

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 36



2 0 2 2

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	左子 芳彦 鈴木健一朗 原山 重明 松下 一信	清水 昌 原島 俊 古川 謙介 横田 篤	
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	藤田 正憲	1
-----	-------	---

■ 2020年度大型研究助成

単細胞紅藻シズンにおけるゲノム編集とマルチプレックスオルガネラ イメージングを実現するハイスループット遺伝子改変技術の確立	吉田 大和	3
環境中の未培養原生生物種の1細胞ゲノム解読手法の確立	本郷 裕一	15
電気で微生物の代謝を制御する：電気遺伝学の創生	渡邊 一哉	29
海洋分解性プラスチックの基材開発に資する アーキアポリ- γ -グルタミン酸	芦内 誠	35
植物バイオマス生産を制御する微生物由来気相コミュニケーション 物質に関する包括的研究	上田 晃弘	43
ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による 高効率クエン酸生産糸状菌の育種	桐村光太郎	51

■ 2016年度寄付講座助成

細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と環境細菌の高度利用 および未開拓潜在機能開発への応用		
細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と環境細菌の高度利用 および未開拓潜在機能開発への応用	永田 裕二	63
特殊性の高い遺伝子の起源と細菌がそれら遺伝子を 獲得する機構	加藤 広海, 永田 裕二	75
脱ハロゲン酵素の機能進化	佐藤優花里, 永田 裕二	93
細菌の環境適応・進化に関する細胞機能	佐藤優花里, 永田 裕二	109
細菌集団の形成と進化	矢野 大和, 加藤 広海, 永田 裕二	123

■ 2020年度 一般研究助成

国内の異なる積雪環境に適応した担子菌ガマノホタケ科 Typhulaceae の多様性とその環境適応能の評価	星野 保	139
Fungi 界に特有なペプチド性化合物生合成因子の生物学的機能解明	梅村 舞子	140
難培養微生物の培養を目指した新規共培養法の構築	雪 真弘	141
一大未知生物群“深海・外洋性ディプロネマ類”の実体と 多様性の理解, および分類体系の整理	矢吹 彬憲	142
白癬菌における分類体系の再検討と薬剤耐性との関連性に関する研究	山田 剛	143
好熱性シアノバクテリアの系統分類体系と菌株コレクションの確立	春田 伸	144
酢酸菌群の光に対する適応応答の包括的理解	高野 英晃	145
脂質非対称バイオセンサーの開発を通じた生体膜研究の ボトルネック解消と細胞外物理化学変数の感知機構に関する 新奇概念の提唱	小原 圭介	146
病原性細菌における毒素遺伝子保有ファージを誘発する因子 およびファージ獲得機構の解析	島村 裕子	147
腸内細菌科細菌における新規カルバペネム高度耐性機構の解明	多田 達哉	148
オートファジーから逃れるタンパク質の網羅的解析	古川健太郎	149
細菌べん毛成長端の機能構造解析に基づくべん毛形成機構の解明	今田 勝巳	150
液胞よる染色体・核小体の核内配置制御の解析	丑丸 敬史	151
糖消費速度をモニタリングするフラックスセンサーの探索	柘植 陽太	152
耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> の高温下での脂質代謝変化の解析	星田 尚司	153
海藻(褐藻)分解小動物の腸管と腸内複合微生物の 協同による褐藻の完全分解系の解明	河井 重幸	154
昆虫共生細菌による殺虫剤の腸内解毒機構の解明	菊池 義智	155
低グルコースに対する分裂酵母の適応戦略	中岡 秀憲	156
新規機能性 DNA 断片を介した酵母の適正なゲノム構造維持機構の解明	飯田 哲史	157
ゲノム DNA は, 細菌細胞内ではどのように折りたたまれているのか: HU タンパク質による細菌ゲノム DNA 折り畳み機構	大島 拓	158
グラム陽性菌に見いだされた新規電子受容体と超低栄養生育との関連性	吉田 信行	159

一細胞力学操作を用いた病原性細菌の細胞侵入における定量的解析： 細菌感染を支配する力学的メカニズムの解明……………	久保田寛顕	160
好熱性細菌 <i>Thermus thermophilus</i> におけるコエンザイム A 生合成経路の制御機構の解明と CoA 製造への応用 ……	本田 孝祐	161
植物免疫を活性化する微生物の新規評価法の確立と探索への応用……………	古屋 俊樹	162
バイオ医薬品の次世代製造宿主を指向した 光発現誘導システム導入ブレビバチルス菌の創製……………	浅野竜太郎	163
長期間持続可能なインジゴ還元発酵液の新規調整方法の開発……………	湯本 勳	164
病原性細菌の毒素産生を阻害するプロバイオティクスの探索 ならびにその作用機構の解明……………	野田 正文	165
酵母 FLO assay を基盤とした真菌二次代謝産物からの エピジェネティック機能探索……………	杉山 圭一	166
発酵食品中の微生物間相互作用を仲介する酵母プリオン様因子 [GAR ⁺] の作用機序に関する研究 ……	渡辺 大輔	167
柑橘類の優れた芳香族化合物生産能を利用した酵母による <i>trans</i> -ケイ皮酸の発酵生産 ……	大橋 貴生	168
Nrf2/SKN-1 制御系を活性化する乳酸菌体成分の探索と長寿機構の解明 ……	小村 智美	169
進化解析に基づく高機能 PET 加水分解酵素の創出 ……	吉田 昭介	170
乳酸菌が産生する菌体外多糖の免疫増強活性に寄与する 酵素の構造基盤の解明……………	松崎 千秋	171
共生微生物によるダイズ黒根腐病防除機構の解明……………	岡崎 伸	172
新概念「電子伝達体キノンの構成改変による代謝調節」の実証……………	中澤 昌美	173
リグニンの主要結合を開裂する微生物の探索とリグニンからの ポリマー原料生産への応用……………	上村 直史	174
単一の細胞が精巧で微小な構造物を構築する原理の解明……………	野村 真未	175

■ 2019年度若手研究者助成

彩雪をもたらす氷雪性緑藻の種の全世界的な解明：
培養株の多面的解析と野外サンプルとの比較分子解析……………松崎 令 177

■ 2020年度若手研究者助成

少数細菌の検出を可能とする深層化 16S メタゲノム解析法の開発 …………… 後藤 愛那 179

グラム陰性菌外膜タンパク質アセンブリー機構の解析……………塩田 拓也 180

原核微生物が持つエピジェネティクスの理解に向けた
海洋細菌群集の DNA メチル化修飾の系統網羅的解析 …………… 平岡 聡史 181

病原性染色体による宿主特異性の決定・分化機構の解明……………鮎川 侑 182

大腸菌の外膜品質管理に関わる 2 機能性タンパク質 BepA の
基質認識・選別機構の解明……………宮崎 亮次 183

DPANN 群に属する新奇アーキアの共生機構の解明……………酒井 博之 184

巻 頭 言

藤 田 正 憲*

最近、国内の任期付き研究者が大量に雇止めになり、研究に支障をきたすようになる、また日本の科学技術論文数が減り、世界ランキングを落としている、など景気の悪いニュースが目についた。そこで、世界の研究開発費（OECD 調べ）を見ると、GDPとおなじで3位であるが、人口当たりで換算するとなんと14位となる。論文は総数では4位であるが、注目論文数になるとインドに抜かれ10位となっている。法人化後、運営費交付金が漸減し、特に教育研究費に困っている地方国立大学教員の話聞くが、上記の統計がそれを裏付けているかもしれない。お金があってもいい研究はできないと反論されそうであるが、微生物学に関する研究でも、最新の研究設備を駆使しなければ、世界トップレベルの研究成果を出せない場合が多い。

質の高い論文をGDPランキングと同じレベルで発表し続けるという命題を即席で解決する方法は浮かばないが、研究費が多ければ最新設備購入等にも余裕ができ、注目される論文作成につながると考えられる。国内の公募研究費の種類は多いが、研究者当たりの額が先に述べたように少ないのであれば、研究費獲得の手段として企業との共同研究が考えられる。例えば大阪大学には「大阪大学共創機構」があり、企業と学内研究者との共同研究や起業化を推進している。その共同研究支援室長に企業を退職して就任した教え子のK君がいる。仕事内容は大学内の研究成果を企業と結び付け、実用化等のための共同研究のお手伝いをするのである。一定の要件を満たせば、大学が関与して会社を設立することも可能になっている。

自然科学特に微生物学に携わる研究者は常に実用化を意識して研究テーマを決め、実施しているとは限らない。やはり自分が興味を持っている対象や材料、あるいはそこに秘められている未知の現象の解明など、基礎的な研究に絞られることが多いだろう。現役時代、水環境分野へのバイオテクノロジーの応用を目指してきた筆者は、日本の生産が世界トップクラスであった半導体産業で大量に使われる非イオン界面活性剤の、河川汚染や下水処理場での挙動に興味を持ち、その一貫で好気環境下での分解微生物の探索を手掛けた。分解菌は普遍的に存在したが、当該物質がすべて炭酸ガスと水に分解されるのではなく、最終産物としてノニルフェノールが残った。当時カナダの大学と水環境に関するワークショップを行っており、そこで本成果を発表したところ、この物質が今欧米で話題になっている“環境ホルモン”であると指摘された（不勉強で初めて聞く言葉でした）。帰国後環境ホルモンに興味を持ち、非イオン界面活性剤とともにビスフェノールAの環境内挙動に関する研究を進めていたところ、T社の方から共同研究の申し入れが入った。私には本研究が実用化と結びつくことが理解できなかったが、T社が得意の免疫化学を用いたイムノアッセイによる簡易分析法を開発するので、共同で進めたいとのことでした。研究室では学生がHPLC、GC/MSなどの機器

*藤田正憲

大阪大学名誉教授・元国立高知工業高等専門学校長、公益財団法人発酵研究所評議員

を駆使して分析していたが、それを当たり前のように考えていたので、簡便化は思いもよらなかった発想であった。当時、水道や下水道の水質分析室には、このような高価な分析機器を整備することができなかつたのが理由である。その後実用化に結び付き、高い評価を受けた。本共同研究を通して、企業は大学とは異なった視点から、研究成果を見ていたことを勉強した。

そこでK君に、学内で共同研究をマッチングさせる立場として、なにが難しく、また進めるための心がけなどを質問した。答えは、企業は自社の事業のために必要な技術開発を、自社のみではできないあるいは自社で行うと長期間かかり好機を逃すなどと判断した場合、大学・公的研究所等との共同研究を模索する。一方、研究者は自分の研究は実用的ではないと考えているが、企業側は例えばその研究成果を応用・加工すれば、これまでにない新しい製品、サービスにつながると考える。また、企業も基礎研究を進めており、企業側の方向と一致すれば、基礎研究を発展させるために共同で実施したいと考えている。少し前に流行った“ミドリムシ”の実用化、また昆虫食が注目され始めたが、これも基礎研究の発展型といえよう。共同研究で大切なことは、シーズとしての研究と企業のニーズのマッチングであるが、すぐに学会・研究集会など、分野を同じくする研究者の集まりが思い浮かぶ。これは従来型のマッチング法で、大学という組織が係らないかつ研究者が受け身の形の共同研究であるが、近年は各大学が積極的に共同研究を推進する部局を作り、学内のシーズを掘り起こし、かつそれらを外に向けて積極的に発信することで、共同研究を促進している。もちろん、中小企業を含む企業からの相談案件にも組織的に対応しているそうである。大学も本気で外部資金を獲得する努力をしていると思った。

最近、政府は“国際卓越研究大学”構想を打ち出し、その要件が明らかになり始めた。内容は、①研究実績、②民間との連携、③財政基盤の3要件から選抜するというものである。財政基盤は、運営費公費金や授業料を除く外部資金となっている。研究は国から交付される運営費交付金や科研費だけに頼ってはならないということである。当然であるが上記3要件を満足させるためにがんばらなければならない主たる人材は、大学の構成員である教員・研究員である。

共同研究を進めるにもシーズとなる研究成果が求められるので、若手研究者には“鶏と卵”の話になってしまいそうであるが、国のみならず民間の財団等からも、優れた発想には支援の手が差し伸べられている。例えば、科研費では戦略的研究（萌芽）、若手研究、研究活動スタート支援、奨励研究など、若手を手厚く支援しているので、アイデア段階でも研究費を獲得できる。微生物学に限れば、公益財団法人発酵研究所の“一般研究助成”も、面白い発想の研究を求めている。また、本年度から実施された地方大学の“研究室助成制度”は、教育・研究財源に困っている地方の大学にとって、朗報であったといえる。

冒頭に記したように、注目論文数で代表される我が国の科学技術力が、世界のトップから置いて行かれる状況は、先進技術で維持してきた我々の生活、例えばコロナ対策を含む先進的な医療制度、ハード及びソフト面で安全・安心な都市、地域及び地球環境の保全、地球温暖化対策などに技術・財政の両面から大きな影響を与えることになるだろう。

一人当たりの研究費の少ないことに愚痴を言わず、微生物の無限の可能性を信じ、斬新な発想で研究を発展させ、そこから共同研究や起業を含め、外部資金を獲得するとともに、その成果を社会実装して世界をリードしてほしいと願っている。

2020年度大型研究助成の研究報告

助成期間：2020年4月～2022年3月

単細胞紅藻シゾンにおけるゲノム編集とマルチプレックス オルガネライメージングを実現するハイスループット 遺伝子改変技術の確立

吉田大和

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Development of a high-throughput gene targeting system consisting of CRISPR genome editing and multiplex organelle imaging in unicellular alga *Cyanidioschyzon merolae*

Yamato Yoshida

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

The simple cellular structure of the unicellular alga *Cyanidioschyzon merolae* consists of one nucleus, one mitochondrion, one chloroplast, and one peroxisome per cell and offers unique advantages to investigate mechanisms of organellar/cell proliferation and the cell cycle. In this study, we developed an engineered clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9) system, CZON-cutter, for simultaneous genome editing and organellar visualization. We engineered a *C. merolae* strain named YMT1 expressing a nuclear-localized Cas9-Venus nuclease which can cause a DNA double-strand break at a locus defined by a single-guide RNA (sgRNA). By using the YMT1 strain, we then successfully edited the *C. merolae* genome and visualized the mitochondrion and peroxisome in transformants by fluorescent protein reporters with different excitation wavelengths. Fluorescent protein labeling of organelles in living transformants allows validation of phenotypes associated with organellar proliferation and the cell cycle, even when the edited gene is essential. Combined with the exceptional biological features of *C. merolae*, CZON-cutter will be instrumental for investigating cellular and organellar division in a high-throughput manner.

Key words: CRISPR-Cas9 gene editing, multiplexed organelle imaging, rhodophyta, *Cyanidioschyzon merolae*, organelle division

緒言

地質学的な証拠に基づくと、地球上に生命が誕生したのは今から約35億年前の太古代だと考えられている (Brasier *et al.*, 2006). 地球上で誕生した最初の生物はバクテリアやアーキアといった原核生物であったが、約21億年前の原生代には真核生物が誕生した (Strasser *et al.*, 2021). 真核生物が誕生してから最初の10億年の間に、地球を実験場とした壮大な細胞生物学的な挑戦が試みられ、門や綱を超えた分類群である8つのスーパーグループを構成するに至った (Burki *et al.*, 2020). なぜ、

真核生物は原核生物が成し遂げられなかったこのような爆発的な進化を遂げることができたのか。この理由の一つとして、ミトコンドリアや葉緑体と言った細胞内共生オルガネラを獲得したことによる細胞構造の革新が挙げられる (Mereschkowsky, 1905; Gray, 1992). これらのオルガネラは細胞に膨大な生体エネルギーを供給し、真核生物が多様な遺伝子を保持することを可能とし、新たな細胞機能を創出することに繋がったと考えられる (Lane and Martin, 2010). アルファプロテオバクテリアおよびシアノバクテリアの祖先細胞による細胞内共生という進化的起源をもつため、これらのオルガネラは独自のゲノムDNAと遺伝子発現システムを備えており、細胞内で新たにゼロから創り出すことはできない (Gillham *et al.*, 1994). このため真核生物の細胞機能を維持する

E-mail: yamato.yoshida@bs.s.u-tokyo.ac.jp

ためには、これらのオルガネラの機能を制御する機構に加え、オルガネラの分裂増殖機構、さらにオルガネラの分配機構を正確に機能させることが必須となる (Kuroiwa *et al.*, 2008). しかし、過去半世紀に渡り様々なモデル生物を用いてこれらのしくみの理解を目的とした研究が行われてきたが、未だこれらの分子機構の全貌は明らかではない。

こうした真核生物の根幹をなすオルガネラの制御機構を解くため、単細胞紅藻であるシアニディオシゾンが注目されている (Kuroiwa, 1998; Matsuzaki *et al.*, 2004). シズンは、単独で生育可能な真核生物としては最小セットのオルガネラである1つの細胞核、1つのミトコンドリア、1つの葉緑体、1つのペロオキシソーム、1つのゴルジ体、数個の液胞、そして単純な形態の小胞体しか保持していない。さらにゲノム解読の結果、シズンは細胞構造だけでなく、ゲノムDNA構造も極めてシンプルであることがわかっている (Matsuzaki *et al.*, 2004; Nozaki *et al.*, 2007). ゲノムDNAは20本の染色体から構成され、全長は16.5メガ塩基対である。ゲノムにコードされた遺伝子数は真核生物としては最小の4775遺伝子のみである。さらにイントロンを含む遺伝子は僅かに14遺伝子のみであり、殆どの遺伝子がスプライシングを受けない。そして葉緑体を持つ単細胞藻類に多く見られる有用な性質として、光による明暗周期培養を行うことによって細胞周期を高度に同調化することが可能である (Suzuki *et al.*, 1994). シズンが持つこれらの特性を基盤として、これまでに多くのミトコンドリアや葉緑体の分裂制御機構の一端が明らかとなってきた (Yoshida *et al.*, 2006, 2009, 2010, 2017; Yoshida & Mogi, 2019). またこうした特性を基盤として、近年ではシズンの細胞周期トランスクリプトーム解析が行われており、そのゲノムレベルでの遺伝子発現動態が明らかとなってきた (Fujiwara *et al.*, 2009, 2020). 同トランスクリプトームデータを詳細に分析した結果、454遺伝子 (全遺伝子の9.5%) がオルガネラ・細胞分裂期に特異的に発現していることが明らかとなり、この中には真核生物に広く保存されている機能不明181遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子群には未だ知られていないオルガネラの分裂増殖・分配の制御機構に関与する鍵因子が含まれている可能性が高く、これらの全候補遺伝子を対象とした遺伝子機能解析が急務となっている。

遺伝子機能を明らかにするためには、遺伝子ターゲティング法が極めて重要な技術となる。既にシズンにおける遺伝子ターゲティング法としては相同組換え法が確立しているが、同技術の精度は高い反面、遺伝子ターゲティングを行うために必要なコンストラクトDNAを構築するための分子生物学的な作業に時間がかかるため、

解析対象遺伝子の数には制限があった (Ohnuma *et al.*, 2008; Imamura *et al.*, 2009; Fujiwara *et al.*, 2015, 2017). また、葉緑体は明視野およびクロロフィル自家蛍光によって即座に観察することが出来るが、その他のオルガネラを観察するためには、特定の蛍光染色試薬によって組織染色を行う必要がある。このため、対象となった遺伝子機能を破壊した際には、いずれのオルガネラの分裂増殖に影響が生じているのかを検証するためには複数種類の蛍光組織染色を行う必要があった。また染色による生細胞へのダメージも無視できず、長時間の蛍光タイムラプス観察は困難であった。

今回、本研究ではこれらの技術的制約を打破し、シズンを用いて真核生物におけるオルガネラ制御機構の真の分子メカニズムを解明するため、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) および Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) を基盤としたハイスループット遺伝子ターゲティングシステムの開発を試みた。確立したゲノム編集・オルガネライメージングシステム“シズン・カッター”を用いることによって、ゲノム編集と同時に複数種類のオルガネラを蛍光タンパク質によるラベル化が可能となった (Tanaka *et al.*, 2021). 同技術は高い正確性と効率性、広い汎用性、さらに圧倒的なハイスループット解析力を実現した。新たに確立したシズンの標準株 *Cyanidioschyzon merolae* YMT1に加えて、シズン・カッターを実行するための基準コンストラクトDNAである pGuide-mitoScarlet と pCer3-PTS1なども様々な研究機関へ分与しており、現在急速に同手法を利用する研究者が増加している。

実験方法

C. merolae YMT1株の作製

核局在 Venus 融合 Cas9 を恒常的に発現するシズン株を構築するため、*EF1A* プロモーター領域 (1kb)、1つ目の核局在配列 (Nuclear localization signal, NLS)、ヒトコドン最適化 *cas9*、2つ目の NLS、シズンコドン最適化 *Venus*、さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを含む DNA 配列をウラシル要求性株であるシズン M4 株へポリエチレングリコール (PEG) 法による相同組換えによって導入した。得られた形質転換体は、ウラシル要求性・クロラムフェニコール耐性となり、恒常的に核局在 *Cas9-Venus* を発現するシズン YMT1 株が得られた。

sgRNA 発現ベクターの構築

sgRNA およびミトコンドリア蛍光レポーターを発現するベクター (pGuide-mitoScarlet) を作製するため、シズンの U6 プロモーター領域と一本鎖ガイド RNA

