるDIOX分解の仕組みを明らかにすることで、生物処理槽の安定で効率的な運転管理手法の構築につながるほか、新たな生物処理技術の提案にもつながると期待された。本研究では、この生物処理槽のDIOX分解を担う微生物群集の機能を明らかにすることを目的とした。

方法：埋立処分場の浸出水生物処理槽から採取した生物汚泥混合液をジャーファメンターに入れ、DIOX濃度を6mg/Lに調整した浸出水を流入させて20℃で連続培養した。途中で流入水のアンモニア態窒素または亜硝酸態窒素を上昇させて馴養汚泥を調製した。DIOX濃度はガスクロマトグラフ質量分析装置で定量した。生物汚泥による同化量を調べる実験では¹³C標識DIOXを添加し、生物汚泥に取り込まれた¹³C含量を安定同位体質量分析装置で測定した。生物汚泥の細菌叢は、全DNAを抽出した後、プライマー515F及び806Rを用いて16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、Illumina Miseqで解析した。

結果・考察：採取した生物汚泥の回分培養の結果、硝化阻害剤1-アрил-2-チオウレア（ATU）の添加によりDIOX分解が大きく阻害されることが判明した。生物汚泥の連続培養では、アンモニア態窒素の流入濃度を20～80mg/Lに上昇させるとDIOX除去速度が2～3倍に増加したが、亜硝酸態窒素の流入濃度を上昇させても

DIOX 分解速度はほとんど増加しなかった。一方で、アンモニア馴養汚泥の回分培養では、ATU 添加により DIOX 分解は大きく阻害されるものの、ATU 添加時でも依然として無添加時の 59% の除去速度が示され、DIOX 分解におけるアンモニア酸化菌及びそれ以外の微生物の寄与率はそれぞれ 41%、59% と見積もられた。アンモニア馴養汚泥を用いた ^{13}C 標識 DIOX の分解試験において、4 日間で分解された DIOX の 24% に相当する炭素が生物汚泥に同化された。先の分解試験と同様に、ATU 添加でも約 60% の DIOX が分解されたが、ATU 添加時の炭素同化量は 8% 程度に留まり、ATU 無添加時の 1/3 にまで減少することが明らかになった。即ち、DIOX 分解におけるアンモニア酸化菌の寄与率は約 40% で他の分解菌の寄与率の方が大きい、生物汚泥による同化量と比較するとアンモニア酸化菌の寄与が 2/3 (=約 70%) を占めていた。細菌叢解析の結果、アンモニア馴養汚泥では DIOX 除去速度がアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas ureae* ($r=0.71$; $p<0.01$) 及び従属栄養細菌 *Pandoraea* sp. ($r=0.84$; $p<0.01$) の検出割合と高い相関を示した。以上の結果から、低濃度 DIOX の分解資化においてアンモニア酸化菌が関与し得るとの新しい知見が得られた。今後、アンモニア酸化菌が関与して生物汚泥による同化に至るまでの経路を解明する必要がある。

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

有馬 二郎

鳥取大学農学部
arima@tottori-u.ac.jp

目的：キチンは生理活性物質の材料やセルロースに次ぐ次世代バイオマス資源としての利用に期待されている多糖であるが、その分解には煩雑な作業や環境負荷を伴い、未だ有効利用には至っていない。我々はこれまでに、カニ殻堆肥からキチンを迅速に分解する放線菌

Cellulosimicrobium sp. NTK2 (以下 NTK2 株) を単離した。NTK2 株は、8 つのキチナーゼ遺伝子と 2 つのキチン結合タンパク質 (CBP) 遺伝子を持つ。本研究では、NTK2 株やその遺伝資源を利用した穏和な環境でのキチン分解、分解物/キチナーゼの有効利用の実現を目指し、NTK2 株の特性や NTK2 株が持つキチナーゼの能力について評価した。