(single guide RNA, sgRNA) スキャフォールドを含む DNA 配列を合成した。またミトコンドリア蛍光レポーターとして、シズンコドン使用率に合わせた赤色蛍光タンパク質である *mScarlet* 遺伝子に、ミトコンドリア EF-tu のミトコンドリア移行シグナルを融合した *mitoScarlet* 遺伝子を作製した。これらの DNA フラグメントを導入し、pGuide-mitoScarlet ベクターを構築した。sgRNA の先頭部分に含まれる Cas9 によって切断される標的配列は、CRISPRdirect ウェブサイト (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて決定することができる。同ウェブサイトにおいて、sgRNA 配列の特異性は、対象となるデータベースとして「Red alga (*Cyanidioschyzon merolae*) genome, ASM9120v1 (Nov, 2008)」を選択することによって検討が可能である。標的配列を含む sgRNA スキャフォールドを合成し、pGuide-mitoScarlet ベクターを DNA テンプレートとして得られた PCR アンプリコンとギブソニアセンブリによる組換えを行うことで標的配列毎の pGuide-mitoScarlet ベクターを構築した。

シズンコドンに最適化された *mCerulean3* 遺伝子にペルオキシソーム移行配列 PTS1 を融合した *perCerulean3* 遺伝子、さらに恒常発現プロモーターである *ApcC* プロモーター配列、さらに β チューブリン遺伝子 (*TUBB* 遺伝子) の 3' UTR 領域を pUC57 ベクターに組み込み、*perCerulean3* 遺伝子カセットを持つ pCer3-PTS1 ベクターを構築した。

いずれのプラスミドにおいても、PCR 増幅および DNA フラグメントの結合は、Platinum SuperFi II DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) および NEBuilder HiFi DNA assembly cloning kit (New England Biolabs) を用いた。

ゲノム編集

クリプトクロム (cryptochrome) をコードする *CRY* 遺伝子に対するゲノム編集を行うため、*CRY* 遺伝子の 232-254 塩基を標的とした sgRNA 配列を持つ pGuide-*CRY*₂₃₂₋₂₅₄-mitoScarlet をテンプレートとして sgRNA を含む DNA 配列を増幅した。得られた PCR アンプリコンに加え、さらに両端に 30 塩基の相同領域と中央に 20 塩基の改変標的領域を含む 80 塩基の一本鎖オリゴ DNA (ssODN) を混合し、シズン YMT1 株へ導入した。pGuide-*ACTIN*₂₃₉₋₂₆₁-mitoScarlet, pGuide-*MDR1*₂₅₄₋₂₇₆-mitoScarlet, pGuide-*TUBG*₈₆₃₋₈₈₅-mitoScarlet を用いた遺伝子カセットノックインに関しても、必要配列部分の PCR アンプリコンを得た。また pCer3-PTS1 を鋳型として *ACTIN* 遺伝子、*CRY* 遺伝子、ミトコンドリア分裂リング遺伝子 (*MDR1* 遺伝子)、また γ チューブリン遺伝子 (*TUBG* 遺伝子) に対する遺伝子カセットノックインを行うために

必要配列部分の PCR アンプリコンを得た。各標的遺伝子に対する遺伝子カセットノックインを行うにあたり、pGuide-mitoScarlet と pCer3-PTS1 から得られた PCR アンプリコンを混合し、シズン YMT1 へ導入した。

蛍光顕微鏡

蛍光観察を行うため、油浸対物レンズ (100 \times , NA 1.45) を備えたオリンパス IX83 倒立蛍光顕微鏡を用いた。蛍光光源は水銀ランプ (オリンパス U-HGLGPS) を使用し、光学励起フィルターとして 490-500HQ (Venus 蛍光観察), FF01-549/12-25 (*mScarlet* 蛍光観察), FF01-427/10-25 (*mCerulean3* 蛍光観察), FF01-405/10-25 (葉緑体蛍光観察) を使用した。カスタムダイクロイックミラーは Di03-R514-t1-25 \times 36 (Venus 蛍光観察), Di03-R561-t1-25 \times 36 (*mScarlet* 蛍光観察), FF458-Di02-25 \times 36 (*mCerulean3* 蛍光観察), T455lp (葉緑体蛍光観察) を使用した。蛍光フィルターは FF02-531/22-25 (Venus 蛍光観察), FF02-585/29-25 (*mScarlet* 蛍光観察), FF01-474/27-25 (*mCerulean3* 蛍光観察), FF02-617/73-25 (葉緑体蛍光観察) を使用した。観察像は Zyla 4.2 sCMOS カメラ (Andor) によって取得し、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices) によって制御した。実行ピクセルサイズは 65.2 nm \times 65.2 nm であった。

結 果

Cas9-Venus 発現シズン YMT1 株の樹立とミトコンドリアレポーターを含む sgRNA プラスミドテンプレートの開発

CRISPR および Cas9 は、近年、革命的な遺伝子改変技術として注目されている (Sander & Joung, 2014; Jiang & Doudna, 2017; Adli, 2018)。この CRISPR ゲノム編集技術は、化膿性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* から単離された *cas9* 遺伝子に由来する Cas9 スクレアーゼが、20 塩基のスペーサー配列と、3 塩基のプロトスペーサー隣接モチーフ (Proto-spacer Adjacent Motif, PAM) 配列、さらに 76 塩基のスキャフォールド配列から構成される sgRNA と複合体を形成し、標的 DNA 配列を切断するしくみを利用している (Nishimasu *et al.*, 2014)。Cas9 と一本鎖ガイド RNA によって引き起こされた DNA 二本鎖切断部位は、非相同末端修復機構 (Non-homologous end joining, NHEJ) または相同末端修復機構 (Homology-directed repair, HDR) によって修復される。この時、NHEJ は高い確率で塩基挿入あるいは欠損などを起こすため、標的となった遺伝子のオープンリーディングフレームを壊すことが期待できる。また DNA 二本鎖切断の際に外来のドナー DNA を共

存させることによって、HDRを介して標的配列の任意なDNA配列へと改変することも可能となっている。こうしたCRISPRゲノム編集技術が高い注目を集める理由の一つは、ゲノムDNAの切断という現象をsgRNAおよびCas9だけで完結することが可能であり、様々な生物種の細胞内において再現可能であることが挙げられる。

これまでシゾンにおけるゲノム編集法は確立されていなかったが、CRISPR-Cas9によるゲノム編集を基盤とした実験系を構築することによって、シゾンの全遺伝子を解析対象とすることさえも可能なハイスループット・遺伝子ターゲティング法の確立が可能であると考えた。またさらに蛍光レポーター遺伝子を使ったオルガネライメージングを組み込むことによって、遺伝子ターゲティングに加えて主要オルガネラの蛍光ラベル化を同時に実

施し、形質転換体における複数オルガネラの動態変化を即座に確認できる実験系とすることを目標とした。

同目標を達成するため、まずCas9スクレアーゼを発現するシゾン株の構築を試みた。Cas9遺伝子に核局在シグナルと黄色蛍光タンパク質Venusを融合したNLS-Cas9-NLS-Venus遺伝子をウラシル要求株(M4株)に導入し、クロラムフェニコール選抜によって形質転換体を得た(Fig.1A, B)。野生株(10D株)とYMT1株(ウラシル要求性・クロラムフェニコール耐性)を比較しても、細胞形態や細胞増殖能力に関して検出可能な異常はなく、Cas9が恒常的に発現していることによる影響はないことを確認している(Fig.1C)。こうして確立したシゾンYMT1株は、核局在Cas9-Venusによって細胞核を視認することが可能な細胞株となった(Fig.1D)。

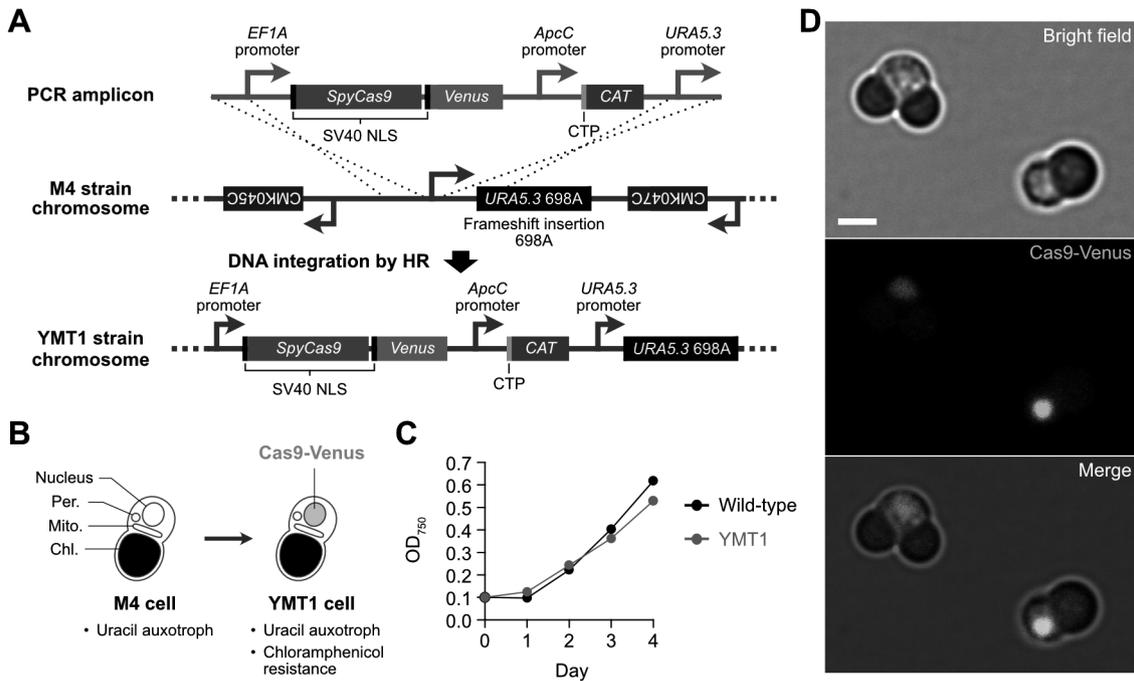


Fig. 1. Development of the *C. merolae* YMT1 strain expressing Cas9-Venus. (A) Schematic diagram of insertion of the *S. pyogenes* Cas9 gene fused to Venus (Cas9-Venus) and the selection marker *CAT* into the safe harbor site by homologous recombination. PCR amplicon, introduced linear DNA; M4 strain chromosome, genomic structure of the parental uracil-auxotrophic M4 strain, with the HR integration site. YMT1 strain chromosome, structure of the inserted *Cas9-Venus* and *CAT* cassettes in *C. merolae* strain YMT1. The *Cas9-Venus* cassette includes a 1-kb fragment of the *EF1A* promoter and 278bp of the *UBQ3* (polyubiquitin 3) 3' untranslated region (UTR) for constitutive expression. Cas9-Venus was fused to two copies of a nuclear localization sequence (NLS) from the SV40 T antigen to localize the Cas9-Venus fusion protein to the nucleus. *CAT* is driven by the constitutive *ApcC* promoter with transcription termination by the *TUBB* (β -tubulin) 3' UTR. The *CAT* coding sequence is preceded by a chloroplast transit peptide (CTP). (B) Schematic illustration of the *C. merolae* YMT1 strain. (C) Growth curves for the wild-type 10D and YMT1 strains. The 10D strain was cultured in 2 × Allen's medium. M4 and YMT1 strains were cultured in 2 × Allen's medium supplemented with uracil. Results are mean ± s.d. ($n=3$ from cell culture replicates). (D) Imaging of a dividing cell (left) and a non-dividing cell (right) of *C. merolae* YMT1 strain. Scale bar: 2 μm.

ゲノム編集を行った形質転換体を得た際に、直ぐにミトコンドリアの蛍光観察を可能とするために、sgRNAとミトコンドリアレポーターをコードするDNA配列を含むプラスミドDNAを構築した (Fig.2A). sgRNA配列は、標的となるゲノムDNA領域に相同な20塩基のスペーサー配列と、3塩基からなるPAM配列、76塩基からなるスキヤフォールド領域、さらに6塩基の転写終結シグナル配列を含む (Fig.2B). このsgRNA配列は、シズンゲノムにコードされたU6核内低分子RNAの推定プロモーター配列 (593塩基) を利用し、RNAポリメラーゼIIIによって転写されるように設計した. またミトコンドリアレポーターとしては、赤色 (橙色) 蛍光タンパク質としては現状最も高輝度かつ高光耐性として知られる *mScarlet* 遺伝子にミトコンドリア移行シグナルを融合した *mitoScarlet* 遺伝子を用いた. これら2つの遺伝子カセットを組み込んだプラスミドDNAベクターである pGuide-mitoScarlet を作製したことにより、スペーサー配列とPAM配列を含む標的DNA配列部分を入れ換えるだけで、シズンゲノム上の任意の場所をゲノム編集によってDNA配列を改変することが可能となった.

シズンにおけるCRISPRゲノム編集

シズン YMT1 株と pGuide-mitoScarlet ベクターを用いて、CRISPR-Cas9 ゲノム編集を試みた. 評価にあたりクリプトクロムをコードすると推定される *CRY* 遺伝子をゲノム編集の対象として選んだ. クリプトクロムは、ショウジョウバエなどの昆虫において概日リズムに関与する青色光受容体として機能することが知られている (Chaves *et al.*, 2011). また動物におけるクリプトクロムに関しては、青色光受容能力は失われているが、やはり概日リズムの制御機構に組み込まれている (Öztürk *et al.*, 2007). 分子系統解析を行った結果、シズンの *CRY* 遺伝子は昆虫や動物の *CRY* 遺伝子群と近縁であることが分かったため、シズンの *CRY* 遺伝子を不活性化した場合、明暗周期培養による細胞分裂の同調化が崩れることが予想された. そこで、*CRY* 遺伝子内の標的配列を Cas9 によって切断し、エラーが生じやすい NHEJ を利用したゲノムDNA配列の改変を試みた. 先ず CRISPRdirect ウェブサイト (<https://crispr.dbcls.jp/>) (Naito *et al.*, 2015) を用いて、*CRY* 遺伝子を標的とした sgRNA をデザインし pGuide-mitoScarlet-*CRY* を構築した. 僅か 16Mbp というシズンゲノムのシンプルさに

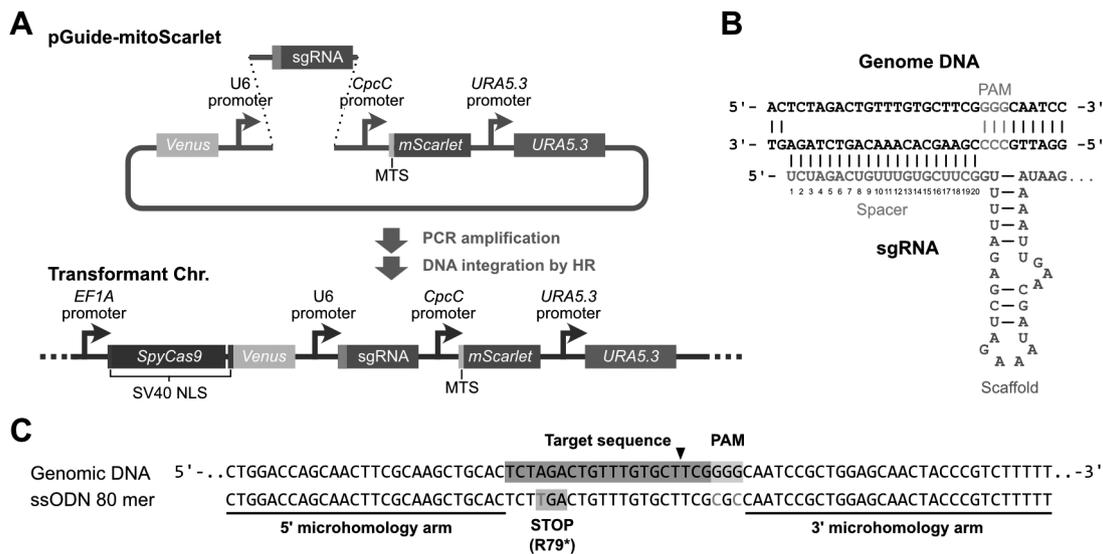


Fig. 2. Design and implementation of CRISPR-based genome editing in *Cyanidioschyzon merolae*. (A) Site-specific insertion of gene cassettes containing a sgRNA, a mitochondrion-targeted red fluorescent protein (mitoScarlet) and the selection marker *URA5.3*. A synthetic sgRNA is combined with a linearized plasmid to generate pGuide-mitoScarlet. A PCR amplicon from pGuide-mitoScarlet is then inserted into the region downstream of *Cas9-Venus* in the YMT1 strain by homologous recombination. MTS, mitochondrial targeting signal. (B) Design of the sgRNA and the target site for the *CRY* locus. (C) Principle of Cas9-mediated precise genome editing of the *CRY* locus. The arrowhead indicates the putative Cas9 cleavage site. An 80-nt single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) donor template was designed to insert a stop codon and eliminate the PAM sequence in the *CRY* locus. The ssODN contains two 30-nt homology sequences (underlined).

より、Cas9 標的配列である 20 塩基+PAM 配列を選んだ際に、意識せずとも殆どの場合にはゲノム中に 1 か所しかない配列となる。このためシロイヌナズナなどのモデル生物を使ってゲノム編集を行う場合とは大きく異なり、所謂オフターゲット（標的としている箇所以外のゲノム DNA 領域にゲノム編集が発生してしまうこと）については殆ど心配する必要が無い。これは今後、シゾンの CRISPR ゲノム編集技術を用いて分子生物学・分子遺伝学的な研究を進める際には、特に重要な利点となる。

pGuide-mitoScarlet-CRY から必要な DNA 領域を増幅し、PEG を用いたシゾン形質転換法を用いてシゾン YMT1 株へ相同組換えによる導入を試みた。しかしながら CRY 遺伝子を破壊したことによる致死性は低いと想定されるにもかかわらず、予想に反してポジティブクローンを得ることが出来なかった。さらに他の遺伝子を標的として実施した場合も、同様に同手法ではポジティブクローンを得ることができなかった。唯一、形質転換体を得られたケースは、ゲノム上に標的となる配列が存在しない“誤った sgRNA 配列”を使った場合だけであった。さらにシゾンゲノムにコードされた DNA 修復に関する遺伝子を探索した結果、シゾンゲノムには NHEJ における主要因子として知られる *Ku70* および *Ku80* 遺伝子が存在しないことがわかった。これら一連の結果を考慮すると、シゾンには NHEJ が備わっていない、あるいは NHEJ 活性が低いため、Cas9 によって DNA 二本鎖切断が生じた細胞は死滅してしまっている可能性が考えられた。一方、既にシゾンの形質転換法として利用されており、DNA 二本鎖切断修復機構として機能していることが明らかな HDR を利用したゲノム編集の可能性を検討した。HDR を利用したゲノム編集では、DNA 二本鎖切断個所の周辺配列と相同な領域（マイクロホモロジー領域）を含むドナー DNA を共存させることによって、ドナー DNA の配列に準じた修復が行われる。ランダムに生じる修復エラーに頼った NHEJ ではなく HDR による CRISPR ゲノム編集が可能であれば、「ゲノム上の DNA 配列を任意の配列へと自由に改変する」ことが可能になるため、極めて利便性が高い。HDR によるゲノム編集法を試みるため、CRY 遺伝子のオープンリーディングフレームにストップコドンを生じさせる配列（アルギニンのコドンである AGA からストップコドンである TGA に変更）と、PAM 配列を消失させた塩基配列（NGG が Cas9 認識配列なので、GGG から CGC に変更）を含む DNA をデザインした。この改変 DNA 配列の両端には、相同領域として 30 塩基程度のマイクロホモロジー領域を配置し、計 80 塩基長の ssODN をドナー DNA とした (Fig.2C)。pGuide-mitoScarlet-CRY から PCR 増幅によって得られた sgRNA およびミトコンド

アレポーターを含む DNA フラグメントと、上記 ssODN を同時にシゾン YMT1 株へ導入した結果、今度はポジティブクローンを得ることに成功した。確認した全てのポジティブクローン株において、ミトコンドリアレポーターは想定通りに機能しており、細胞核（核局在 Cas9-Venus）に加えてミトコンドリアも mitoScarlet タンパク質によって蛍光可視化されていることが確認された (Fig.3A)。以上の結果から、シゾンにおける HDR を介したゲノム編集と 2 オルガネラの蛍光可視化を同時に実施する方法が確立し、同手法を“シゾン・カッター (CZON-cutter)”と命名した。

CRISPR ゲノム編集によって構築した CRY ノックアウト株の表現型評価

シゾン・カッターによって得られた CRY ノックアウト株 (*cry*) において、概日リズムと細胞周期の進行に影響があるか、同調培養法による評価を試みた。*cry* 株との比較には、ウラシル含有培地で培養することにより代謝状態および細胞周期進行に影響を及ぼしている可能性がある YMT1 株ではなく、*cry* 株と同様の非ウラシル含有培地で培養可能な野生株 (10D 株) を用いた。光合成放射束密度をそれぞれ約 30 PFD (Photon flux density) に合わせ、10D 株と *cry* 株を 12 時間間隔の明暗周期による同調培養を行い、細胞分裂同調率を計測した。測定の結果、10D 株では細胞分裂同調率が 53.8% となった一方で *cry* 株は 28.2% となり、有意に低くなっていた (Fig.3B 左)。この結果は、CRY 遺伝子がシゾンにおいても概日リズムを制御し、細胞周期の進行に関与している可能性を示唆する。またクリプトクロムは青色光受容タンパク質であることから、次に光色による影響の評価を試みた。いずれの場合も光合成放射束密度を約 30 PFD として同調培養を行った。その結果、シゾンは赤色光のみでは殆ど同調せず、10D 株および *cry* 株の細胞分裂同調率はそれぞれ 22.4% と 22.5% に留まった (Fig.3B 右)。赤色光に加えて青色光がある場合は、10D 株では細胞分裂同調率が 53.6% となり、白色光の場合とはほぼ同じ頻度となった (Fig.3 中央)。一方、*cry* 株では 42.3% となり、10D 株と比較すると依然として有意に低いものの白色光のみの場合よりも細胞分裂同調率は高くなった。また青色光のみでは野生株も *cry* 株も殆ど増殖せず、細胞分裂同調率が測定することができなかった。これら一連の結果から、*cry* 株は青色光への応答能力が完全に失われているのではなく、低下した状態であると考えられる。シゾンにおいてもクリプトクロムが青色光受容能を持ち、概日リズムの制御に関与していることを示すと共に、今回の遺伝子ターゲティングでノックアウトした CRY 遺伝子以外に、シゾンゲノムに存在す

る他の *CRY* 様遺伝子も青色光応答を通じた概日リズムの制御に寄与している可能性が示唆される。

次に *CRY* 遺伝子をノックアウトしたことによるゲノムレベルでの転写状態への影響を評価するため、*cry* 株のトランスクリプトーム解析を行った (Fig. 3C). 遺伝子発現が変化した遺伝子群を分析すると、リーディングフレーム中にストップコドンが挿入されている *CRY* 変異遺伝子自体も遺伝子発現が上昇していることが分かった。これは *CRY* 遺伝子の正常な翻訳産物が供給されないことを検知し、*CRY* 遺伝子の転写産物量を補償する機構が働いている可能性がある。また概日リズムの制御において *CRY* 遺伝子と拮抗的に機能することが知られている *COP1* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1*) 遺伝子の発現も減少していた。これらの結果からも、シズンにおいても *CRY* 遺伝子は概日リズム制御の中核をなしていることを強く示唆する。

興味深いことに *CRY* 遺伝子をノックアウトしたことによって発現が変動した遺伝子の中には、機能が不明な遺伝子がおおよそ 40% も含まれていた。これらの遺伝子群の中には、未だ知られていない概日リズム制御の鍵因

子が存在する可能性が高いため、現在これら機能未知遺伝子群の詳細な機能解析を行っている (Fig. 3D).

シズン・カッターによる標的ゲノム領域への遺伝子カセットノックインとペルオキシソームの蛍光可視化

シズン・カッターによるゲノム編集およびオルガネラ蛍光可視化法の基本的な手法は確立したが、さらに利便性を高めるため、次に標的としたゲノム DNA 領域への遺伝子カセットノックイン法の確立を試みた。ノックイン法が確立すれば、標的遺伝子の周辺ゲノム DNA 配列を大きく改変することなく標的とする遺伝子へ任意のタグ配列を導入することも可能となるため、より野生株に近い状態の遺伝子発現状態を維持しつつ様々な細胞生物学的解析へと利用することが容易となる。青色蛍光タンパク質によるペルオキシソームレポーターをコードする遺伝子カセットを標的遺伝子領域へノックインすることによって、ペルオキシソームの蛍光可視化と標的遺伝子のノックアウトを両立させることを目標とした (Fig. 4). 遺伝子カセットノックインを実現するため、新たなプラスミド DNA コンストラクトとして pCer3-PTS1 を構築し

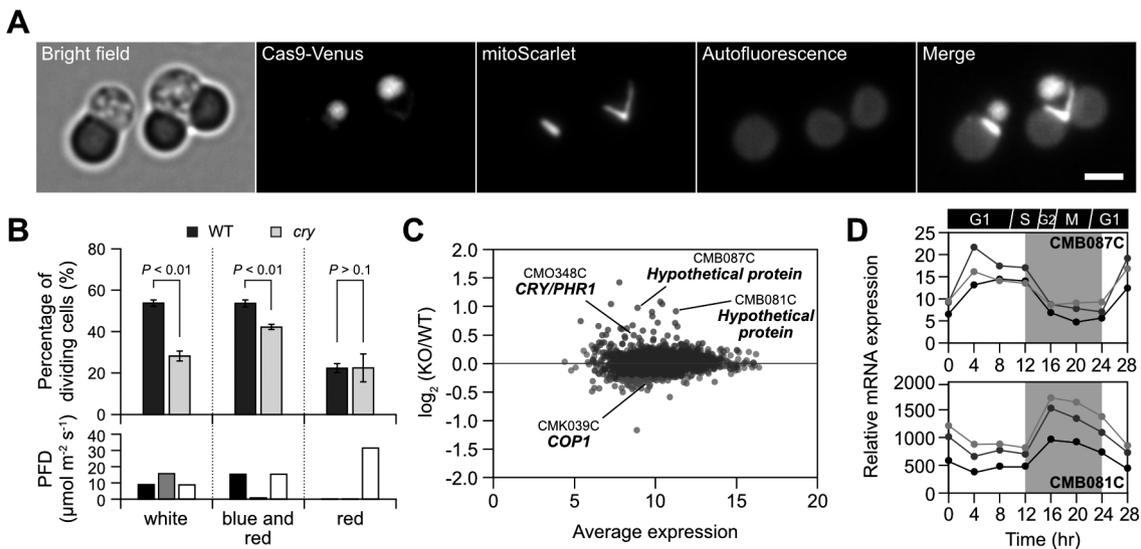


Fig. 3. *CRY*-dependent circadian clock entrainment by blue light stimuli in *Cyanidioschyzon merolae*. (A) Imaging of a non-dividing cell (left) and a dividing cell (right) in the *CRY* knockout (*cry*) strain. Scale bar: $2\mu\text{m}$. (B) Percentage of dividing cells in synchronized cultures for wild-type (WT) and *cry* strains under distinct light conditions. Total photon flux density (PFD) of blue, green, and red lights was kept at $\sim 30\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in each light condition. Data are represented as means \pm s.d. ($n=3$ from individual experiments). P -values are from a two-tailed unpaired Student's t -test. (C) MA plot of the fold-change [$\log_2(\text{KO/WT})$] versus average expression of $\log_2(\text{TPM})$ from wild-type (WT) and *cry* (KO) samples. (D) Light-dependent expression changes of CMB087C and CMB081C. Black, WT strain; gray, *CDKA* (cyclin-dependent kinase A) knockdown strain; light gray, *RBR* (retinoblastoma related) knockout strain. Mean expression values in each strain were extracted from a time course ($n=2$) (Fujiwara *et al.*, 2020).

た (Fig. 4A). また CRISPR ノックイン法の標的遺伝子として, *ACTIN* 遺伝子を選択した. これまでの研究から, シゾンの *ACTIN* 遺伝子は発現しておらず, 偽遺伝子化していると考えられている. 実際, シゾンの細胞分裂はアクチンではなく, 細胞膜リモデリング機構 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport

complex) を用いた分子機構で行われていることが示唆されている (Yagisawa *et al.*, 2020). ノックイン法によってシゾンの *ACTIN* 遺伝子発現を不可能とし, シゾンにおけるアクチンによらない細胞分裂機構の存在を直接的に示すことが出来れば, 原始的な真核生物における ESCRT を基盤としたアーキア様細胞分裂機構の存在を

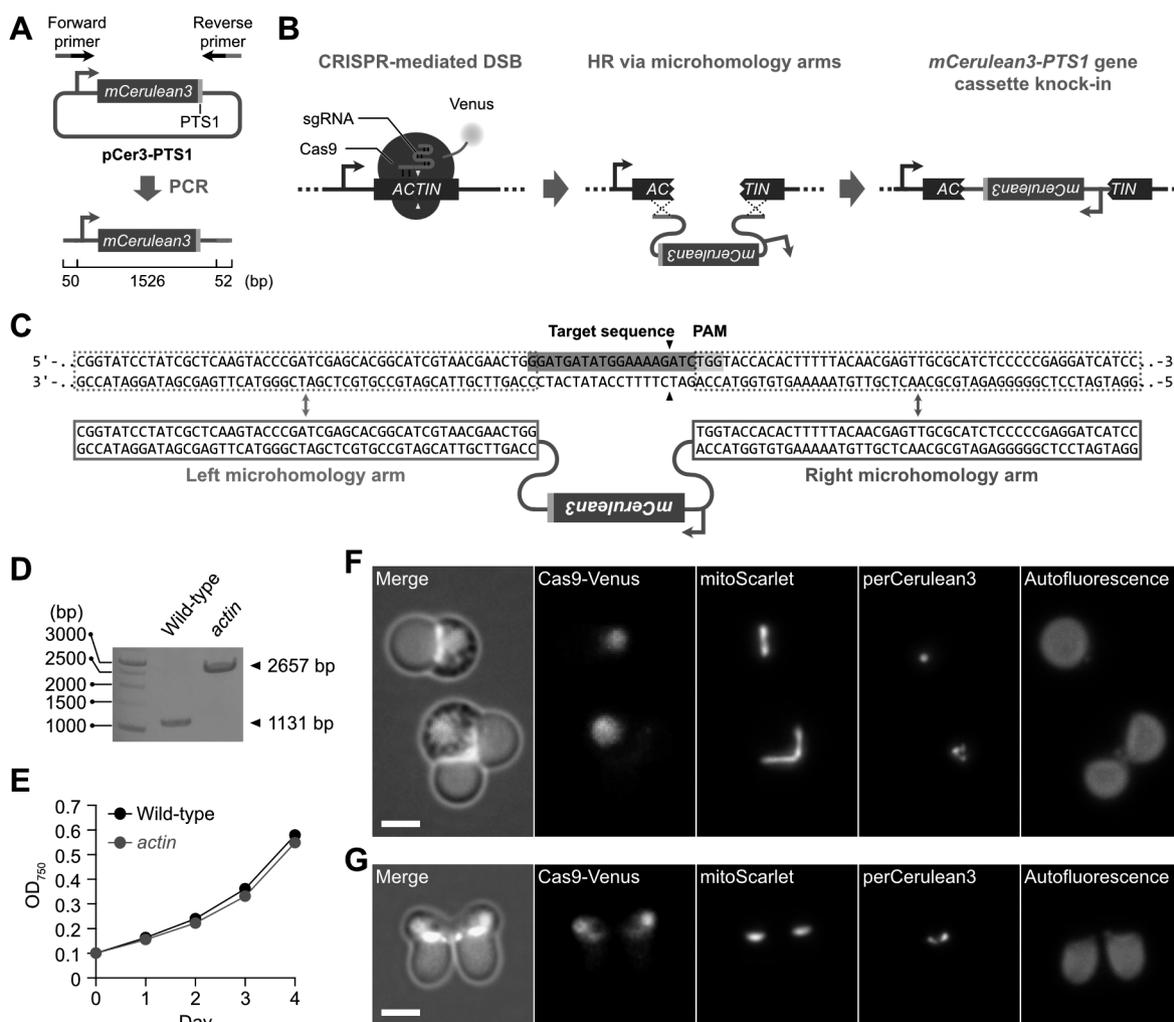


Fig. 4. Site-specific knock-in of a cassette encoding mCerulean3 fused to a peroxisomal targeting signal by CZON-cutter. (A) PCR amplification of a gene cassette encoding mCerulean3 with a peroxisomal targeting signal. The double-stranded DNA fragment containing the *ApcC* promoter, the *mCerulean3* coding sequence with a peroxisomal targeting signal (PTS1), and the *TUBB* 3' UTR and ~50-bp microhomology arms on either side (total length: 1626bp) were amplified by PCR. (B) Principle behind knocking in a fluorescent reporter expression cassette at the *ACTIN* locus. (C) Principle of Cas9-mediated gene cassette knock-in at the *ACTIN* locus. The arrowheads indicate the putative Cas9 cleavage site. Flanking microhomology sequences of the perCerulean3 cassette are shown in boxes. (D) Confirmation of the knock-in event at the *ACTIN* locus by PCR. The wild-type strain was used as a negative control. (E) Growth curves of the wild-type strain and the *ACTIN* knockout (*actin*) strain. Data are shown as means ($n=3$ from cell culture replicates). (F) Representative images of a non-dividing cell (top) and a dividing cell (bottom) of the *actin* strain. (G) Representative image of a single cell from the *actin* strain at the cytokinetic abscission stage. Scale bars: 2 μ m.

明らかにすることが出来る (Fig. 4B). pCer3-PTS1 は、恒常発現プロモーターである *ApcC* プロモーターの下流に、ペルオキシソーム移行シグナルである PTS1 を融合した青色蛍光タンパク質 *mCerulean3* 遺伝子を配置した *perCerulean3* 遺伝子カセットを含む。このプラスミド DNA テンプレートを、Cas9 で切断する標的部近傍の 50 塩基程度のマイクロホモロジー配列を含むオリゴ DNA プライマーで増幅することによって、ノックイン用の二本鎖 DNA 断片を得た (Fig. 4C). pCer3-PTS1 および pGuide-mitoScarlet-ACTIN から PCR 増幅した二種類の DNA 断片をシズン YMT1 株へ導入し、ポジティブクローンを得ることに成功した (Fig. 4D).

得られた ACTIN ノックアウト株 (*actin*) の DNA 配列をサンガーシーケンス法によって調べた結果、ACTIN 遺伝子領域の想定した位置に *perCerulean3* 遺伝子カセットが正確に挿入されていることを確認した。10D 株と *actin* 株の生育速度には有意な差は認められず、顕微鏡観察からも細胞分裂に異常は見られなかった (Fig. 4F, D). また蛍光顕微鏡法によって観察した結果、細胞核 (黄色: Venus), ミトコンドリア (橙色: mitoScarlet), 葉緑体 (赤色: クロロフィル自家蛍光) に加えて、*perCerulean3* に由来する青色蛍光シグナルによってペルオキシソームを検出することに成功し、またそれぞれのオルガネラの分裂増殖に影響がないことを確認した (Fig. 4F). これらの結果から、シズンにおいてアクチンは細胞分裂および細胞骨格として必要ではないと結論付けた。同様の遺伝子カセットノックイン法を *CRY* 遺伝子についても実施し、ポジティブクローンが得られた。挿入位置や蛍光シグナルも同様に問題は見られなかったため、同手法が遺伝子によらず極めて高い精度で実施可能であることを確認している。以上の結果から、シズン・カッター法は 50 塩基程度のマイクロホモロジー領域を付加することで任意の二本鎖 DNA 断片をゲノムに挿入可能であることが示された。

シズン・カッターによる必須遺伝子の破壊とその影響の評価

最後に、シズン・カッター法を利用して、生存に必須と考えられる遺伝子を破壊した細胞の評価を試みた。細胞分裂などに異常が起きた場合は、細胞が増殖できないためポジティブクローンが得られない。だがそうした現象に関連する遺伝子を破壊した後、ミトコンドリアレポーター (*mitoScarlet*) とペルオキシソームレポーター (*perCerulean3*) のシグナルに基づいてゲノム編集が起きた細胞を特定し、細胞が死滅する前に観察することが出来れば、標的遺伝子を破壊した影響がどのように分裂などの機能に影響を与えているのか分析することができ

る。あるいは、形質転換細胞をセルソーターやマイクロマニピュレーターによって選抜することによって、細胞内で起きている現象を分析することも可能になる。このアイデアに基づき、ミトコンドリア分裂のカギ遺伝子である *MDR1* 遺伝子と、紡錘体を形成する上で重要な役割を果たす γ チュープリンをコードする *TUBG* 遺伝子を標的遺伝子として実験を行った。

シズン・カッター法によって *perCerulean3* 遺伝子カセットをそれぞれ *MDR1* と *TUBG* 遺伝子領域へ挿入する形質転換を行い、回復培地で 2 日間の培養を行った後、それぞれの細胞を観察した。*MDR1* 遺伝子がノックアウトされた場合は、細胞はミトコンドリア分裂の異常を示すと予想され、また *TUBG* 遺伝子がノックアウトされた場合は、細胞分裂異常の表現型を示すことが予想された。観察の結果、どちらの遺伝子を標的とした際も 0.1% 以下の低い割合ではあるが、各オルガネラレポーターの蛍光シグナルを示す形質転換体が確認された (Fig. 5A, B). これらの細胞では、遺伝子ターゲティングの標的である *MDR1* 遺伝子 (Fig. 5A) および *TUBG* 遺伝子 (Fig. 5B) に応じてミトコンドリア分裂異常、あるいは細胞核の分裂異常などが確認されたことから、想定通りに *perCerulean3* 遺伝子カセットが挿入されたことによって標的遺伝子が破壊されていると考えられた。興味深いことに、これらの細胞では標的となったオルガネラの分裂異常だけでなく、細胞核の分裂やペルオキシソームの分裂、さらに細胞質分裂の停止などが確認された。この結果は、細胞内でのオルガネラの分裂は順序が決まっており、各オルガネラの分裂と細胞分裂周期のあいだには相互に依存した分子機構が存在することを示す。一連の結果から、シズン・カッター法を利用すれば、恒常的な遺伝子ノックアウト株の構築のみならず、必須遺伝子であっても遺伝子ノックアウトによる影響を評価することが可能であることが分かった。

考 察

近年の分子時計による進化系統解析から、シズンは中期原生代の約 15–12 億年前を起源とする極めて古い系統であることが確認されている (Strassert *et al.*, 2021). シンプルな細胞構造やゲノム構造、さらに温泉環境に生育することによるシズンタンパク質の構造的安定性といった非常にユニークな特徴を持つシズンは、細胞生物学のみならず構造生物学的な研究分野においても重要なモデル生物となってきている。一方で、従来のシズンにおける相同組換えによる遺伝子ターゲティングでは、相同組換え領域を目的 DNA 断片の両側に付加するプロセスで多くの作業を必要とした。このため、光合成真核生

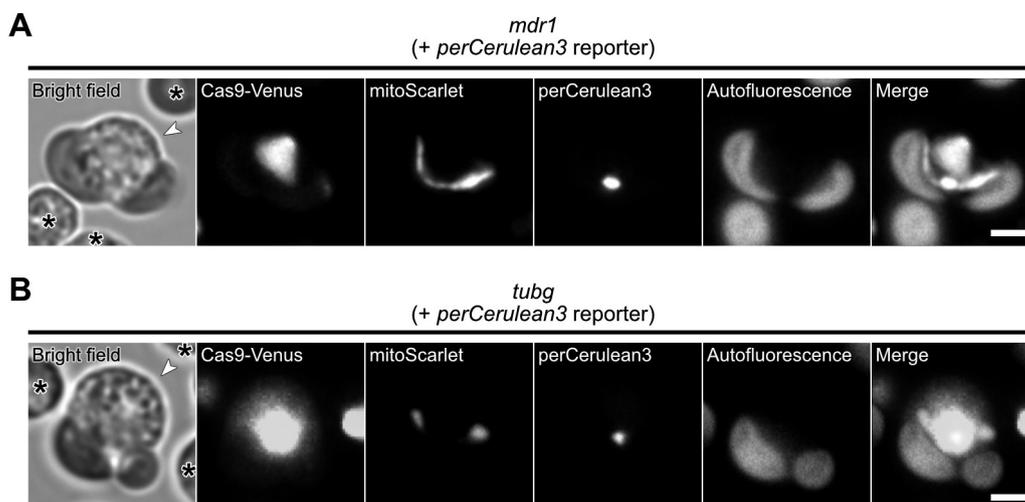


Fig. 5. Essential genes for organellar and cellular division can be targeted by CZON-cutter. (A, B) Representative images of a *MDR1* knockout (*mdr1*) cell and a *TUBG* knockout (*tubg*) cell. The cells were imaged 2 days after transformation. As these are living cells, they floated in the mounting medium and shifted slightly during imaging; the transformed cell (arrowhead) is shown in the center of the field, while non-transformed cells are indicated with asterisks. Each gene was knocked out by inserting the *perCerulean3* cassette at the target locus. Scale bars: 2 μ m.