方法：NTK2 株の培養は 25℃ で好氣的に行い、培地として ISP1 (必要に応じてキチンパウダー (CP) 等を添加) または、2% キチン廃棄物 (水道水) を使用した。タンパク質の同定は、N 末解析結果をゲノム情報と照らし合わせた。キチナーゼ活性の評価には、エチレンジグリコールキチン (EGC) を基質としたザイモグラフィー、CP、EGC、キチンナノファイバー (CNF) との反応後の還元末端増加、*p*-nitrophenyl chitobiose ((GlcNAc)₂-pNP) に対する pNP 遊離活性、キチンオリゴ糖 (COS) 分解後の TLC を採用した。胞子発芽抑制試験には、*Alternaria brassicicola* の胞子を使用した。

結果・考察：NTK2 株を 2% CP 存在下で培養すると、著しく生育が向上し、複数のタンパク質の分泌と高い EGC 分解活性 (ザイモグラフィー) が見られた。分泌されたタンパク質の N 末解析から、4 種のキチナーゼ、CBP、2 種の Bacterial solute binding protein が同定された。また、2% キチン廃棄物 (カニ殻、イカ中骨、シイタケ柄) を培地として NTK2 株を培養しても良好な生育と廃棄物の分解がみられ、培養上清の SDS-PAGE やザイモグラフィーから、分泌されるタンパク質は廃棄物ごとで差が見られた。特にカニ殻で培養すると、NTK2 株は 2 種のプロテアーゼも分泌し、これらはカニ殻を構成するタンパク質分解に関わると考えられた。一方で NTK2 株は、グルコースやデキストリンの濃度に比例して生育が阻害された。8 つのキチナーゼの組換え酵素を構築し、(GlcNAc)₂-pNP、COS、EGC、CNF、CP に対する反応性を調べた結果、7 つについてはいずれかの基質に対して反応性を示し、それぞれで基質特異性は異なっていた。また、いずれの酵素も CP に対する分解活性が見られなかったが、全ての組換え酵素を混合すると、

比較的高い分解活性が観察された。さらには、5つの組換え酵素は、キャベツ黒すす病原菌 *A. brassicicola* の胞子発芽も抑制した。

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

原 清 敬

静岡県立大学食品栄養科学部
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

目的：酵母に代謝工学的な改良を施し、様々な有用物質の発酵生産性を向上させる研究が行われている。しかし、目的物質の生産性が向上するにつれ、酵母が細胞内エネルギー不足に陥り、生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちに直面することが少なくない。これは、発酵そのものが、インプットである炭素源を、「細胞自身の材料」、「目的生産物」、「細胞内エネルギー」の3つのアウトプットに振り分けるプロセスであり、これらがトレードオフの関係にあることに、根本的な原因が存在すると考えられる。そこで我々は、この三つ巴の状態にある発酵プロセスから「細胞内エネルギー」を切り離すべく、本来は光エネルギーを利用できない酵母への光エネルギー利用能の付与を目的とした。

方法：本研究では有用物質生産によく用いられる出芽酵母を宿主として用いた。また、そのATP再生を活性化させるために、高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* がもつ光駆動型プロトンポンプの一種であるデルタロドプシンを出芽酵母のミトコンドリア膜に発現させた。デルタロドプシンのミトコンドリア膜での特異的発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した。ATPレベルは、ルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いて測定した。また、生産される際にATPを消費するファインケミカルのモデルとして、グルタチオンを生産物の指標としてDTNB法を用いて測定した。

結果・考察：現在グルタチオンは、出芽酵母を用いて生産される場合が多い。出芽酵母のミトコンドリア膜にデ

ルタロドプシンを発現させたところ、ATPレベルが向上した。これは、ミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系に加え、デルタロドプシンにもプロトン濃度勾配を形成させることで、ATPレベルが向上したと考えられる。つぎに、この出芽酵母の細胞膜に、以前に発表者らがグルタチオン排出トランスポーターであることを見出したGxa1を発現させ、光受容分子 (all-trans-retinal) を含む最少培地にて、光を照射しながら培養した。その結果、細胞内グルタチオン濃度の上昇だけでなく、細胞外グルタチオン濃度の上昇も観察された。グルタチオンの生合成とABCトランスポーターであるGxa1によるグルタチオンの細胞外への排出にはATPの消費を伴うため、細胞内および細胞外のグルタチオン濃度の向上は、デルタロドプシン発現によりATP再生が活性化されたことに起因すると考えられる。