物として最もシンプルな構造を持つという特徴を持つにもかかわらず、煩雑な遺伝子ターゲティングが原因となって、シゾンを利用したゲノムワイドな解析は実現していなかった。また、シンプルなゲノム構造であるため一般的なモデル生物と比べると遺伝子間距離が短いため、相同組換えによるセレクションマーカを含む長いDNA断片を挿入すると、周辺の遺伝子発現制御などに予期しない影響が生じる可能性が排除できなかった。これは未だ十分に研究が進んでいないため、近い将来に非常に重要な研究分野となることが間違いない遺伝子発現制御機構、さらに染色体構造解析においては極めて重要な問題点であった。しかし今回、我々が確立したCRISPRゲノム編集を基盤とするシゾン・カッター法は、完全にシステム化されたアプローチによって、ゲノム上の常に同じ領域にsgRNAとレポーター遺伝子を挿入し、標的遺伝子を最小のゲノムDNA配列の改変することが可能となった。また同時に形質転換された生細胞のオルガネラ動態を即座に確認することができるため、細胞の分裂増殖に関わる機能を解析する速度が飛躍的に向上した。

今回は報告することが出来なかったが、本研究において開発したシゾン・カッター (version 1) の改良も始まっている。現段階で行うことが出来るゲノムDNA配列の改変による遺伝子ノックアウト・ノックイン、さらに標的領域へのDNAフラグメントノックインは、言わば分子生物学的な解析を行う上での必須ツールである。これ

らに加えて、さらにシゾン・カッターに“光”を利用した遺伝子機能制御システムの導入を試みている。細胞周期を同調化することが可能なシゾンの特徴に加えて光遺伝学的アプローチを組み合わせることで、他のモデル生物では実現することが不可能な極めて正確かつ限定的な条件の下で細胞周期や細胞分裂、オルガネラ分裂・分配に関わる因子の機能を解析することが可能となる。既に改良型のCRISPRシゾン株 (YMT2およびYMT3) の開発が進んでおり、初期的な解析を開始している。

こうしたシゾン・カッターを活用すべき研究課題も次々と発見されている。特に細胞が分裂増殖するS期からM期にかけて特異的に発現する保存性の高い機能不明遺伝子群の解析から、幾つか非常に興味深い機能を担っている遺伝子が見つかった。例えば我々が新たに同定した分裂期ミトコンドリア核様体に局在する新奇タンパク質MiMSは、細胞が分裂増殖する際、細胞を倍加させるためにタンパク翻訳量を増大させる“タンパク質翻訳バースト”を引き起こすカギ因子であることがわかってきている。これは従来の遺伝子の転写・翻訳という生物における基本的な仕組みであるセントラルドグマの中に、未だ認識されていない未知の遺伝子発現制御システムが介在していることを示唆する。MiMSがどのようにしてタンパク質翻訳バーストを起こしているのか、その分子メカニズムを解析するため、シゾン・カッターを用いた様々な点変異をMiMS遺伝子に導入し、

詳細な分析を進めている (Mogi *et al.*, in preparation). このようなアプローチは、従来のコンストラクト DNA 作成から行う相同組換えによる方法では非常に多くの作業時間を要するため、実現が難しかった。またこの他、未知の分裂増殖因子が複数同定されている (Yabe *et al.*, in preparation). これらは細胞核に局在することから転写因子として機能していると考えられるが、特筆すべきはそのタンパク質コピー数の少なさである。精製した蛍光タンパク質 Venus を一分子蛍光顕微鏡によって正確に輝度を測定し、Venus タンパク質 1 分子が放出する蛍光シグナル量を基準として算出すると、これらの機能不明転写因子は、細胞核において僅か 10 コピー以下の分子数しか存在しないことがわかっている。またタンパク質コピー数が非常に少ないにもかかわらず、これらの遺伝子をノックアウトすると致死となることから、細胞の生存に必須であることもわかっている。通常の転写因子は、酵母程度の細胞サイズであっても数百タンパク質コピー数を備えており、10 タンパク質コピー数以下で機能するこれらの転写因子を解析することは、細胞分裂増殖時における制御システムを理解する上では特に重要になる。これらの極少数タンパク質コピー数で機能する新奇分裂増殖因子の機能を解析するためには、転写時期や転写量を調整するプロモーター領域の役割も重要なため、長大な遺伝子断片を挿入する相同組換え法ではなく、ゲノム DNA 配列をピンポイントで改変可能なシズン・カッターによる解析が特に効果的な手法となっている。今後、遺伝子機能をこれまで以上の分解能で解析する際には、シズン・カッターの有効性がさらに高まると思われる。

要 約

今回、本研究によってオルガネラと細胞の分裂増殖に関わる遺伝子機能を解析する新手法として、シズンに最適化した CRISPR-Cas9 システム“シズン・カッター”を確立した。シズン・カッターは、ゲノム編集と同時に細胞核・ミトコンドリア・葉緑体・ペルオキシソームを異なる蛍光波長によって観察することが出来る。この新たに確立したシズン・カッターを用いることによって、高い効率、広い汎用性、さらにハイスループットな遺伝子機能の解析が、単一オルガネラレベルで実現することが可能となった (Tanaka *et al.*, 2021)。CRISPR ゲノム編集としても、ゲノム DNA 配列を指定配列へと塩基改変できるだけでなく、タグ配列付加や遺伝子カセットといった数 kbp の DNA 断片の挿入も可能である。新たに構築した Cas9-Venus を発現するシズン YMT1 株には検出可能な異常は確認されず、またシズンのコンパクトなゲノムでは CRISPR ゲノム編集によるオフターゲット効

果を懸念する必要性は極めて低い。シズン・カッターが実現する独創性と汎用性は、遺伝子機能の解析によって細胞の生命原理を明らかにする上で強力な分子生物学ツールになるだろう。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 茂木祐子, 西川尚吾, 東山哲也, 吉田大和. 2020. 分裂期特異的ミトコンドリア核様体タンパク質の同定と機能の解析. 日本植物学会第84回大会 (9月19-21日, 名古屋)
- 2) 田中尚人, 茂木祐子, 外山侑穂, 東山哲也, 吉田大和. 2020. 原始紅藻シズンにおけるゲノム編集ツールCZON-cutterの確立. 日本植物学会第84回大会 (9月19-21日, 名古屋)
- 3) 吉田大和. 2021. 蛍光シグナルを通じてオルガネラ分裂装置のキネティクスを解く. 日本植物学会第85回大会 (9月16-21日, 八王子)
- 4) 矢部寛之助, 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 2021. 真核生物に広く保存された未知の分裂増殖遺伝子群の同定と機能解析. 日本植物学会第85回大会 (9月16-21日, 八王子)
- 5) 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 2021. 新規ミトコンドリアタンパク質による細胞周期依存的な翻訳制御機構. 日本植物学会第85回大会 (9月16-21日, 八王子)
- 6) 矢部寛之助, 茂木祐子, 東山哲也, 吉田大和. 2021. 最小ゲノム真核生物シズンを用いた蛍光顕微鏡観察を基盤とした未知の分裂増殖因子群の探索. 日本植物形態学会第33回大会 (9月17日, 東京)
- 7) 茂木祐子, 田中尚人, 藤原崇之, 矢部寛之助, 外山侑穂, 東山哲也, 吉田大和. 2021. シズンカッター：ゲノム編集とオルガネラ多重可視化を可能にするCRISPR-Cas9システムの開発. 日本植物形態学会第33回大会 (9月17日, 東京)
- 8) 吉田大和. 2022. シズンカッター：ゲノム編集と多重オルガネラ蛍光観察を同時に実現するCRISPRイメージング技術の確立. 日本ゲノム編集学会第7回大会 (6月6-8日, オンライン)

原著論文

- 1) Tanaka, N., Mogi, Y., Fujiwara, T., Yabe, K., Toyama, Y., Higashiyama, T. & Yoshida, Y. 2021. CZON-cutter – a CRISPR-Cas9 system for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga. *J. Cell Sci.* 134: jcs.258948.
- 2) Tanaka, N. & Yoshida, Y. 2022. Development of a CRISPR-cas9 system “CZON-cutter” for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga. *Plant Morph.* in press.

謝 辞

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

文 献

- Adli, M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**: 1911.
- Brasier, M., McLoughlin, N., Green, O. & Wacey, D. 2006. A fresh look at the fossil evidence for early Archaeal cellular life. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **361**: 887–902.
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W. & Simpson, A.G.B. 2020. The new tree of eukaryotes. *Trends. Ecol. Evol.* **35**: 43–55.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A. & Ahmad, M. 2011. The Cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 335–364.
- Fujiwara, T., Misumi, O., Tashiro, K. *et al.* 2009. Periodic gene expression patterns during the highly synchronized cell nucleus and organelle division cycles in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* **16**: 59–72.
- Fujiwara, T., Hirooka, S., Ohbayashi, R., Onuma, R. & Miyagishima, S.Y. 2020. Relationship between cell cycle and diel transcriptional changes in metabolism in a unicellular red alga. *Plant Physiol.* **183**: 1484–1501.
- Fujiwara, T., Kanesaki, Y., Hirooka, S., Era, A., Sumiya, N., Yoshikawa, H., Tanaka, K. & Miyagishima, S.Y. 2015. A nitrogen source-dependent inducible and repressible gene expression system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* **6**: 1–10.
- Fujiwara, T., Ohnuma, M., Kuroiwa, T., Ohbayashi, R., Hirooka, S. & Miyagishima, S.Y. 2017. Development of a double nuclear gene-targeting method by two-step transformation based on a newly established chloramphenicol-selection system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–10.
- Gillham, N.W., Boynton, J.E. & Hauser, C.R. 1994. Translational regulation of gene expression in chloroplasts and mitochondria. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 71–93.
- Gray, M.W.W. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**: 233–357.
- Imamura, S., Kanesaki, Y., Ohnuma, M., Inouye, T., Sekine, Y., Fujiwara, T., Kuroiwa, T. & Tanaka, K. 2009. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 14180–14180.
- Jiang, F. & Doudna, J.A. 2017. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**: 505–529.
- Kuroiwa, T. 1998. The primitive red algae *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae* as model system for investigating the dividing apparatus of mitochondria and plastids. *BioEssays* **20**: 344–354.
- Kuroiwa, T., Misumi, O., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T. & Kuroiwa, H. 2008. Vesicle, mitochondrial, and plastid division machineries with emphasis on dynamin and electron-dense rings. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **271**: 97–152.
- Lane, N. & Martin, W. 2010. The energetics of genome complexity. *Nature* **467**: 929–934.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T. *et al.* 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653–657.
- Mereschkowsky, C. 1905. Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche. *Biol. Cent.* **25**: 593–604.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K. 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**: 1120–1123.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. & Nureki, O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**: 935–949.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O. *et al.* 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* **5**: 28.
- Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y. & Tanaka, K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol.* **49**: 117–120.
- Öztürk, N., Song, S.H., Özgür, S., Selby, C.P., Morrison, L., Partch, C., Zhong, D. & Sancar, A. 2007. Structure and function of animal cryptochromes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* **72**: 119–131.
- Sander, J.D. & Joung, J.K. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**: 347–355.
- Strassert, J.F.H., Irisarri, I., Williams, T.A. & Burki, F. 2021. A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nat. Commun.* **12**: 1–13.
- Suzuki, K., Ehara, T., Osafune, T., Kuroiwa, H., Kawano, S. & Kuroiwa, T. 1994. Behavior of mitochondria, chloroplasts and their nuclei during the mitotic cycle in the ultramicroalga *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur. J. Cell Biol.* **63**: 280–288.
- Tanaka, N., Mogi, Y., Fujiwara, T., Yabe, K., Toyama, Y., Higashiyama, T. & Yoshida, Y. 2021. CZON-cutter – a CRISPR-Cas9 system for multiplexed organelle imaging in a simple unicellular alga. *J. Cell Sci.* **134**: 1–11.
- Yagisawa, F., Fujiwara, T., Takemura, T. *et al.* 2020. ESCRT machinery mediates cytokinetic abscission in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 1–14.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O. *et al.* 2010. Chloroplasts divide by contraction of a bundle of nanofilaments consisting of polyglucan. *Science* **329**: 949–953.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Shimada, T. *et al.* 2017. Glycosyltransferase MDR1 assembles a dividing ring for mitochondrial proliferation comprising polyglucan nanofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**: 13284–13289.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Hirooka, S., Fujiwara, T., Ohnuma, M., Yoshida, M., Misumi, O., Kawano, S. & Kuroiwa, T. 2009. The bacterial ZapA-like protein ZED is required for mitochondrial division. *Curr. Biol.* **19**: 1491–1497.
- Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Misumi, O., Nishida, K., Yagisawa, F., Fujiwara, T., Nanamiya, H., Kawamura, F. & Kuroiwa, T. 2006. Isolated chloroplast division machinery can actively constrict after stretching. *Science* **313**: 1435–1438.
- Yoshida, Y. & Mogi, Y. 2019. How do plastids and mitochondria divide? *Microscopy* **68**: 45–56.

環境中の未培養原生生物種の1細胞ゲノム解読手法の確立

本郷 裕一

東京工業大学生命理工学院

〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1 W3-48

Single-cell genomics of uncultured protists in environments

Yuichi Hongoh

School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

2-12-1 W3-48, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550

In this study, we aimed to establish the method to obtain a high-quality genome sequence of an uncultured protist. We chose *Stephanonympha* sp. (Parabasalida) as the target, which is a cellulolytic symbiotic protist in the termite gut and multi-nucleated (>100). We prepared a single-cell DNA sample by isothermal whole genome amplification as well as cDNA from the same cell with the SMART method. After massive efforts to eliminating contaminating sequences derived from bacteria and also from eukaryotes, we obtained *ca.* 147 Mb-size draft genome sequence, the estimated completeness of which was comparable to those of known genomes of pathogenic parabasalids. Our genome analyses revealed an outline of the metabolic pathway of *Stephanonympha*, and we predicted the symbiotic relationship with its endosymbiotic bacteria.

Key words: single-cell, gut protist, protozoa, genome, insect

緒言

環境中の微生物群集は、既存の手法では培養不能あるいは困難な、難培養性種を多く含むことが知られている。そうした微生物種を研究対象とするには、培養を介さない手法が必須となる。1990年代に、ユニバーサルプライマーでPCR増幅したrRNA遺伝子配列に基づく分子系統解析と、取得したrRNA配列を持つ微生物細胞を特異的に検出する蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH: fluorescence *in situ* hybridization)法が普及し、数多くの未培養微生物系統群の存在が明らかとなった。2000年代後半には、次世代DNAシーケンサーを用いた微生物群集全体のゲノム(メタゲノム)のショットガン配列解析法が確立し、微生物群集全体としての機能を遺伝子ベースで予測することも可能となった。ただし、メタゲノム配列解析では個々の微生物種の機能予測は困難で、得られる成果には限界があった。

そこで、微生物を1細胞ごとに分離してゲノム解析を行う1細胞ゲノミクスの開発に期待が集まり、現在では手法もかなり確立されている(本郷裕一, 2017)。またメタゲノムにおいても、隣接塩基パターンや配列断片被覆率、既知配列との相同性などの情報を基に断片を微生物種ごとに分類する「ビンニング」と呼ばれる情報解析手法が開発され、群集内で優占する微生物種については個々の機能推定が可能となっている(Albertsen *et al.*, 2013)。

しかしながら、こうしたメタゲノム・ビンニングや1細胞ゲノミクスは基本的には原核生物(細菌・アーキア)を対象として開発・実践されてきたものであり、単細胞真核生物(原生生物)を対象とするには多くの困難が伴う。真核生物はゲノムサイズが大きく、ゲノム解析には相当なシーケンシングのコストと情報解析技術・労力が必要である。真核生物の遺伝子はイントロンを含むため、より正確な遺伝子予測には、網羅的な転写産物配列の情報も欠かせない。

こうした状況下において、近年、メタゲノム中の真核生物由来配列を識別する情報解析ツールの開発が試みられているが(Karin *et al.*, 2020; Pronk and Medema, 2022)、識別精度が高いとはいえず、マニュアルでの十分な精査が必要となる(West *et al.*, 2018)。また海洋原生生物群集のメタゲノム・ビンニングに既存の原核生物用

E-mail: yhong@bio.titech.ac.jp

共同研究者: 伊藤 武彦(東京工業大学生命理工学院),
桑原 宏和(東京工業大学生命理工学院),
猪飼 桂(東京工業大学生命理工学院)。

ツールを使用して効果があったという報告もあるが (Delmont *et al.*, 2022), 例外的に莫大なシーケンスデータを用いており (Tara Oceans Project), また, やはりマニュアルでの精査に多大な労力が必要だったようである。

より現実的な未培養原生生物種の機能推定の試みとしては, 1細胞網羅的転写産物解析がある。1細胞網羅的転写産物解析は, 主にモデル真核生物を対象に近年急速に普及しており, フリューダイン社のC1をはじめとする専用の装置も各社から販売され, 微量RNAからの次世代シーケンサー用ライブラリ調製キットも市販されている (本郷裕一, 2017)。しかし, こうしたツールは, 取得した転写産物配列を参照ゲノム配列にマッピングして解析することを前提としている。参照ゲノム配列が存在せず, *de novo*での転写産物配列再構築が必須な未培養原生生物に適用しても, 信頼度の高い結果を得るのは難しい。そもそも原理的に, 発現量の低い遺伝子は網羅できない上に, 環境中の多様な原核生物や真核生物の核酸が混入するので, それを識別して除去しなければならない。しかし, 転写産物配列ごとにその由来を特定するのは困難であり, やはりゲノム配列を取得しなければ, 正確な配列識別と網羅的な生理機能の理解は難しい。

本研究では, シロアリ腸内原生生物群集を材料として1細胞ゲノミクスを試み, 未培養原生生物種のゲノム解析手法の確立を試みた。シロアリは枯死材のみを餌とする大害虫として知られるが, その高効率な木質分解能力の大部分を腸内に共生する原生生物群集に依存している。1種類のシロアリが数種~10種以上の特定の原生生物種をほぼ必ず保有し (Igai *et al.*, 2022), それらはParabasalia門かPreaxostyla門のいずれかに属する。これら原生生物種の培養は非常に難しく, 純粋培養成功は1例のみで (Odelson and Breznak, 1985a), その株も現存しない。同株での培養実験では, 原生生物がセルロースを水素, 二酸化炭素, 酢酸に発酵することが証明されている (Odelson and Breznak, 1985b)。その後, シロアリ腸内の各種原生生物からPCR法でセルラーゼ遺伝子が取得されたり (Inoue *et al.*, 2005), 腸内原生生物群集のメタ転写産物解析で多様な糖質分解酵素 (GH: glycoside hydrolase) 遺伝子群が検出されたりしている (Todaka *et al.*, 2010)。また最近, Nishimura *et al.* (2020) によって, イエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) 腸内Parabasalia門原生生物4種の1細胞網羅的転写産物解析が報告され, 原生生物種間でのGHレパートリーの違いなどが示された。Treitli *et al.* (2019) は, シロアリ (*Zootermopsis angusticollis*) 腸内のPreaxostyla門原生生物である *Streblomastix strix* の細胞共生細菌叢を含む1細胞ゲノミクスと網羅的転写産物解析を実施し, 原生生物ゲノムの解読も試みているが, 完成度も低く, 信

頼度は高くない。

本研究においては, ゲノム解析例が皆無であるシロアリ腸内Parabasalia門原生生物のうち, コウシュンシロアリ (*Neotermes koshunensis*) 腸内に共生する多核種の *Stephanonympha* sp. NkSt を標的として, 1細胞ゲノミクスと網羅的転写産物解析を行って代謝機能を推定し, 哺乳類腸内あるいは腔内病原性種であるParabasalia門3種の既知ゲノム配列と比較した。

実験方法

シロアリ採集と腸内原生生物細胞の単離

コウシュンシロアリは沖縄県で採集し, 研究室内で営巣木ごと飼育した。腸をピンセットで取り出し, 緩衝液 Trager's solution U (Trager, 1934) に内容物を懸濁した。Leica AM6000 マイクロマニピュレーションシステムを使用して *Stephanonympha* sp. NkSt の細胞を単離し, 緩衝液の液滴で数回洗浄した。1細胞ゲノミクスおよび網羅的転写産物解析用には, 0.1% Triton X と RNase inhibitor (タカラバイオ) 1.6U/ μ L を加えた同緩衝液中で細胞膜を壊し, 核の集合体 (Fig. 1) をマイクロマニピュレーションシステムで回収した。残りの細胞質画分は RNA 解析用とした。

全ゲノム増幅, ゲノム配列取得および試料選別

採取した多核画分から, EquiPhi29 DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 42°C で4時間, 100 μ L スケールで等温全ゲノム増幅を行った。*Stephanonympha* sp. NkSt の1細胞ゲノム解析用試料は4個調製し, それぞれについて, Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) でライブラリを作成した。4試料同時に Illumina MiSeq でペアエンド配列 (300bp \times 2) を取得した。各試料の配列 (リード) 数を1千万本に揃えた上で SPAdes v.3.15.3 (Bankevich *et al.*, 2012) でアセンブルし, 形成されたコンティグ上の遺伝子のデータベース配列への相同性を, Contig Annotation Tool (CAT) v.5.1.2 (von Meijenfeldt *et al.*, 2019) で評価した。原核生物由来と判定したコンティグを除外し, 残りを gVolante v.2.0.0 (Nishimura *et al.*, 2017) を使用してゲノム完成度推定などを行った。最も数値が良かった1細胞試料を選別し, 国立遺伝学研究所の豊田敦・特任教授に依頼して, Illumina NovaSeq6000 でペアエンド配列 (250bp \times 2) を取得した。

転写産物配列の網羅的取得

多核を採取した残りの細胞質画分は, 4U/ μ L の RNase inhibitor を含む 2 μ L の RNase-free water (タカラバイオ)

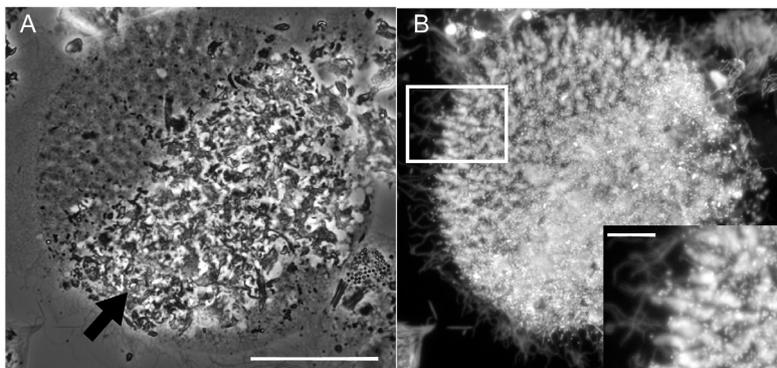


Fig. 1. A cell of *Stephanonympha* sp. NkSt from the gut of *Neotermes koshunensis*. (A) Phase contrast image. Arrow indicates a mass of wood particles contained in the cell. (B) DAPI-stained image. Inset shows pleiomorphic multiple nuclei and numerous endosymbiotic bacteria. Hair-like ectosymbiotic bacteria are also seen. Bar indicates 50 μm (A and B) and 10 μm (inset).