1 細胞解析による遺伝子発現ノイズ
制御機構の網羅的解明

宮 崎 亮

産業技術総合研究所生物プロセス研究部門
ryo.miyazaki@aist.go.jp

目的：近年の1細胞解析技術の進展によって、同一条件で培養したクローン細胞集団であっても個々の細胞レベルの表現型は均一でないことが明らかとなってきた。そのような1細胞レベルの表現型の不均一性がクローン集団内に機能的多様性と柔軟性を生み出し、集団全体のストレス耐性や物質代謝など様々な環境適応能力を促進させることも報告されている。一方で、遺伝子発現ノイズは全生物・全細胞・全遺伝子で起こる普遍的な現象であるにも関わらず、その制御機構を網羅的に解明した例は皆無である。そこで本研究では、環境細菌をモデルとして進化実験、ゲノミクス、マイクロ工学を統合したアプローチにより遺伝子発現ノイズの制御因子をゲノムワイドに同定し、その制御機構の解明を目的とした。

方法：まず、一般モデル生物の *Escherichia coli* MG1655 (大腸菌) と病原菌モデルの *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

(緑膿菌) のゲノムから必須遺伝子と非必須遺伝子をそれぞれ複数選び、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子との転写融合レポーター株を構築した。遺伝子発現を正確に定量するために、レポーター断片は染色体の同一部位に1コピーとなるように挿入した。各遺伝子の発現量ならびにノイズ (Coefficient of Variation) は、セルソーターを用いて同一培養条件・同一成長期の約10万細胞から測定した。次に、セルソーターを用いて遺伝子発現量の平均値周辺5%の細胞集団の継続的分取、あるいは両端5%の集団の交互分取を繰り返すことによって、遺伝子発現ノイズが野生型の値から変化した進化変異株の取得を試みた。変異部位の同定は、進化変異株の全ゲノムリシーケンスによって行った。最後に、進化変異株で見つかった変異を相同組換えによって野生型株 (MG1655 および PAO1) に再導入し、遺伝子発現ノイズを制御する因子の同定を試みた。

結果・考察：約1ヶ月の進化実験を経て、MG1655株の非必須遺伝子の発現ノイズが低下した進化株が3株、PAO1株の必須遺伝子の発現ノイズが低下した進化株が1株ならびに非必須遺伝子の発現ノイズが上昇した進化株が1株得られた。これら進化株の全ゲノムをリシーケンスし野生型株のゲノムと比較したところ、各進化株のゲノムに複数の点変異または欠失が見つかった。そこで、これらの変異の中から非同義置換や明らかに影響がないと考えられる非コード領域の変異等を除き、遺伝子アノテーション情報を精査したところ、興味深いことに、各進化株に特異的な変異だけでなく、複数の進化株に共通するオルソログ遺伝子 (すなわち普遍的に遺伝子発現ノイズを制御すると考えられる因子) にも変異が認められた。これらの中から実際に遺伝子発現ノイズに影響を与えている変異を同定するため、野生型株において各変異を個別に相同組換えによって導入し、計6株 (大腸菌3株、緑膿菌3株) の再変異株の作製に成功した。現在、これら再変異株の遺伝子発現ノイズをセルソーターおよびタイムラプス顕微鏡により測定しており、遺伝子発現ノイズ制御因子の同定を試みている。

微生物により生成される 高蓄電ミネラルの生成機構解明

二又裕之

静岡大学グリーン科学技術研究所
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

目的：バイオマスの有効利活用とグリーンエネルギーの創製は、循環型低炭素社会の構築に向けて必須の課題である。本研究室において微生物燃料電池負電極上より分離された硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株と AY-IV 株は、系統学的に非常に近縁であるにも関わらず、有機物分解に伴い電気化学的特性が異なる蓄電ミネラルを生成した。そこで本研究では、両菌株の蓄電ミネラル生成機構を明らかにし、微生物学的知見の深化と新規蓄電部材開発に資することを目的とした。

方法：ゲノムデータをベースに硫酸還元に関わる遺伝子を選抜し比較した。微生物が生成したミネラルはXRD、EDXおよびFE-SEM等による物質科学的解析を実施した。カーボングラファイトを負電極とする微生物燃料電池を構築し電気化学的解析を実施した。

結果・考察：Average Nucleotide Identity (ANI) 解析の結果、HK-II株およびAY-IV株のゲノム間の相同性は99.99%であった。HK-II株由来のMackinawiteは襞構造を有する数十 μm サイズの箔片である一方、HK-IV由来のMackinawiteは数十 μm サイズの箔片上に半球状の構造体が観察された。Mackinawite生成に関与すると推定される硫化水素生成速度の影響が考えられた。そこで硫酸還元代謝遺伝子を比較解析した結果、両菌株とも各種遺伝子が100%一致しておりゲノム情報から生成機構の糸口を探ることは困難であった。

AY-IV株が生成する蓄電物質 (RBM-IV) の充放電容量は、HK-II株が生産するそれ (RBM-II) と比較して2.3倍高かった。SEM観察から、RBM-IIは数~数十 μm の襞状構造を有し、RBM-IVではそれに加え数十~数百nmの粒子が確認された。EDX解析から、RBM-IIおよびRBM-IV中の鉄および硫黄の構成割合は、それぞれ55.1%および67.4%であった。以上の結果から、これら

のRBM-IIおよびRBM-IVの充放電容量が異なる要因として、物質の形状および構成元素の違いが考えられた。今後、RBM-IVにのみ確認された100nmの粒子や微量元素が充放電容量に及ぼす影響について解析する必要がある。一方、硫酸を最終電子受容体とする硫酸還元条件下でHK-II株を培養した際、本株は不完全酸化型代謝のために電子供与体の乳酸を酢酸に変換し細胞外に排出する。一方で、細胞外電子伝達時にはこの酢酸の再利用が可能であった。この結果より、HK-II株は細胞外の電位を感知し代謝を変換可能であることが示された。

以上の結果から、本研究では近縁の微生物株が生成する蓄電性ミネラルの特性を明らかにし、微生物の電気的代謝制御の可能性を示した。今後、蓄電機構の解明、細胞外電子伝達機構および電気的代謝変換機構の解明を進める予定である。

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

森 一 博

山梨大学大学院総合研究部
mori@yamanashi.ac.jp

目的：各種分解菌に着目した有害化学物質の代謝機構の解明と水質浄化への応用が広く研究されているが、浄化系での生物吸着の作用機作とその応用はあまり検討されていない。ここでは、様々な環境試料から各種芳香族化合物を特異的に吸着する細菌を分離し、特にビスフェノールA (BPA) に高い吸着効果を示した菌株を用いて、分解菌や活性汚泥との併用による水質浄化効果の向上の可能性を検討した。

方法：各種環境試料より栄養培地を用いて網羅的に細菌を分離した後、各分離株の菌体と各種芳香族化合物を液中で混合する吸着試験において優れた吸着除去効果を示す株を選抜した。続いて、特にBPAに対して優れた吸着効果を示した菌株と、既往研究において取得されたBPA分解菌 *Novosphingobium* sp. FID3 を以後の水質浄化

試験に用いた。BPA浄化試験は、吸着菌と分解菌を各々単独または混合条件で懸濁させた系にBPAを添加することで行った。試料は経時的に採取し、遠心分離による上澄液中のBPA (液中BPA) と、回収菌体を溶媒で洗浄することで回収されたBPA (菌体吸着BPA) をそれぞれ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により経時的に測定した。さらに、BPAで長期間馴養した活性汚泥に吸着菌を導入し、BPA含有人工排水を用いる場合も含めて同様の浄化試験を行った。