に回収し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Clontech) を用いて cDNA 合成および増幅を行なった。産物を AMPure XP (Beckman) で精製後、Agilent 2100 バイオアナライザーで配列長と濃度を確認した。SMART-Seq キットの推奨量である 100pg の産物を用いて、Nextera XT DNA Library Prep Kit でライブラリー調製した。これを 6~8 回行った後で 1 つにまとめ、ロータリーエバポレーターで 3~4 倍に濃縮した。アガロースゲル電気泳動で DNA ライブラリーの配列長を確認し、400-550bp, 550-700bp, 700-850bp の断片を MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてそれぞれ回収した。これらのうち 550-700bp と 700-850bp のライブラリーについて、MiSeq でペアエンド配列 (300bp \times 2) を取得した。

16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析

Stephanonympha sp. NkSt 細胞に共生する細菌群集構造を明らかにするため、単離した原生生物細胞を illustra GenomiPhi V2 Kit (Cytiva) を用いて、30 $^{\circ}\text{C}$ で 8 時間の条件で等温全ゲノム増幅した。その産物を鋳型とし、原核生物 16S rRNA の V3-V4 領域用のユニバーサルプライマー 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG) と 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC) を用いて PCR を行った (Murakami *et al.*, 2017)。Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) を使用し、98 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒 \rightarrow (98 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒) \times 20 回 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒の条件で行った。Index PCR は 8 サイクル行った。MiSeq でペアエンド配列 (300bp \times 2) を取得し、DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) で 1 塩基レベルで amplicon sequence variant (ASV) への分類と SILVA データベースでの細菌系統群の同定を行った。得られた

ASV 配列はさらに DECIPHER *R* package (Wright, 2016) を用いて、99% の配列相同性で定義した operational taxonomic unit (OTU) に分類した。

ゲノム情報解析

NovaSeq6000 で取得したゲノム配列断片を、標準的なクオリティチェック後に SPAdes v.3.15.3 でアセンブルしてコンティグを生成した。500bp 未満のコンティグを除去後、MetaEuk (Karin *et al.*, 2020) で遺伝子 (エクソン) を同定した。MetaEuk で原核生物あるいはウイルスと判定され、かつ NCBI nr-nt/nr-aa データベース中の真核生物配列に相同性を持たず、さらにイントロンが存在しない遺伝子配列を含むコンティグを混入配列として除外した。nr-nt データベースとの相同性検索では BLASTn を使用し、出力ヒット数 500, e-value $\leq 1\text{e-}5$ の条件で判定した。nr-aa データベースとの相同性検索では DIAMOND (Buchfink *et al.*, 2015) を使用し、BLASTx-mode, 出力ヒット数 25, e-value $\leq 1\text{e-}5$ の条件で判定した。イントロンの有無は、RNA-seq のリードを HISAT2 (Kim *et al.*, 2019) でマップし、StringTie (Pertea *et al.*, 2015) によってエクソン/イントロン構造を予測した。遺伝子予測は、RNA-seq のリードを用いる以外に、Parabasalia 門の 3 種 (*Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Histomonas meleagridis*) の既知ゲノムで同定されている遺伝子配列との相同性にも基づいて行った。*Trich. vaginalis* と *Tritrich. foetus* のゲノム配列とタンパク遺伝子 (CDS: coding domain sequence) は TrichDB release 57 (<https://trichdb.org/trichdb/app>) より取得し、*Hi. meleagridis* のゲノム配列は PRJNA594289 から取得した。

以上のように選別したコンティグ上の遺伝子を、KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) (Moriya *et al.*,

2007) を用いて KEGG orthology (KO) に基づく機能注釈をしたところ、明らかに原核生物や他界の真核生物由来の配列の混入が確認された。そこで、さらに CAT v.5.1.2 を使用して各コンティグの分類推定を行い、SPAdes が算出する k-mer 被覆度が 30 未満かつ CAT で Parabasalia 門以外と判定されたコンティグは除外した。さらに、1,000 bp 未満のコンティグで Parabasalia 門あるいは Preaxostyla 門以外に判定されたものも被覆度に関わらず除外した。また KEGG mapper による代謝系予測において、絶対嫌気性真核生物である Parabasalia 門が保有するとは考え難い遺伝子について、マニュアルで精査の上、除外した。

比較ゲノム・発現量解析

ゲノム配列と転写産物量の比較には、病原性 Parabasalia 門原生生物 *Tric. vaginalis*, *Tritric. foetus*, *Hi. meleagridis* のゲノム情報と、前 2 者の RNA-seq データ (*Hi. meleagridis* のデータは取得できなかった) を用いた。RNA-seq データは、*Tric. vaginalis* については SRR2132589–SRR213291, *Tritric. foetus* については ERR4398931–ERR4398933 で取得した。また転写産物配列情報のみではあるが、イエシロアリ腸内 Parabasalia 門原生生物 4 種 (*Pseudotrichonympha grassii*, *Cononympha leidy*, *Holomastigotoides hartmanii*, *Holomastigotoides minor*) のデータ (Nishimura *et al.*, 2020) を <https://doi.org/10.5061/dryad.05qfttf04> で取得した。

比較解析のため、*Stephanonympha* sp. NkSt と上記の 7 種の Parabasalia 門原生生物種の CDS について、KAAS を用いて KO に基づく機能注釈を行った。この時、ゲノム配列既知の各種原生生物とモデル真核および原核生物を含む 32 種を選択して、相同性検索のためのデータベースとした。また eggNOG-mapper v2.0.4 (Cantalapiedra *et al.*, 2021) を用いた機能注釈結果も参考にした。KEGG による機能カテゴリーの中でも、“Metabolism”, “Genetic information and processing”, “Environmental information processing”, “Cellular processes” に含まれる 25 の下位分類 (例えば “Carbohydrate metabolism”, “Translation”, “Signal transduction” など) に着目し、それぞれに属する (KO を付された) CDS を抽出した。各下位分類に属する CDS の総数を、同 25 下位分類全体の CDS 総数で割った比率を比較した。

上記の 25 下位分類の発現量比較においては、Salmon v.1.3.0 (Patro *et al.*, 2017) を用いて、各原生生物種の RNA-seq リードを CDS に整列し、100 万リード中の各遺伝子転写産物 1kb 当たりのリード数 (TPM: transcripts per million) を算出した。RNA-seq データが複数ある原生生物種においては、平均値を使用した。

GH 遺伝子の同定では、まず dbCAN v.3.0.4 (Zhang *et*

al., 2018) を使用して CAZyme (carbohydrate-active enzyme: GH や glycosyl transferase などの糖質分解関連酵素を含む) を検索した。検出された CDS 配列をクエリーとして、各種 GH を参照配列とした BLASTp による相同性検索を行った ($e\text{-value} \leq e^{-3}$)。検出された配列の中で、dbCAN での検索でも GH として同定され、かつ eggNOG-mapper v2.0.4 で何らかの機能注釈がなされたものを GH 遺伝子と判断した。さらに (転写産物データ未取得の *Hi. meleagridis* を除いた) 7 種類の原生生物間で TPM が多かった 25 種類の GH family の発現量を比較した。

結果および考察

ゲノム解析の標的とするシロアリ腸内 Parabasalia 門原生生物種の選定に当たっては、明らかに細胞内に木片を取り込み、かつゲノムサイズが比較的小さいことを条件とした。その結果、コウシュンシロアリ腸内に多数共生する多核 (100 個以上) の未培養種である *Stephanonympha* sp. NkSt を選択した (Fig.1)。同原生生物はシロアリ腸内原生生物種のみで構成される Cristamonadea 綱に属し、ゲノム解読済みの動物腸内・腔内の病原体 *Tric. vaginalis* (Trichomonadea 綱) や *Tritric. foetus* と *Hi. meleagridis* (Tritrichomonadea 綱) とは綱レベルで異なる系統である (Noda *et al.*, 2012) (Fig.2)。*Stephanonympha* sp. NkSt の 1 細胞当たりの DNA 含量は 35 Gb もあるが (本郷ら, 未発表)、多核であるためハプロイド当たりのゲノムサイズは 300 Mb 程度かそれ以下と予想した。原生生物 1 細胞の核から等温全ゲノム増幅法で配列解析に十分な DNA 量 ($>10 \mu\text{g}$) を調製する必要があるが、同手法は一般にゲノム領域間の極端な増幅バイアスを伴う。出発点の細胞数 (本研究の場合は核の個数) が多いほど増幅バイアスは緩和されるため、多核種を標的とすればより高品質なゲノム配列の再構築が可能と考えた。ただし、*Stephanonympha* sp. NkSt を含め、原生生物は細胞内や表面に原核生物が多数共生していることが多いので、ゲノム解析時にはそれら共生細菌叢の把握と、可能な限り各原核生物種のゲノム配列を再構築しておく必要がある。

Stephanonympha sp. NkSt の細胞共生細菌叢

本研究で標的とした *Stephanonympha* sp. NkSt には、Fig.1B に示したように、細胞内外に高密度に原核生物が共生している。ゲノム解析に先立ち、共生細菌叢を把握するため 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行った (Fig.3)。1 細胞全ゲノム増幅試料 8 個について、それぞれ約 1 万~3 万 5 千リードペアを解析し、合計で 12 種類の細菌 OTU を検出した。そのうち 4 OTU

環境中の未培養原生生物種の1細胞ゲノム解読手法の確立

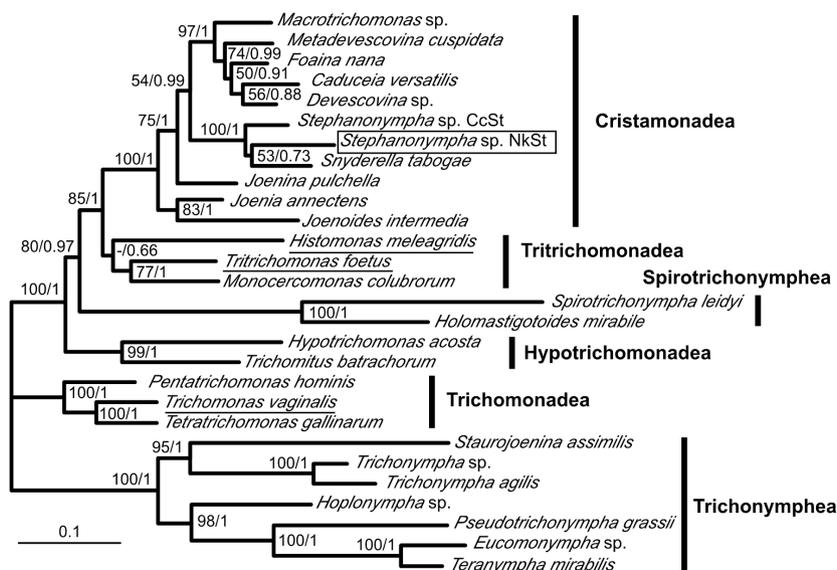


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationships of *Stephanonympha* sp. NkSt and other representative parabasalids. The tree was originally published by Noda *et al.* (2012) and slightly modified here. A maximum-likelihood tree was constructed based on a concatenated dataset comprising amino acid sequences of GAPDH, actin and EF-1 α , and the 18S rRNA gene sequences. Bootstrap value and Bayesian posterior probability are shown. Classes Cristamonadea, Spirotrichonymphea, and Trichonymphea exclusively consist of species from termite guts, whereas other classes are widely distributed in intestinal and/or genital tracts of various animals. The draft genome sequences of three pathogenic species, *Trichomonas vaginalis*, *Tririchomonas foetus* and *Histomonas meleagridis* have previously been reported (see Table 1).

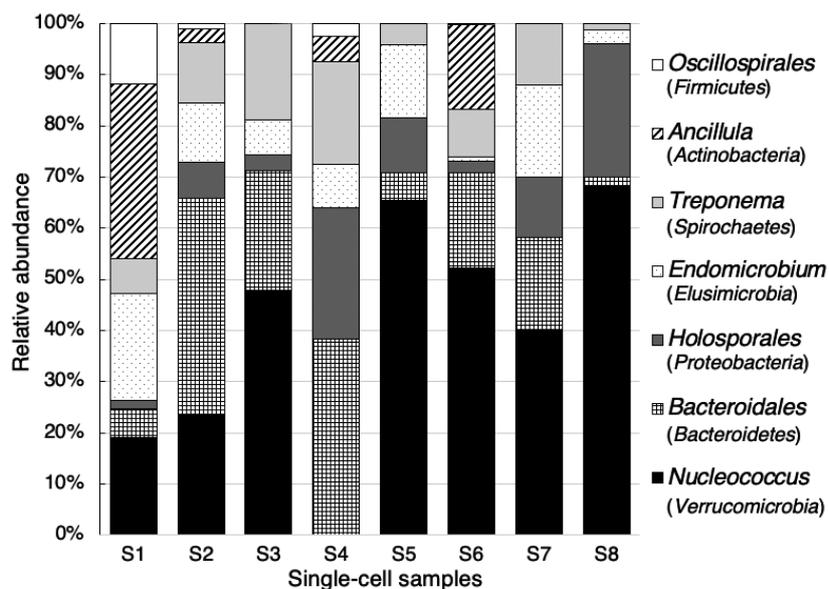


Fig. 3. Taxonomic composition of bacteria associated with single cells of *Stephanonympha* sp. NkSt based on 16S rRNA gene amplicon sequences. Eight single-cell samples prepared by whole genome amplification were used. Twelve bacterial operational taxonomic units (OTU: defined with 99% sequence identity) from seven genera or orders were identified. Four OTUs (*Endomicrobium*, *Treponema*, *Holosporales*, and *Bacteroidales*) were consistently detected while others were facultative.

(*Endomicrobium* 属, *Treponema* 属, *Bacteroidales* 目, *Holosporales* 目) は 8 細胞全てから検出されたが, 8 OTU (*Endomicrobium* 属, *Ancillula* 属, *Bacteroidales* 目, *Oscillospirales* 目, *Treponema* 属 2 種, “*Nucleococcus*” 属 2 種) は日和見的に感染していた. 詳細は省略するが, FISH 法による局在解析の結果, *Treponema* 属と *Bacteroidales* 目は細胞表面に毛状に付着共生し, 他は “*Nucleococcus*” 属 1 種が核内共生体であったのを除いて, 細胞質中に検出された. これらのゲノム解析は進行中であるが, 他のシロアリ腸内原生物種に特異的に共生する近縁種において, それぞれゲノム解読済みであり (Hongoh *et al.*, 2008a; Hongoh *et al.*, 2008b; Ohkuma *et al.*, 2015; Yuki *et al.*, 2015; Strassert *et al.*, 2016; Utami *et al.*, 2019) (ほか未発表), 今回はそれらを参考にしてゲノム配列断片のビニングと代謝系の考察を行った.

Stephanonympha sp. NkSt ゲノム配列取得と基本情報

予備実験として MiSeq でペアエンド配列を取得した *Stephanonympha* sp. NkSt 核由来の 4 試料のうち, 簡易ビニング後の BUSCO (Simao *et al.*, 2015) による推定完成度, 全塩基数, コンティグ長 N50, 同一細胞由来 RNA-seq リードのマッピング率などで最も数値の良かった試料 (ST3) を選択して, NovaSeq6000 による大量配列取得を行った. 低品質配列の除去などのクオリティ

チェック作業後に残った約 330 Gb の配列をアセンブル, ビニングした. この時, 真核生物配列識別機能を持つ MetaEuk (Karin *et al.*, 2020) の他に, EukRep (West *et al.*, 2018) も試したが, いずれの場合も, 明らかに原核生物由来と見られる多くのコンティグが除去されていなかったため, 「実験方法」に記したような煩雑なビニング作業を追加で行った. *Tric. vaginalis* など病原性培養株のゲノム解読結果から, Parabasalia 門は *Bacteroidales* 目などの嫌気性原核生物由来の水平伝播遺伝子を数多く保有していることが示されており (Carlton *et al.*, 2007), 一つの遺伝子が系統的に真核生物に近いあるいは原核生物に近いだけでは, その由来を判断するのは難しい. また, 真核生物の網羅的転写産物解析では poly-T カラムを用いた poly A 選別を行うのが一般的だが, 実際には原核生物由来の配列, 特に AT 含量の多い細胞内共生細菌由来の配列が大量に混入してしまう (本郷ら, 未発表). したがって, より正確なビニングは, やはり転写産物のみでは困難で, 長いゲノム配列断片を取得し, イントロンなどの真核生物特有の配列情報から判断すべきである.

ビニング後の *Stephanonympha* sp. NkSt のドラフトゲノム基本情報を Table 1 に示した. 総塩基長は約 147 Mb で, BUSCO による推定完成度は約 74 % (コンティグ配列に基づく) か約 52 % (CDS 配列に基づく) 程度であっ

Table 1. General features of the draft genome of *Stephanonympha* sp. NkSt-3 and known parabasalid species.

Features	NkSt-3	<i>Trichomonas vaginalis</i> * ³	<i>Tritrichomonas foetus</i> * ⁴	<i>Histomonas meleagridis</i> * ⁵
Total length (bp)	146,928,559	176,420,065	67,585,742	43,414,808
Completeness (%) ^{*1}	73.8	73.0	74.6	73.8
Completeness (%) ^{*2}	52.1	58.8	55.3	56.9
Number of contigs	12,933	64,769	3,299	187
Largest contig (bp)	325,793	584,929	406,868	3,384,422
Contig N50 (bp)	27,427	27,122	86,531	673,467
Number of CDSs	28,077	59,679	25,030	11,119
Number of introns	11,495	58	0	573
Mean intron size (bp)	325	189	NA	633
Exon(s) per gene	1.41	1.00	1.00	1.05
G+C content (%)	53.6	32.8	31.2	28.7

*¹ Calculated using BUSCO based on contig sequences.

*² Calculated using BUSCO based on CDSs.

*³ Carlton *et al.* (2007).

*⁴ Benchimol *et al.* (2017). The latest sequence of this species has been deposited as GCA_905133005 and its total length was 147,002,103 bp, but without gene annotation.

*⁵ Palmieri *et al.* (2021).

だが、既知培養3種のBUSCOによる推定ゲノム完成度も同様である。おそらく、BUSCOで計算の基礎としている「真核生物保存遺伝子」の一部がParabasalia門生物では存在しないか、配列相同性が低くて検出されないのかもしれない。いずれにしても、Parabasalia門の既知ゲノムと同等の高い完成度が得られていると推察される。ただし、コンティグ長 N50 は約 29,000bp で、これは Oxford Nanopore のロングリード配列も使用して最近取得された *Hi. meleagridis* の約 670,000bp (Palmieri *et al.*, 2021) と比較してかなり低い。今後、ロングリード配列を追加してより長いコンティグを再構築できれば、ピニングの精度も上がるはずである。

Stephanonympha sp. NkSt と寄生性 Parabasalia 門原生生物との大きな相違は、イントロンの数に見られた (Table 1)。これまで Parabasalia 門にはイントロンがほとんど存在しないとされ、実際に *Tritric. foetus* では全く無く (Benchimol *et al.*, 2017)、*Tric. vaginalis* と *Hi. meleagridis* でも少数であった (Carlton *et al.*, 2007; Palmieri *et al.*, 2021)。しかし、*Stephanonympha* sp. NkSt ではエクソン当たりのイントロン数は 1.4 と、イントロンを持つ遺伝子も少なくないことが判明した。また、GC 含量も 54% と、30% 前後の *Tric. vaginalis* などの既知ゲノム配列よりもかなり高かった。

Stephanonympha sp. NkSt の代謝系予測

KEGG mapper などを用いて基本的な代謝系を予測したところ、解糖発酵系、核酸・アミノ酸・補酵素合成系などの基幹代謝系は、*Tric. vaginalis* と *Tritric. foetus* に酷似していた (Fig. 4)。木質分解性の相利共生体で大きな細胞を持つシロアリ腸内原生生物は、*Tric. vaginalis* や *Tritric. foetus* のような、同じ Parabasalia 門ではあっても綱レベルで異なり、かつ宿主組織片や細菌を主食とする小型の病原体とは大きく異なる生理機能を持つことも想定していたが、そうではなかった。解糖系 (Emden-Meyerhof-Parnas 経路) と糖新生経路は完全で、グリコーゲンを貯蔵できる。*Tric. vaginalis* と *Tritric. foetus* で知られているように、リンゴ酸を介してヒドロゲノソームで酢酸・二酸化炭素・水素へと発酵し、ATP を生産する (Müller *et al.*, 2012)。この際、*Tric. vaginalis* での生理学的実験に基づき、acetate : succinate CoA-transferase [EC.2.8.3.18] でコハク酸とアセチル CoA を基質として酢酸とサクシニル CoA を生産し、succinyl-CoA synthetase でサクシニル CoA をコハク酸に戻す時に ATP を産生すると考えられている (Müller *et al.*, 2012)。ところが、succinyl-CoA synthetase はあるものの、acetate : succinate CoA-transferase [EC.2.8.3.18] は同定できず、代わりに acetyl-CoA hydrolase [EC:3.1.2.1] が存在する。実は、

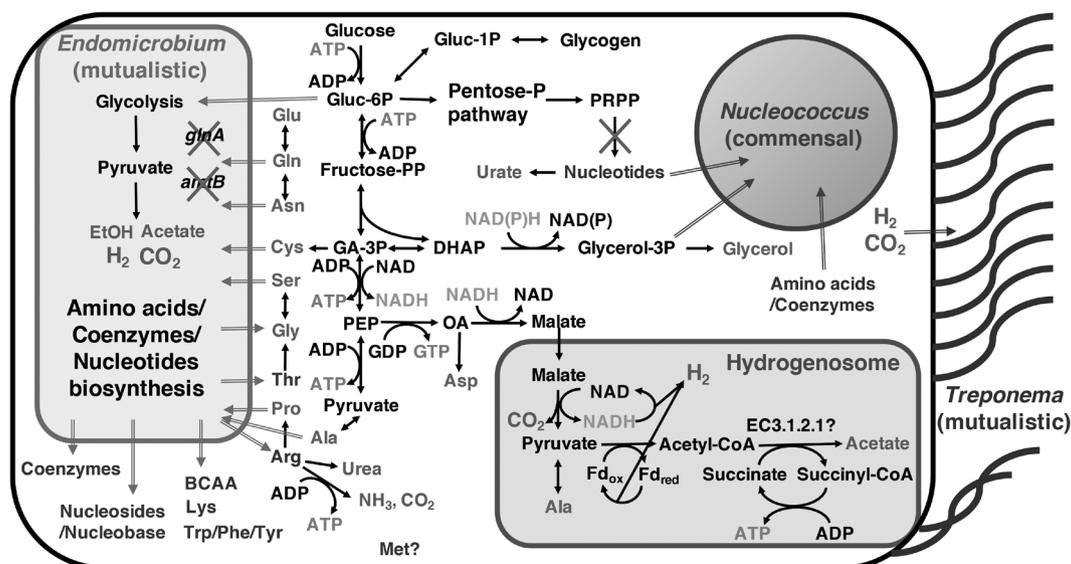


Fig. 4. Outline of predicted metabolic pathways of *Stephanonympha* sp. NkSt. An obligate endosymbiont *Endomicrobium* sp., a facultative endosymbiont *Nucleococcus* sp. and an obligate ectosymbiont *Treponema* sp. were included in the pathway. The functions of these symbionts were predicted based on genome sequences of their closely related phylotypes obtained from other protist species (see main text).