結果・考察：環境試料からの各分離菌株による芳香族化合物吸着試験の結果、除去効果は菌株により大きく異なっていた。この中から菌体濃度OD₆₀₀で1.0、BPA初期濃度0.1mMとした吸着試験において10分以内にBPA濃度を50%低減し、濃度を適宜変えた試験からFreundlichの吸着等温式に従うと共に、広いpHと温度、混在する有機物などの環境条件下で安定した吸着特性を示す株を選抜した。なお、液中から除去された菌体吸着BPAは菌体を溶媒で洗浄することで容易に回収できることを確認している。続いて、吸着菌や分解菌を用いたBPA浄化試験を行った。BPA吸着菌を単独でBPA含有水に懸濁させた場合は、菌体への吸着により短時間の内に液中BPA濃度が減少し、以後、試験終了まで変化は見られなかったが、供試分解菌単独の系では生分解作用により徐々に液中BPA濃度が低下した。一方、両者を混合した系では、速やかに液中BPA濃度及び菌体吸着BPA量が減少し、系内の全残存BPA量の消失も分解菌単独の系よりも飛躍的に高まることが観察され、吸着菌が分解菌の作用を向上させることが明らかとなった。続いて、馴養活性汚泥と吸着菌の混合系で除去試験を行ったところ、吸着菌の添加によりBPA濃度の低減が馴養活性汚泥単独の場合よりも促進され、吸着作用をもつ微生物が活性汚泥の機能向上に寄与することが示された。

軽油相当の炭化水素を大量生産可能な
シアノバクテリアの創出

新井宗仁

東京大学大学院総合文化研究科
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

目的：シアノバクテリアは、アシル ACP 還元酵素(AAR)とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ(ADO)という2つの酵素を用い、光合成によって軽油相当の炭化水素を合成できることから、地球温暖化の防止に有効な再生可能バイオエネルギーの生産源として注目されている。これらの酵素を、大腸菌に導入すると炭化水素を生産可能になることから、AARとADOは微生物を利用した炭化水素生産に必須である。しかし、AARとADOの活性は低いため、両酵素の高活性化が急務である。そこで本研究では、AARとADOの高活性型変異体を創出し、軽油相当の炭化水素を大量生産可能なシアノバクテリアの創出を目指した。

方法：AARの活性を測定する際には、AARの反応が律速段階となる条件でADOとともに大腸菌内で共発現させ、生産された炭化水素(ヘプタデセンもしくはペンタデカン)をガスクロマトグラフ質量分析計で定量した。また、大腸菌内の可溶性画分に存在するAARの量(可溶性AAR量)をSDS-PAGEやウェスタンブロットで定量した。そして、炭化水素生産量を可溶性AAR量で割った値を活性とした。ADOや各変異体の活性も同様に測定した。最後に、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に両酵素の遺伝子を導入して培養後、合成された炭化水素を定量した。

結果・考察：まず、AARの高機能化変異体を構築した。代表的なシアノバクテリア12種類がもつAARを比較した結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942由来のAARが最も高活性だった。また、淡水性よりも海洋性のシアノバクテリアに由来するAARのほうが炭素数の少ないアルカンを多く生産した。次に、低活性型AARのアミノ酸配列を、高活性型AARに近づけるようにして、1アミノ酸置換変異体を約80個作製した。その結果、AAR

の活性や可溶性AAR量を増大させ、炭化水素生産性を向上させる上で重要なアミノ酸残基を6つ見出した。これらの多重変異体を26種作製したところ、これまでで最も高活性なAAR変異体の創出に成功した。

同様に、酵素ADOの高機能化に取り組んだ。その結果、PCC 7942に由来するADOが最も高活性だった。また、37個の1アミノ酸置換変異体を作製した変異解析により、ADOの高活性化に重要なアミノ酸部位を20か所見出し、可溶性ADO量を増大させる変異の同定にも成功した。さらに、ADOがAARから基質を受け取る際に、AARと結合する部位を同定した。