Tric. vaginalis のゲノム解析においても同じ問題が指摘されており (Carlton *et al.*, 2007), 配列相同性からは acetyl-CoA hydrolase [EC: 3.1.2.1] と同定される酵素の性質を検証する必要があるかもしれない。

水素産生については, *Tric. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007) やイエシロアリ腸内原生生物 *P. grassii* (Inoue *et al.*, 2007) と同様に, 鉄ヒドロゲナーゼが複数存在している。ただし, *Tric. vaginalis* が保有する, 細胞質に局在して水素酸化を行うという最近報告された鉄ヒドロゲナーゼ (Smutna *et al.*, 2022) の有無については, さらに精査が必要である。

非酸化的ペントースリン酸回路によってホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) は合成可能だが, PRPP から先の核酸 *de novo* 合成系を欠いており, スクレオシドか核酸塩基を摂取する必要がある。補酵素類の *de novo* 合成は全くできない (Fig. 4)。クエン酸回路の酵素をほとんど欠いているために 2-オキソグルタル酸を合成不能であり, アミノ酸も *de novo* 合成はできない。ただし, グルタミン酸があれば, グルタミン, アスパラギン, システイン, アラニンは合成できるし, スレオニンがあれば, グリシンとセリン, アルギニンがあれば, プロリンは合成できる。メチオニン, 芳香族アミノ酸, 分岐鎖アミノ酸, リジンは合成不能である (Fig. 4)。つまり, 多くの栄養素を外部からの摂取に依存する寄生性あるいは細菌捕食性の性質を, *Tric. vaginalis* や *Tritric. foetus* などと共有したまま, シロアリとの絶対的な相利共生関係を持つ木質分解者に進化したことになる。

興味深いことに, *Stephanonympha* sp. NkSt を含む多様なシロアリ腸内原生生物の細胞内絶対共生細菌である *Endomicrobium* では, グルタミン合成酵素が偽遺伝子化している他, アスパラギン, システイン, セリン, プロリン, アラニンを合成できないが, スレオニン, アルギニンの他, いわゆる動物の必須アミノ酸については, メチオニン以外は合成可能である (Hongoh *et al.*, 2008a)。また核酸や多くの補酵素も *de novo* 合成可能である。即ち, シロアリ腸内原生生物は, 木質食性に特化する過程で各種窒素化合物を合成できる細菌を細胞内に常に共生させ, 栄養補給を受けられるような進化を遂げたと考えられる。また *Endomicrobium* 属共生細菌はゲノムサイズが 1Mb 程度と, シロアリ腸内自由遊泳型の近縁種である *Endomicrobium proavitum* の 1.6Mb のゲノム (Zheng *et al.*, 2017) よりも縮小している。多くの代謝系が冗長性を失って流線形化する過程で, 宿主が (前駆体は必要だが) 合成可能なグルタミンやアラニン, プロリンなどのアミノ酸合成能力を喪失し, 相補的な栄養関係を築いたと推察される。

さらに今回の解析で, *Tric. vaginalis* と同様にアンモニア・尿素・尿酸が *Stephanonympha* sp. NkSt の窒素老廃物であると推定された。 *Pseudotrichonympha* 属原生生物の細胞内共生細菌である “*Candidatus Azobacteroides pseudotrichonymphae*” や *Eucomonympha* 属原生生物の細胞内共生細菌である “*Candidatus Treponema intracellularis*” などはアンモニアと尿素を輸入して多様な窒素化合物を合成する能力があることがゲノム解析から予測されていたが (Hongoh *et al.*, 2008b; Ohkuma *et al.*, 2015), それらが原生生物の老廃物を介した窒素再利用系であることが確認できた。

Endomicrobium のような絶対相利共生細菌が存在する一方で, *Stephanonympha* sp. NkSt を含む多くのシロアリ腸内原生生物は, 複数の日和見の片利共生ないし寄生性細菌が細胞質や核内に共生していることが多い (本郷・桑原ら, 未発表)。その代表として, “*Nucleococcus*” (Sato *et al.*, 2014) を Fig. 4 の代謝系に含めたが, こちらは *Endomicrobium* とは異なり, 宿主細胞から核酸・アミノ酸・補酵素に加えて, グリセロール 3リン酸を摂取していることが, “*Nucleococcus*” のゲノム解析から予想されている (本郷・桑原ら, 未発表)。

遺伝子機能カテゴリーと発現量の比較

上述のように, *Stephanonympha* sp. NkSt は *Tric. vaginalis* などの病原性 Parabasalia 門原生生物と基幹代謝系を共有していたが, ゲノム全体の遺伝子機能カテゴリーの比率においても, 顕著な差異は見られなかった (Fig. 5)。 *Stephanonympha* sp. NkSt は, *Tric. vaginalis* などが持たない糖質分解酵素や関連遺伝子群を保有するものの, 生命の根幹を支えるシステムは, 生態にかかわらず共有されているということであろう。一方, 転写産物量の比較では, 原生生物種間で大きな相違があった (Fig. 6)。 *Stephanonympha* sp. NkSt では, セルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖質分解酵素を含む “Carbohydrate metabolism” が特に大きな比率を占めるということではなく, イエシロアリ腸内原生生物 4種のうちの *C. leidy* と同程度だが, *P. grassii* と *Holomastigotoides* 属 2種よりは低かった。他と比較して顕著に比率が高かったのは “Folding, sorting, degradation” と “Transport and catabolism” で, 特にポリユビキチン関連遺伝子が発現上位で目立ったが, その生理学的な意味はよくわからない。いずれにしても, 今回は転写産物データは 1例しかとっておらず, 参考データに留まる。1細胞転写産物解析では cDNA 増幅時にバイアスがかかりやすく, 定量性については信頼性が低いので, 今後, 追加データを取得していく必要がある。

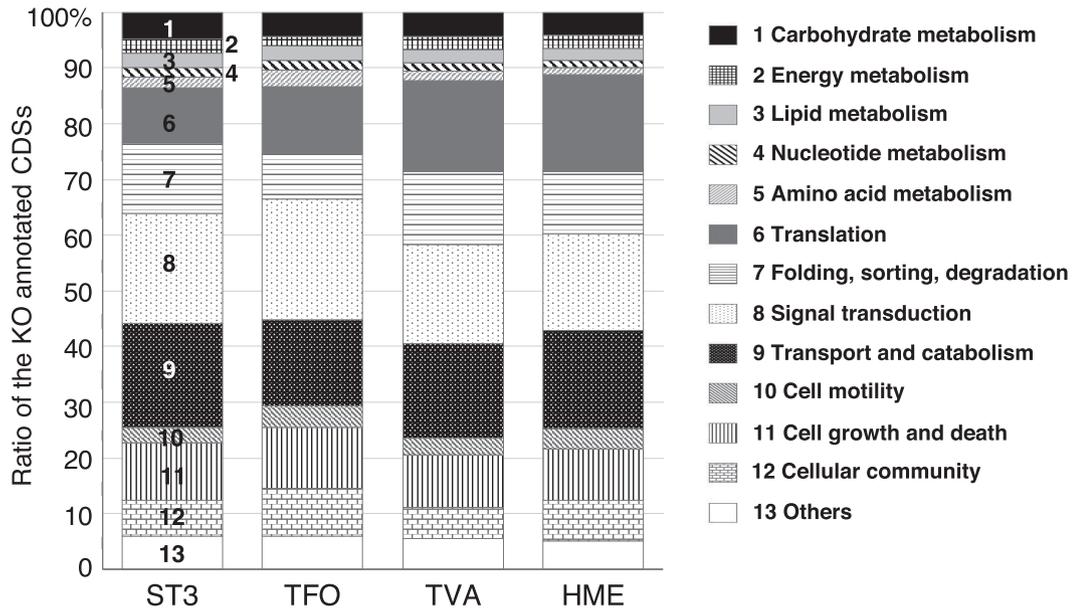


Fig. 5. Functional categories of protein-coding genes (CDSs) of *Stephanonympha* sp. NkSt and other parabasalids. The functional categories were assigned based on KEGG orthology (KO). ST3: *Stephanonympha* sp. NkSt; TFO: *Tritrichomonas foetus*; TVA: *Trichomonas vaginalis*; HME: *Histomonas meleagridis*.

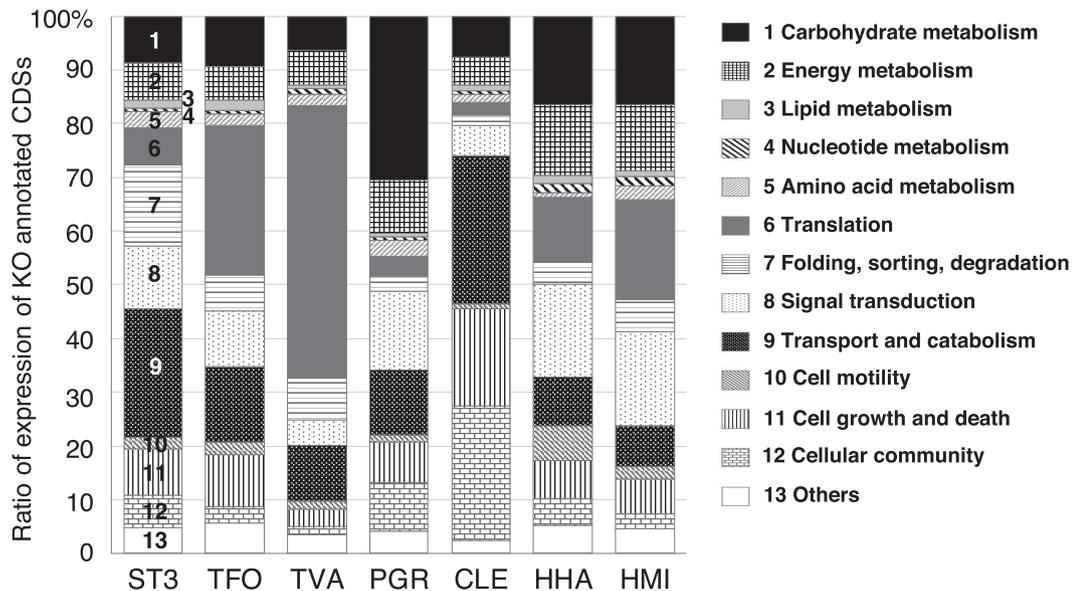


Fig. 6. Relative abundance of functional categories of protein-coding gene (CDS) transcripts in *Stephanonympha* sp. NkSt and other parabasalids. The abundance was calculated as transcripts per million (TPM). The functional categories were assigned based on KEGG orthology (KO). ST3: *Stephanonympha* sp. NkSt; TFO: *Tritrichomonas foetus*; TVA: *Trichomonas vaginalis*; PGR: *Pseudotrichonympha grassii*; CLE: *Cononympha leidy*; HHA: *Holomastigotoides hartmanii*; HMI: *Holomastigotoides minor*. Averaged data were presented when there were multiple transcriptome data.

GH 遺伝子の種類と発現量の比較

Stephanonympha sp. NkSt は常に大量の木片を細胞内に抱えており (Fig.1A の矢印で示した不定形の破片群)、時間をかけて消化しているためか、シロアリを木片からセルロース飼育に切り替えても木片は短期間では消失しない。木質分解を行っていることは明らかと思われるが、実際、endoglucanase (GH45, GH5), cellobiohydrolase (GH7), beta-glucosidase (GH3) などの発現が多く見られた (Fig.7)。これは、宿主細胞や細菌細胞を主食とする *Tric. vaginalis* や *Tritic. foetus* とは大きく異なる一方、イエシロアリ腸内原生生物である *P. grassii* と類似していた。遺伝子全体での発現量順位においても (データ省略)、各種 GH のうち、GH45 の 2 遺伝子が 14 位と 24 位、GH3 が 61 位、GH7 の 2 遺伝子が 70 位と 72 位となっていた。ちなみに 1 位はポリユビキチン遺伝子で、その他ではアクチンやチューブリンなどの細胞骨格遺伝子に加え、fructose-1,6-bisphosphate aldolase や glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase などの解糖発酵系の各種遺伝子の複数のホモログが上位に見られた。グルタミン合成酵素も 58 位に入っていた。

今後の展望

今回のゲノム解析はまだ予備的な部分も多いが、長年の謎であったシロアリ腸内木質分解性原生生物の基本代謝系を解明できたという点で、非常に意義深いものとなった。これまで、シロアリ腸内原生生物の細胞内外に共生する各種原核生物のゲノム解析を多数行ってきたが、宿主の代謝系が不明であったため、真の共生関係推定は困難であった。今回の成果を過去の共生細菌の知見と照合することで、より正確な共生関係を理解することができる。ゲノム解析上の課題としては、予想以上に他種の混入配列が多く、しかも原核生物だけではなく真核生物由来の混入も多数見られたため、その識別法を最適化していく必要がある。未培養原生生物の場合、1細胞から全ゲノム増幅で DNA を調製する選択肢と、同種と見られる細胞を多数回収してゲノム増幅を経ずに DNA 調製する選択肢があるが、後者の場合には異なる系統のゲノムが混在するため、配列のアセンブルが困難を極める。一方、前者の場合はゲノム増幅バイアスが生じるために、配列断片の被覆度を利用した混入配列識別が難しくなる。しかしながら 1細胞由来であれば、得られたホモログ配列がゲノム内多型なのか、系統間多型なのか、

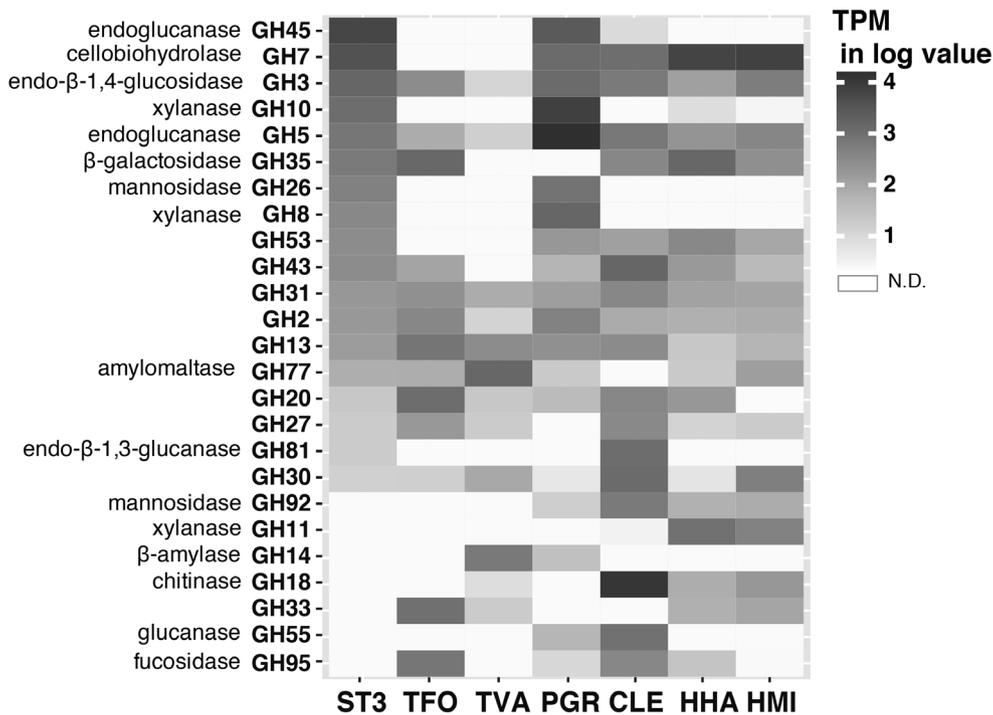


Fig. 7. Abundance of transcripts of glycoside hydrolase (GH) genes in *Stephanonympha* sp. NkSt and other parabasalids. A heatmap shows transcripts per million (TPM). See the legend to Fig. 6 for abbreviations of protist species.

といった疑問を排除できるので、格段に解釈がしやすいという利点がある。本研究のように、同一細胞からの転写産物情報を取得すれば、より正確な遺伝子同定も可能である。今後さらに試行錯誤を重ねながら、最適な手法を模索していきたい。

要 約

本研究では、未培養原生生物の1細胞ゲノム解読手法の確立のため、シロアリ腸内木質分解性原生生物の1種で多核の *Stephanonympha* sp. NkSt を材料として、ゲノム解析を試みた。単一細胞から等温全ゲノム増幅およびSMART法でのcDNA増幅を行い、Illuminaシーケンサーで配列を取得した結果、既知の寄生性Parabasalia門原生生物に匹敵する完成度のドラフトゲノム配列を得ることに成功した。総塩基数は約147Mbで、遺伝子数は約28,000であった。代謝系を推定したところ、木質分解性の相利共生体と宿主細胞・細菌細胞食性の病原体という生態の相違はあるものの、解糖発酵系・核酸合成系・アミノ酸合成系などにはほとんど相違がないことが判明した。核酸の *de novo* 合成や多くのアミノ酸合成が不能であることが明らかとなったため、シロアリ腸内原生生物に普遍的に見られる細胞内・表面の共生細菌の必要性を初めて証明することができた。今回の解析時における最大の障害は、細胞共生細菌を含む多様な原核生物に加え植物・真菌類などの真核生物由来のDNA混入が大量にあったことで、試料中の混入配列の物理的除去と情報解析的な識別手法の確立が今後の重要な課題となる。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 傅潔洋, 桑原宏和, 木原久美子, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. シロアリ腸内原生生物 *Mixotricha paradoxa* 細胞表面共生Bacteroidales目細菌のゲノム解析. 第15回日本ゲノム微生物学会年会 (3月4-6日, 九大・オンライン)
- 2) 高橋一樹, 桑原宏和, 堀川雄太郎, 伊澤和輝, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. シロアリ腸内原生生物に細胞内共生するClostridiales目細菌の比較ゲノム解析. 第15回日本ゲノム微生物学会年会 (3月4-6日, 九大・オンライン)
- 3) Yiting Liu, 桑原宏和, 間瀬貴子, 木原久美子, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. シロアリ腸内原生生物運動共生スピロヘータのゲノム解析. 第15回日本ゲノム微生物学会年会 (3月4-6日, 九大・オンライン)
- 4) 高橋一樹, 桑原宏和, 堀川雄太郎, 伊澤和輝, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. シロアリ腸内原生生物に細胞内共生するClostridiales目細菌の機能と進化. 日本微生物生態学会第34回大会 (10月30日-11月2日, 新潟薬科大・オンライン)
- 5) 吉岡拓哉, 伊澤和輝, 桑原宏和, 竹内真理子, 加藤大

- 貴, 澤村岩風, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. 比較ゲノム解析による細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌の多様性と進化過程の考察. 日本微生物生態学会第34回大会 (10月30日-11月2日, 新潟薬科大・オンライン)
- 6) 傅潔洋, 桑原宏和, 木原久美子, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. シロアリ腸内原生生物 *Mixotricha paradoxa* 細胞表面共生Bacteroidales目細菌のゲノム解析. 日本微生物生態学会第34回大会 (10月30日-11月2日, 新潟薬科大・オンライン)
- 7) 吉岡拓哉, 伊澤和輝, 桑原宏和, 竹内真理子, 加藤大貴, 澤村岩風, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. 細胞内共生 *Endomicrobium* 属細菌の基幹代謝系の差異と進化過程の考察. 日本共生物学会第5回大会 (11月27-28日, オンライン)
- 8) 高橋一樹, 桑原宏和, 堀川雄太郎, 伊澤和輝, 雪真弘, 大熊盛也, 本郷裕一. 2021. 細胞内寄生性Clostridiales目細菌の生存戦略と進化プロセス. 日本共生物学会第5回大会 (11月27-28日, オンライン)

原著論文

- 1) Igai, K., Kitade, O., Fu, J., Omata, K., Yonezawa, T., Ohkuma M. & Hongoh Y. 2022. Fine-scale genetic diversity and putative ecotypes of oxymonad protists coinhabiting the hindgut of *Reticulitermes speratus*. *Mol. Ecol.* **31**: 1317-1331.

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、NovaSeqでの配列解析を実施していただいた国立遺伝学研究所の豊田敦特任教授と技術員の方々、サンガー配列解析を実施していただいた理化学研究所バイオリソースセンターJCMの大熊盛也室長と脳神経科学研究センターの技術員の方々、また東京工業大学本郷研究室の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Albertsen, M., Hugenholtz, P., Skarshewski, A., Nielsen, K.L., Tyson, G.W. & Nielsen, P.H. 2013. Genomic sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat. Biotechnol.* **31**: 533-538.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D. *et al.* 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**: 455-477.
- Benchimol, M., de Almeida, L.G.P., Vasconcelos, A.T., de Andrade Rosa, I., Reis Bogo, M., Kist, L.W. & de Souza, W. 2017. Draft Genome Sequence of *Trichomonas foetus* Strain K. *Genome Announc.* **5**: e00195-00117.
- Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D.H. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **12**: 59-60.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J. & Holmes, S.P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**:

- 581-583.
- Cantalapiedra, C.P., Hernandez-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P. & Huerta-Cepas, J. 2021. eggNOG-mapper v2: Functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 5825-5829.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C. *et al.* 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**: 207-212.
- Delmont, T.O., Gaia, M., Hinsinger, D.D. *et al.* 2022. Functional repertoire convergence of distantly related eukaryotic plankton lineages abundant in the sunlit ocean. *Cell Genomics* **2**: e100123.
- Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T., Noda, S., Taylor, T.D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. & Ohkuma, M. 2008a. Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 5555-5560.
- Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T. *et al.* 2008b. Genome of an endosymbiont coupling N₂ fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science* **322**: 1108-1109.
- Igai, K., Kitade, O., Fu, J., Omata, K., Yonezawa, T., Ohkuma, M. & Hongoh, Y. 2022. Fine-scale genetic diversity and putative ecotypes of oxymonad protists coinhabiting the hindgut of *Reticulitermes speratus*. *Mol. Ecol.* **31**: 1317-1331.
- Inoue, J., Saita, K., Kudo, T., Ui, S. & Ohkuma, M. 2007. Hydrogen production by termite gut protists: characterization of iron hydrogenases of parabasalial symbionts of the termite *Coptotermes formosanus*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1925-1932.
- Inoue, T., Moriya, S., Ohkuma, M. & Kudo, T. 2005. Molecular cloning and characterization of a cellulase gene from a symbiotic protist of the lower termite, *Coptotermes formosanus*. *Gene* **349**: 67-75.
- Karin, E.L., Mirdita, M. & Soding, J. 2020. MetaEuk-sensitive, high-throughput gene discovery, and annotation for large-scale eukaryotic metagenomics. *Microbiome* **8**: e48.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S.L. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**: 907-915.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A.C. & Kanehisa, M. 2007. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucl. Acids Res.* **35**: W182-185.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G. & Martin, W.F. 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 444-495.
- Murakami, T., Segawa, T., Dial, R., Takeuchi, N., Kohshima, S. & Hongoh, Y. 2017. Bacterial microbiota associated with the glacier ice worm is dominated by both worm-specific and glacier-derived facultative lineages. *Microbes Environ.* **32**: 32-39.
- Nishimura, O., Hara, Y. & Kuraku, S. 2017. gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. *Bioinformatics* **33**: 3635-3637.
- Nishimura, Y., Otagiri, M., Yuki, M., Shimizu, M., Inoue, J.I., Moriya, S. & Ohkuma, M. 2020. Division of functional roles for termite gut protists revealed by single-cell transcriptomes. *ISME J.* **14**: 2449-2460.
- Noda, S., Mantini, C., Meloni, D., Inoue, J., Kitade, O., Viscogliosi, E. & Ohkuma, M. 2012. Molecular phylogeny and evolution of Parabasalia with improved taxon sampling and new protein markers of actin and elongation factor-1alpha. *PLOS ONE* **7**: e29938.
- Odelson, D.A. & Breznak, J.A. 1985a. Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 614-621.
- Odelson, D.A. & Breznak, J.A. 1985b. Cellulase and other polymer-hydrolyzing activities of *Trichomitopsis termopsidis*, a symbiotic protozoan from termites. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 622-626.
- Ohkuma, M., Noda, S., Hattori, S., Iida, T., Yuki, M., Starns, D., Inoue, J., Darby, A.C. & Hongoh, Y. 2015. Acetogenesis from H₂ plus CO₂ and nitrogen fixation by an endosymbiotic spirochete of a termite-gut cellulolytic protist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**: 10224-10230.
- Palmieri, N., de Jesus Ramires, M., Hess, M. & Bilic, I. 2021. Complete genomes of the eukaryotic poultry parasite *Histomonas meleagridis*: linking sequence analysis with virulence/attenuation. *BMC Genomics* **22**: e753.
- Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A. & Kingsford, C. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* **14**: 417-419.
- Perteau, M., Perteau, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T. & Salzberg, S.L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* **33**: 290-295.
- Pronk, L.J.U. & Medema, M.H. 2022. Whokaryote: distinguishing eukaryotic and prokaryotic contigs in metagenomes based on gene structure. *Microb. Genom.* **8**: e000823.
- Sato, T., Kuwahara, H., Fujita, K., Noda, S., Kihara, K., Yamada, A., Ohkuma, M. & Hongoh, Y. 2014. Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. *ISME J.* **8**: 1008-1019.
- Simao, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V. & Zdobnov, E.M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**: 3210-3212.
- Smutna, T., Dohnalkova, A., Sutak, R., Narayanasamy, R.K., Tachezy, J. & Hrdy, I. 2022. A cytosolic ferredoxin-independent hydrogenase possibly mediates hydrogen uptake in *Trichomonas vaginalis*. *Curr. Biol.* **32**: 124-135 e125.
- Strassert, J.F., Mikaelyan, A., Woyke, T. & Brune, A. 2016. Genome analysis of 'Candidatus Ancillula trichonymphae', first representative of a deep-branching clade of *Bifidobacteriales*, strengthens evidence for convergent evolution in flagellate endosymbionts. *Environ. Microbiol. Rep.* **8**: 865-873.
- Todaka, N., Inoue, T., Saita, K., Ohkuma, M., Nalepa, C.A., Lenz, M., Kudo, T. & Moriya, S. 2010. Phylogenetic analysis of cellulolytic enzyme genes from representative lineages of termites and a related cockroach. *PLOS ONE* **5**: e8636.
- Trager, W. 1934. The cultivation of a cellulose-digesting flagellate, *Trichomonas termopsidis*, and of certain other termite protozoa. *Biol. Bull.* **66**: 182-190.
- Treitli, S.C., Kolisko, M., Husnik, F., Keeling, P.J. & Hampl, V. 2019. Revealing the metabolic capacity of *Streblomastix strix* and its bacterial symbionts using single-cell metagenomics.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **116**: 19675-19684.
- Utami, Y.D., Kuwahara, H., Igai, K. *et al.* 2019. Genome analyses of uncultured TG2/ZB3 bacteria in 'Margulisbacteria' specifically attached to ectosymbiotic spirochetes of protists in the termite gut. *ISME J.* **13**: 455-467.
- von Meijenfeldt, F.A.B., Arkhipova, K., Cambuy, D.D., Coutinho, F.H. & Dutilh, B.E. 2019. Robust taxonomic classification of uncharted microbial sequences and bins with CAT and BAT. *Genome Biol.* **20**: e217.
- West, P.T., Probst, A.J., Grigoriev, I.V., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. 2018. Genome-reconstruction for eukaryotes from complex natural microbial communities. *Genome Res.* **28**: 569-580.
- Wright, E.S. 2016. Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological science data in R. *The R Journal* **8**: 352-359.
- Yuki, M., Kuwahara, H., Shintani, M., Izawa, K., Sato, T., Starns, D., Hongoh, Y. & Ohkuma, M. 2015. Dominant ectosymbiotic bacteria of cellulolytic protists in the termite gut also have the potential to digest lignocellulose. *Environ. Microbiol.* **17**: 4942-4953.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P.K., Xu, Y. & Yin, Y. 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucl. Acids Res.* **46**: W95-W101.
- Zheng, H., Dietrich, C. & Brune, A. 2017. Genome analysis of *Endomicrobium proavitum* suggests loss and gain of relevant functions during the evolution of intracellular symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: e00656-00617.
- 本郷裕一 2017. 環境微生物学研究に革命をもたらしたシングルセル解析. *In* 菅野純夫(ed), 実験医学別冊シングルセル解析プロトコール, p. 40-46, 羊土社.

電気で微生物の代謝を制御する：電気遺伝学の創生

渡 邊 一 哉

東京薬科大学生命科学部

〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

Control of microbial metabolisms using electricity: the development of electrogenetics

Kazuya Watanabe

School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,

1432-1 Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392

Electrochemically active bacteria (EAB) have extracellular electron transport pathways that facilitate direct exchange of electrons between intracellular metabolisms and extracellular solid conductive materials, such as electrodes. EAB are expected to be used for a variety of bioelectrochemical technologies, such as microbial fuel cells and microbial electrosynthesis systems. Studies have shown that EAB, such as *Shewanella oneidensis* MR-1, perceive electrode potentials and regulate the expression of their catabolic genes, thereby conserving appropriate amounts of energy depending on electromotive forces of catabolic reactions. It was considered that such an ability of EAB would be applicable to the development of a technology, termed “electrogenetics”, which enables electrode-controlled expression of genes for biotechnological purposes, such as electrofermentation of value-added chemicals. In the present work, in order to establish fundamentals of electrogenetics, we identified promoter sequences that promote the expression of downstream genes in response to changes in electrode potentials, and one of these promoters, P_{nqr1} that promotes the expression of Nqr1 NADH dehydrogenase under reduced conditions, was demonstrated to be useful for expressing anaerobic fluorescent protein in strain MR-1 in the presence of a low-potential electrode. It is suggested that electrogenetics will become a promising technology that facilitates application of EAB to the production of value-added chemicals with the aid of electric energy supplied from electrodes.

Key words: electrochemically active bacteria, extracellular electron transport pathway, Arc system, microbial electrosynthesis, electrofermentation

緒 言

バイオテクノロジーは、健康・医療からグリーン産業まで広く我々の社会の発展に貢献するものであり、新しい技術の開発が活発な分野である。中でも最近、光遺伝学 (Optogenetics) が注目を集めている (Aravanis *et al.*, 2007)。これは、細菌の光受容チャンネルタンパク質等を発現させて細胞機能を光により操ろうとするもので、神経科学分野などを大きく発展させている。開発者のスタンフォード大学ダイセロス博士らは、ノーベル賞候補に挙げられている。同様に、細胞機能を制御する新たな技術が出現し、バイオテクノロジーが大きく発展す

ることが待たれている。

近年、細胞質と細胞外を電氣的につなぐ細胞外電子伝達系 (extracellular electron transport pathway, EET 経路) をもち、細胞外の電極と細胞内の代謝反応の間で電子をやり取りしながら増殖できる電気化学活性細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) が発見され、様々な形での産業応用が期待されている (Logan & Rabaey, 2012)。一方、幾つかのEABについてはEET経路や異化代謝経路の分子生物学解析が行われ、分子機構が明らかになりつつある。このようなEABの代表として、*Shewanella* (Shewanella) が挙げられる (Kouzuma *et al.*, 2015)。

近年、モデルEABとして多くの研究に用いられている *Shewanella oneidensis* MR-1 株が隣接する電極の電位を認識し、これにより遺伝子発現の制御と代謝機能の調

E-mail: kazuyaw@toyaku.ac.jp

共同研究者：高妻 篤史 (東京薬科大学生命科学部)。

節を行っていることが発見された (Hirose *et al.* 2018). この研究では, EET 経路により, 細胞膜のキノンの酸化還元状態が電極電位に反応して変化し, キノンの酸化還元状態を認識する 2 成分制御系のセンサーキナーゼ ArcS のレスポンスレギュレーター ArcA をリン酸化/脱リン酸化する活性が変化することが示された (Figure 1). ArcA はリン酸化されると DNA の特定配列に結合するようになるため, 総合して電極電位反応の遺伝子発現が起こることが明らかになった. MR-1 株においては, 高電位 (+0.5V vs. standard hydrogen electrode 以上) で発現が誘導される遺伝子が 274 個, 低電位 (-0.1V 以下) で誘導される遺伝子が 48 個トランスクリプトーム解析により検出され, その多くは ArcSA 依存的に電位反応した (Hirose *et al.*, 2018).

そこで我々は, 「シユワネラ等 EAB の細胞外電子伝達系と Arc 制御系を使えば遺伝子発現や代謝活性を電極により制御でき, 新たなバイオテクノロジー “電気遺伝学” が創生できる。」と考えた. 本助成における研究では, この仮説を実証するため, 電位反応に反応して下流の遺伝子の発現を誘導するプロモーターを同定し, それを用いて外来遺伝子を発現させることとした.

実験方法

使用株, プラスミド, 培養条件

S. oneidensis MR-1 (野生株, WT), *S. oneidensis* MR-1 の *arcS* 破壊株 ($\Delta arcS$) (Hirose *et al.*, 2018) の前培養には LB 培地を用いた. 嫌気培養の際は, 電子受容体としてフマル酸ナトリウムを 40mM となるよう加えた. 増殖実験には 10mM 乳酸ナトリウムまたは 10mM N-アセチルグルコサミン (NAG) を唯一の炭素源とした最少培地 (MM) を用いた. MM 培地 (pH7.4) は, 9mM $(NH_4)_2SO_4$, 5.7mM K_2HPO_4 , 3.3mM KH_2PO_4 , 30mM HEPES-NaOH を含む. 好気培養では 5mL の培地を 30mL の試験管に添加し, MR-1 株を $OD_{600} = 0.05$ で植菌し, シリコ栓で蓋をした. 30°C, 180rpm で振とうし, 定常期に入るまで培養を行った. 嫌気培養では 8ml の培地を 13mL のねじ口試験管へ添加し, MR-1 株を $OD_{600} = 0.01$ になるように植菌し, プチルゴムとスクリュウキャップで密栓した. 窒素ガスパージを 5min 行い, 内部を嫌気条件にした後, 30°C で静置培養した. OD_{600} の測定は Spectrophotometer UH5300 (HITACHI) または mini photo518R photometer (タイテック) を用い, 1h または 24h 毎に測定した.

定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)

Total RNA の抽出は Trizol (Invitrogen) によって行い,

RNeasy Mini kit と RNase-free DNase Set (QIAGEN) で精製した. 抽出した RNA の品質は Agilent 2100 Bioanalyzer と RNA pico Chips (Agilent) を使用し, 付属のプロトコルに従って確認した. qRT-PCR は LightCycler 1.5 instrument と LightCycler SYBR Green I (Roche) を使用して行った. PCR 反応液は 15ng total RNA, 1.3 μ L 50mM $Mn(OAc)_2$, 7.5 μ L RNA Master SYBR Green I, 0.15 μ M プライマーを含むように調製した. *nuo*, *ndh*, *nqr1*, *nqr2* の各遺伝子用プライマーとして, *nuo* (qRT-*nuo*F-F, ATTTAGCAACGCTCGAGCAG; qRT-*nuo*F-R, ATTTAATGGCGCTGGCAAGC), *ndh* (qRT-*ndh*-F, TGCTTGCTTTAGGTGGTGTGTC; qRT-*ndh*-R, AGGGCATCCAAGAGCTTTTTC), *nqr1* (qRT-*nqr*F-1-F, AGCCGCTGAGAATGACAAC; qRT-*nqr*F-1-R, ACCGAGGAGTTCATGATTGG), *nqr2* (qRT-*nqr*F-2-F, GCGCTTACTCGATGGCTAAC; qRT-*nqr*F-2-R, ACCGAATGGACCAGAAATTG) を用いた. 各遺伝子の発現量は 16S rRNA の発現量で標準化した.

プロモーター活性測定

nuo, *ndh*, *nqr1*, *nqr2* の各遺伝子の 5' 上流領域を PCR によって増幅した. PCR 産物をプロモーターレスプラスミド pMElacZ (Endoh *et al.*, 2003) のプロモーター領域にクローニングした. 作製したプラスミドはシーケンス解析を行うことでインサート配列の確認をした. *S. oneidensis* MR-1 株へのレポータープラスミドの導入は Kasai *et al.* (2015) の方法で行った.

プロモーター活性の測定は β -ガラクトシダーゼ法 (Kasai *et al.*, 2015) によりおこなった. 18mL 容三電極系電気化学リアクターで培養したレポーター株を回収し, この培養液 500 μ L に Z buffer (60mM Na_2HPO_4 , 40mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 10mM KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50mM 2-メルカプトエタノール) を 500 μ L, クロロホルムを 15 μ L, 0.1% SDS を 10 μ L 加え, 15 秒間ボルテックスした. 5min 静置の後, 200 μ L 2-ニトロフェニル- β -ガラクトピラノシド (ONPG) を添加した. 反応液が黄色く呈色したところで, Stop solution (1M Na_2CO_3) を加えて反応を停止した. ONPG 添加から Stop solution 添加までの時間を反応時間として計測した. その後反応液を遠心分離 (12,000 $\times g$, 2min, 4°C) し, 上清 300 μ L をマイクロウェルプレートに分注した. マイクロプレートリーダー (SH-1200, コロナ電気) を使用し, 420nm の吸光度 (A_{420}) を測定した. β -ガラクトシダーゼの活性は Miller unit = $(1000 \times A_{420}) / (\text{反応時間} [\text{min}] \times \text{サンプル量} [\text{mL}] \times OD_{600})$ として計算した. 本試験は全て 3 連以上の反復サンプルを用いて行った.

レポーター株の作製

pHSG298にある遺伝子発現制御機構である *lac* プロモーターを除去し、そこに *nqr1* のプロモーター (P_{nqr1}) を挿入して pUPN298 を作製した。この下流にレポーター遺伝子として嫌気性 green fluorescent protein (anaerobic fluorescent protein; AFP) (Kitayama *et al.*, 2017) を導入し、pUPN-afp を作製した。構築したプラスミドをエレクトロポレーション法によって MR-1 株に導入した。同様に、AFP 遺伝子の代わりに *dgcS* (Matsumoto *et al.*, 2021) を導入したプラスミド (pUPN-*dgcS*) を構築し、MR-1 株に導入した。

微生物電気化学システム

qRT-PCR 用菌体調製には、18 mL 容三電極系電気化学リアクターを用いた (Hirose *et al.*, 2018)。作用極はグラファイトフェルト (1.5 cm × 1.5 cm; 2.25 cm²)、対極は白金線 (10 cm, ニラコ)、参照極は Ag/AgCl (飽和 KCl) (HX-R5, 北斗電工) を使用した。リアクターを VMP3 (Biologic) に接続し、+0.5 V または -0.6 V vs. Ag/AgCl (+0.7 V, -0.4 V vs. 標準水素電極) の電極電位で運転を行った。リアクターに電解液として 170 mM NaCl を加えた MM を添加し、菌体を OD₆₀₀ = 0.1 となるように加えた後、窒素ガスで 10 min バブリングを行った。プロモーター活性が著しく高いものについては OD₆₀₀ = 0.05 で植菌した。これを 30°C でインキュベートし、電流を生成させた。電流値は VMP3 で測定し、作用極面積 (2.25 cm²) で割ることで電流密度を求めた。

AFP の発現の調査には、Kitayama *et al.* (2017) で用いられた三電極式電気化学セルを用いた。作用極にはグラファイトプレート電極 (50 cm²)、参照極には Ag/AgCl (HX-R5, Hokuto Denko)、対極にはチタンメッシュ (50 cm²) を用いた。電気化学セルには MM に初期 OD₆₀₀ が 0.03 となるように植菌し、窒素置換を行い嫌気条件にした後 24 時間静置することで菌体をグラファイトプレートに付着させた。その後電位を印加し、蛍光を発する細胞の観察を正立型共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy; CLSM, FV1200 BX61WI, Olympus) を用いて行った。また、一細胞あたりの蛍光強度を付属ソフトを用いて定量化した (n=100)。

結果および考察

これまでの研究において MR-1 株の電位応答トランスクリプトーム解析が行われ、高電位 (+0.5 V vs. standard hydrogen electrode 以上) で発現が誘導される遺伝子が 274 個、低電位 (-0.1 V 以下) で誘導される遺伝子が 48

個検出されている (Hirose *et al.*, 2018)。このなかで特筆することは、MR-1 株は 4 つの NADH dehydrogenase 遺伝子 (*nuo*, *ndh*, *nqr1*, *nqr2*) をもつが、これらの発現は電位応答しており、MR-1 株が電位に応じて NADH dehydrogenase を使い分けていることである。そこで、この現象を確かめるため、qRT-PCR 系および遺伝子発現レポーター系を構築し、電子受容体や電極電位に応じてこれら NADH dehydrogenase の発電の電位応答性を調査した。

まず、電子受容体として酸素またはフマル酸を用いて呼吸を行った際の各遺伝子の相対発現量を qRT-PCR により調査した。酸素の還元反応 (酸素呼吸) の標準酸化還元電位は約 +0.8 V であり高電位の電極に匹敵する。一方フマル酸の還元反応 (フマル酸呼吸) の電位は -0.1 V 程度であり、低電位の電極に匹敵する。この条件で各遺伝子の相対発現量を調査した結果を Fig.1 に示す。4 つの NADH dehydrogenase 遺伝子のうち、酸素呼吸条件およびフマル酸呼吸条件ともに最も相対発現量が高かったのは *ndh* 遺伝子であった。この遺伝子の産物はポンプ活性をもたない NADH dehydrogenase と推定されるが、この酵素の MR-1 株などの EAB における役割はあまり議論されておらず、MR-1 がなぜこの遺伝子を高発現しているか不明である。今後この遺伝子の破壊実験などを行い、MR-1 株における重要性や役割を解明していきたい。

4 つの NADH dehydrogenase 遺伝子のうち、酸素呼吸条件でフマル酸呼吸条件より発現量が大きかったものは *nuo* と *nqr2* であった。一方、フマル酸呼吸条件で酸素呼吸条件より発現量が大きかったものは *nqr1* であった。*ndh* は高発現していたものの、両条件で発現量に大きな差は見られなかった。プロトンポンプ活性をもつ酵素を

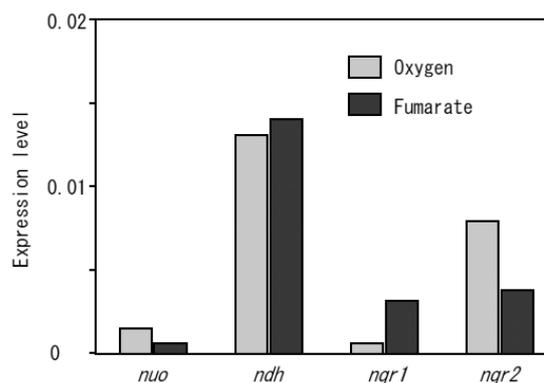


Fig. 1. Expression levels of genes coding for 4 NADH dehydrogenases under oxygen-respiring and fumarate-respiring conditions.