最後に、上記の高活性型AARとADOを多様な組み合わせで導入したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の変異株を24種類作製した結果、軽油相当の炭化水素の生産量が野生型株よりも5倍以上向上したシアノバクテリアの創出に成功した。

2017年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2017年4月～2020年3月

結晶性酸化鉄を還元する新規な微生物の 分離培養と代謝メカニズムの解明

青 柳 智

石巻専修大学共創研究センター、
現 産業技術総合研究所環境創生研究部門
aoyagi-to@aist.go.jp

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

方法：鉄還元能を有する分離菌 6 種 [*Geobacter* spp. (AOG1, AOG2, AOG3, AOG4, AOG5), *Desulfuromonas* sp. (AOP6)] を結晶性酸化鉄 [4 種：Goethite, Hematite, Lepidocrocite, Magnetite (10 または 20mM)] を電子受容体、酢酸 (5mM) を電子供与体として用いて 1 ヶ月間培養し、独自に最適化した高濃度塩酸での鉄抽出法による二価鉄の生成量を評価し、生理学的に特徴付けた。さらに、分離菌 6 種の鉄還元メカニズムを明らかにすべく、2 種 (メイトペアとペアドエンド) の DNA ライブラリを作成し、ゲノム解読を実施した。一方で、未培養の新しい微生物を獲得するため、水田や森林などの陸域土壌および海底下コアサンプルを微生物接種源に、酢酸と結晶性酸化鉄にて約 100 の条件で培養を開始した。4 年以上集積培養を継続した培養系を対象に、微生物 16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンサー解析を実施し、その結果に基づいて限界希釈培養および難利用性の結晶性鉄から易利用性の溶解性鉄へ培養基質の置換を行い、高度に集積させた標的微生物の生育を促進させて純粋培養系の構築を行った。

結果・考察：生理試験の結果、分離菌 6 種は結晶性酸化鉄に対して還元活性を示し、特に AOG1 株および AOG5

株では既知鉄還元菌 *Geobacter sulfurreducens* や *Geobacter bemidjensis* と比べて 2~4 倍の二価鉄の生成が観察された。このことは、分離菌がこれまで知られていない細胞外への電子伝達機構を有することを強く示唆している。ドラフトゲノム配列解読の結果、分離菌のゲノムサイズは各々 3.68MB (AOG1 株), 3.92MB (AOG2 株), 4.48MB (AOG3 株), 4.31MB (AOG5 株), 3.27 MB (AOP6 株) であり、細胞外電子伝達の主要な機構として知られるシトクロム *c* や導電性ナノワイヤーと推察される線毛遺伝子の保有が確認された。新しい電子伝達機構は未知遺伝子が関与する可能性が高いと想定されるため、ゲノム情報と結晶性酸化鉄での培養試験を融合させた比較ゲノムや網羅的遺伝子発現解析により、分離菌の鉄還元メカニズムの解明を進めてゆく。

一方、結晶性酸化鉄での集積培養系では、溶解性鉄での培養では全く得られない新規な *Proteobacteria* 門や *Firmicutes* 門などに属する微生物が高度に集積していた。30 の高度集積系を対象に、酢酸と溶解性鉄での限界希釈培養および共存する主要な微生物が利用できないと想定された炭素源 (糖類) と溶解性鉄での培養系も用意し、希釈培養を複数回実施した結果、*Firmicutes* 門に属する 2 種の純粋培養に成功した。これらの新しい分離菌も未知の細胞外電子伝達メカニズム解明へ向けた手掛かりになるだろう。

発酵研究所助成研究報告集 第34号【非売品】

令和2年12月10日 印刷

令和2年12月20日 発行

編集委員長 横田 明
編集委員 大島敏久, 加藤暢夫, 金子嘉信
高橋洋子, 藤田正憲

発行人 樽井直樹

発行所 公益財団法人発酵研究所
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

TEL. 06 - 6300 - 6555

FAX. 06 - 6300 - 6814

印刷所 日本印刷出版株式会社
大阪市福島区玉川4丁目7-13