コードする *nuo* が高電位条件で高発現し、その結果高電位条件でより大きなプロトン能動勾配が形成されることでATP合成量が増加するという考えが以前の研究 (Hirose *et al.*, 2018) において示されている。本結果は、この考えをサポートするものである。一方、MR-1株は酸素呼吸条件とフマル酸呼吸条件でナトリウムポンプ型のNADH dehydrogenase (*nqr1* および *nqr2* の産物) を使い分けている可能性が示されたことは興味深い。一つの可能性としては、Nqr1は低電位の電子伝達物質メナキノンを利用し、Nqr2は高電位の電子伝達物質ユビキノンを利用することが考えられる。この点については、今後それぞれの酵素学的性質を調査して明らかにしていきたい。

電気制御発酵は、還元的物質生産においてより有望な技術である。このためには、低電位で下流の遺伝子(発酵生産にかかわる遺伝子など)を発現誘導するプロモーターの利用が考えられる。上記の4つのNADH dehydrogenase 遺伝子のうち、低電位の電子受容体であるフマル酸を用いた呼吸の条件で発現上昇したのは *nqr1* であった。そこでこの遺伝子が低電位電極存在下で発現上昇するか、また以前の研究で示唆されたようにこの発現誘導にはArcシステムが関与するかを調査する目的で、*nqr1* のプロモーターである P_{nqr1} の下流に *lacZ* 遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築し、これを用いてMR-1株を形質転換した。この株を高電位電極 (+0.7V vs. standard hydrogen electrode, SHE) 存在下および低電位電極 (-0.4V vs. standard hydrogen electrode) 存在下、電気化学セルで培養し、得られた菌体を用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 2)。その結果、 P_{nqr1}

は低電位電位での発現誘導活性があること、この発現誘導にはArcシステムが関与することが確かめられた。

次に、電位シフト後に発現誘導がかかる時間を調査する目的で、 P_{nqr1} を用いてAFPを発現させるシステムを構築した。電位を印加していないグラファイトプレート作用極上に P_{nqr1} 下にAFPを発現するMR-1株を定着させ、その後作用極を-0.4V vs. SHEに印加した (Fig. 3)。この図に示すように、AFPは電位の印加とともに発現し、印加後60分まで蛍光強度が上昇した。これは一般的な誘導発現タンパク質の誘導時間と同等のレベルと考えられる。つまり、電位依存的遺伝子発現誘導(電気遺伝学)はバイオテクノロジーの一つの選択肢となりうると考えられる。

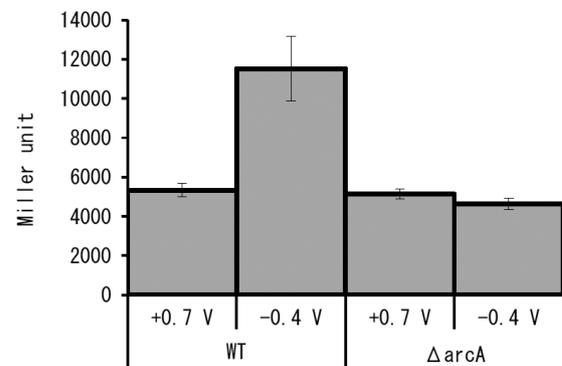


Fig. 2. Comparison of the P_{nqr1} promoter activity in the WT and $\Delta arcA$ strains in the presence of low-potential (-0.4V) or high-potential (+0.7V) electrode.

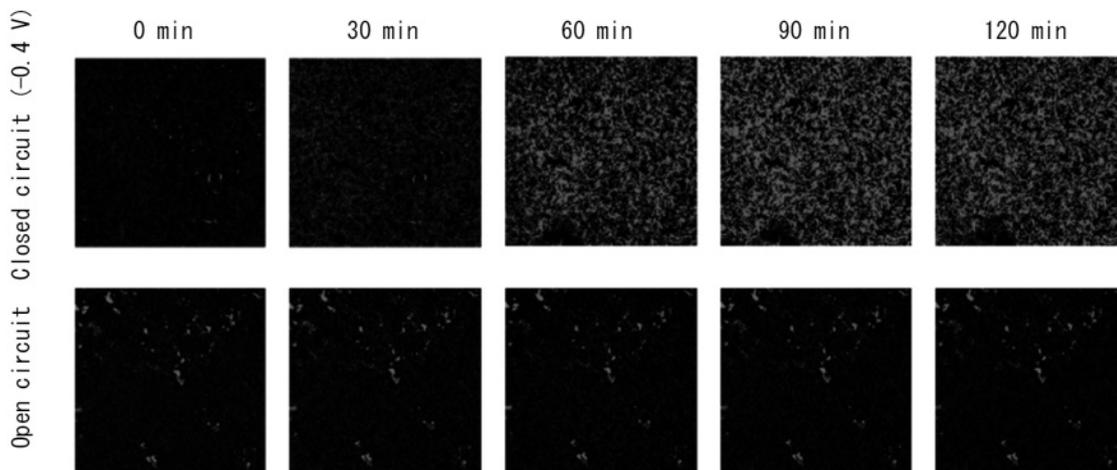


Fig. 3. Photos taken using CLSM showing MR-1 cells expressing AFP under the control of P_{nqr1} in bioelectrochemical cells. Times after the electrode potential was poised at -0.4V are shown.

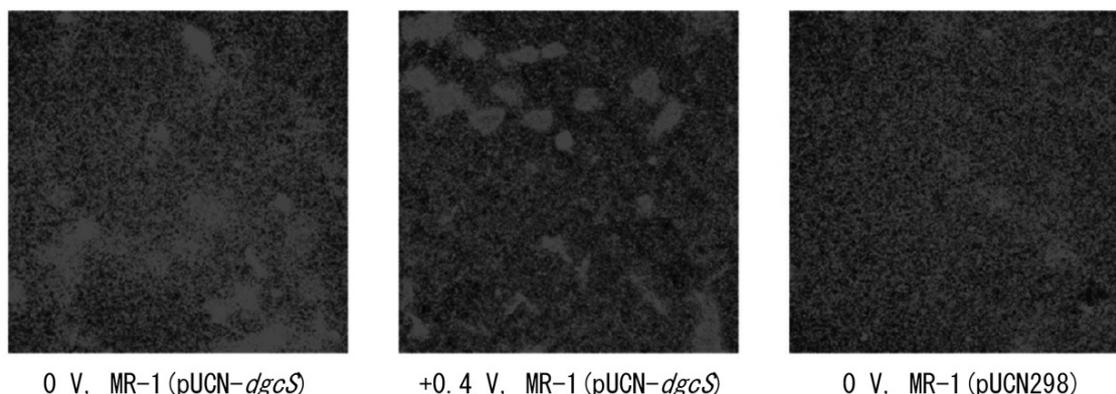


Fig. 4. CLSM photos showing biofilms on electrodes formed by MR-1 cells expressing *dgcS* under the control of P_{nqr1} . The cells constitutively expressed AFP.

電気遺伝学を行うためには、細胞が電極に付着してバイオフィルムを形成していることが望ましい。担体に付着した細胞を用いれば培地が流動する連続培養系の物質生産が可能になるが、このようなシステムにおいては培養槽に発現誘導物質を保持することは難しく、大量の発現誘導物質が必要になる。このような場合には、電気化学活性菌を電極上に保持して行う電気遺伝学が有用と考えられる。しかし、MR-1株などのEABは低電位電極上には十分なバイオフィルムを形成しないことが知られている (Kitayama *et al.*, 2017)。そこで、低電位電極上へのバイオフィルム形成を促進できないかと考え、MR-1株においてバイオフィルム形成促進タンパク質として同定された *dgcS* (Koga *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 2021) を P_{nqr1} 下に低電位存在下で発現させる系の検証を行うこととした。*dgcS* は、cyclic-di-GMP (c-di-GMP) を合成するグアニル酸シクラーゼであり、バイオフィルム中で発現上昇し、この遺伝子を破壊するとバイオフィルムが形成されにくくなることが知られている (Matsumoto *et al.*, 2021)。そこでAFPを構成的に発現するMR-1株を P_{nqr1} 下に *dgcS* を発現させるプラスミドで形質転換し、低電位でのバイオフィルム形成を観察した。その結果、 $-0.4V$ の低電位では、 P_{nqr1} 下に *dgcS* を発現させても十分なバイオフィルム形成は観察できなかった。一方、 $0V$ においては、*dgcS* 誘導発現株の方が非誘導発現株よりバイオフィルム量が増していた (Fig.4)。また、 $0V$ と $+0.4V$ において形成されるバイオフィルムの量を比較すると、 $0V$ においてバイオフィルム量が多かった。

以上の結果は、電気遺伝学によりバイオフィルム形成を制御できる可能性を示すものである。しかしその程度は十分とは言えず、今後より効果的な電気遺伝学の手法の開発が必要と考えられる。また、高電位条件でバイオ

フィルムを形成し、その後電気遺伝学を利用して低電位電極存在下に還元的物質生産を行うスキームを検討していきたい (Hirose *et al.*, 2019)。

要 約

本研究では、電気遺伝学の基盤を確立することを目的に検討を行い、 P_{nqr1} などの電位応答性プロモーターを同定した。 P_{nqr1} を使いAFPなどの外来遺伝子をEABの代表株である *S. oneidensis* MR-1において電極電位依存的に発現させることに成功し、低電位での発現を誘導や電位シフトからのレスポンス時間などを把握した。今後は、これらのプロモーターを代謝系遺伝子の発現に用い、電気制御発酵などの高効率化に役立てていきたい。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 田中 勇吾, 富岡 優樹, 鈴木 志野, 石井 俊一, 高妻 篤史, 渡邊 一哉. 電気制御発酵に向けた *Shewanella oneidensis* MR-1株の電子受容能力の向上. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月20日-23日, オンライン)
- 2) 高妻 篤史, 廣瀬 篤弥, 渡邊 一哉. 電気を感じるバクテリア: 電気化学活性細菌の電位応答機構とその応用. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月20日-23日, オンライン)
- 3) Tanaka Y, Hirose A, Kouzuma A, Watanabe K. Development of electrogenetics for facilitating electro-fermentation. World Microbe Forum (2021年6月20日-25日, オンライン)
- 4) 田中勇吾, 廣瀬 篤弥, 高妻 篤史, 渡邊 一哉. 電気遺伝学の開発に向けた電極電位応答性プロモーターの同定. 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会 (9月1日-4日, オンライン)

その他（総説・書籍・特許など）

- 1) Ikeda S, Takamatsu Y, Tsuchiya M, Suga K, Tanaka Y, Kouzuma A, Watanabe K. 2021. *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *Essays Biochem.* **65**: 355-364.
- 2) Yamada S, Takamatsu Y, Ikeda S, Kouzuma A, Watanabe K. 2022. Towards application of electro-fermentation for the production of value-added chemicals from biomass feedstocks. *Front. Chem.* **9**: 805597.

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた東京薬科大学生命科学部の高妻篤史博士ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Aravanis, A.M., Wang, L.P., Zhang, F., *et al.* 2007. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J. Neural Eng.* **4**: S143-S156.
- Endoh T, Habe H, Yoshida T, Nojiri H, Omori T. 2003. A CysB-regulated and σ 54-dependent regulator, SfnR, is essential for dimethyl sulfone metabolism of *Pseudomonas putida* strain DS1. *Microbiology* **149**: 991-1000.
- Hirose A, Kasai T, Aoki M, Umemura T, Watanabe K, Kouzuma A. 2018. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat. Commun.* **9**: 1083.
- Hirose A, Kouzuma A, Watanabe K. 2019. Towards development of electrogenetics using electrochemically active bacteria. *Biotechnol. Adv.* **37**: 107351.
- Kasai T, Kouzuma A, Nojiri H, Watanabe K. 2015. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol.* **15**: 68.
- Kitayama M, Koga R, Kasai T, Kouzuma A, Watanabe K. 2017. Structures, compositions, and activities of live *Shewanella* biofilms formed on graphite electrodes in electrochemical flow cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: 1-11.
- Koga R, Matsumoto A, Kouzuma A, Watanabe K. 2020. Identification of an ECF sigma factor that facilitates c-type cytochrome maturation and current generation under electrolyte-flow conditions in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ. Microbiol.* **22**: 3671-3684.
- Kouzuma A, Kasai T, Hirose A, Watanabe K. 2015. Catabolic and regulatory systems in *Shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. *Front Microbiol.* **6**: 609.
- Logan BE, Rabaey K. 2012. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science* **337**: 686-690.
- Matsumoto A, Koga R, Kanaly R, Kouzuma A, Watanabe K. 2021. Identification of a diguanylate cyclase that facilitates biofilm formation on electrodes by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**: e00201-21.

海洋分解性プラスチックの基材開発に資するアーキアポリ- γ -グルタミン酸

芦 内 誠

高知大学農林海洋科学部
〒783-8502 高知県南国市物部乙200

Archaeal poly- γ -glutamate, making for eco-friendly plastics development

Makoto Ashiuchi

Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University
200, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502

Synthetic polymers, such as nylons and acrylic materials, are derived from petrochemicals, and plastic materials that are improperly disposed of are serious sources of environmental pollution. Our ultimate goal is hence to create earth-friendly plastics, making for both the curb of the greenhouse effect and the development of eco-compatible processes. On the other hand, as increasing concern for microbial infection prophylaxis, the development of high-performance plastics possessing antiviral activity as well as biodegradability (or biocompatibility) has become a requisite to date. Hybrid-type polymer with a nylon-like backbone and polyacrylate-like side-chain structures, *i.e.*, poly- γ -glutamate (PGA), was focused on, because of its reasonable biodegradability and good biocompatibility. Here, high throughput cloning of archaeal PGA synthesis operon was carried out using the methylene blue-staining method, and the polymer productivities of several microbes (including *Escherichia coli* clones) were assayed under the liquid- and solid-culture conditions. Hygroscopic PGAs were successfully plasticized *via* a simple but effective *chemo*-transformation, which are called PGA ion-complexes (PGAICs). PGAIC had the potential to serve as a functional plastic showing a broad spectrum of antimicrobial activity (against food-poisoning bacteria, a prevalent species of *Candida*, and filamentous fungi), indicating its versatility in hygiene technology. PGAIC-coating agent further contributed to the inactivation of *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*. Because PGAIC was easily transformed into a nanofiberplastic, it would serve to hygienic control in public facilities such as schools, hospitals, hotels, and transportations, resulting in a decreased risk of airborne infection, contagion, and lethal pneumonia. It can also aid against an unforeseen epidemic of new viral infectors. In this study, a biodegradable plastic (aliphatic polyester-based) film was laminated with non-woven cloths from *electro*-spun PGAIC (as a moisture-induced glue) and subjected to the antimicrobial assay after soaked in sea water, implying its “switching” potential to rapidly transform into marine-degradable plastics. Such the assessments of laminated plastics are now in progress *via* the ISO-recommended procedures.

Key words: archaea, poly- γ -glutamate, ion-complex, infection-prophylactic plastics, marine-friendly nanofiber

緒 言

パリ協定やSDGs等を通じて持続的成長や社会課題の解決が叫ばれる中、「バイオ戦略2019」が策定された。

E-mail: ashiuchi@kochi-u.ac.jp

共同研究者：岩田 忠久（東京大学大学院農学生命科学研究科）
石井 大輔（東京農業大学生命科学部）
粕谷 健一（群馬大学大学院理工学府）
大田ゆかり（群馬大学食健康科学教育研究センター）

『2030年に世界最先端のバイオエコノミー社会（バイオファースト）を実現する』という到達目標が示された。国内産業のバイオ化推進の機運も急速な高まりを見せている。バーゼル条約／第14回締約国会議（COP14：2019.4.19–2019.5.10）において有害廃棄物の国境を超える移動制限の追加が可決された。G20サミット（2019.6.28–2019.6.29）では我が国のプラスチックの資源循環を総合的に推進するための戦略「プラスチック資源循環戦略」が各国に向けて発信された。海洋プラスチックごみ、地球温暖化、資源・廃棄物制約、アジア各国に

よる廃棄物の輸入規制等、多岐にわたる課題に対応するための第4次循環型社会形成推進基本計画を踏まえた方針【3R+Renewable（再生可能資源への代替）】を基本原則としている。EUでの「EUプラスチック戦略」、アメリカの「包括的物品調達ガイドライン（CPG）」、「バイオプリファードプログラム」、アジア諸国での廃プラスチックの輸入規制、タイ政府では廃プラだけでなく、電子廃棄物の制限も強化された。プラスチックのデファクト・スタンダードを獲るとして代替素材メーカーの動きも活発化している。バイオパップ（イタリア）の生分解性・リサイクル可能・肥料化可能なトレーの製造、プラスティロール（フィンランド）の完全分解性で透明なパッケージフィルムの製造等、産学の連携のもと、世界規模の環境問題の解決に資する「ボトムアップ型新素材」の開発が加速している。

環境機能新素材の開発戦略として、汎用材料の微細加工で高性能化を図る「トップダウン方式」と分子・素子間の自己組織化能を利用した「ボトムアップ方式」が提案されている。ボトムアップ方式は複雑な生命の成立にも関わるとされる。精巧組織化や超機能化が期待されるボトムアップ方式にはさらなる技術革新の余地が残されている。芦内らは、超好塩アーキアが環境適応因子として生産する「立体規則性ポリ- γ -グルタミン酸（PGA）」をボトムアップ型新素材の開発に資するバイオ系基材の第一候補に定めた。

今日、生物合成可能な天然高分子は脱石油やCO₂削減の切り札的な存在になっている。PGAは持続可能な天然高分子でありながら、石油化学合成される「ナイロンとポリアクリル酸」の双方の優れた構造特性をも有する唯一無二のハイブリッド材料である。納豆ネバの主成分であることを背景に食品用途化が進み、PGAに対する安全性や生体適合性の認知度も高い。納豆菌のPGA合成装置（PgsBCAE）の場合、PGA伸長鎖のカルボキシ基末端のリン酸化（活性化）ユニット〔（大腸菌からヒトまで普遍的に存在する）葉酸：PGA連結酵素類縁のPgsB〕、末端リン酸基脱離に伴うグルタミン酸の転移（伸長）因子〔（PGA合成装置特異的な）*N*-アシルグルタミン酸シンターゼに類縁の（疎水性）膜貫通型PgsC〕、分泌・局在化関連の表層タンパク質〔（大腸菌からヒトまで存在する）膜アンカー因子に類縁のPgsA〕、複合体安定化因子〔（PGA合成装置特異的な）ユビキチンリガーゼ複合体の楔（くさび）因子に類縁のPgsE〕が成熟型（分子量100万クラスの）PGAを合成するための「ミニマムユニット」とされている（Nascimento & Nair, 2020.; Ashiuchi, 2013）。PGA生産における「触媒ユニット」と「エクスポータ」の必須性

（運動性）に加え、触媒ユニットの構造特性がPGAの立体化学性に影響すると考えられている。さて、納豆菌とは異なり、超好塩アーキア *Natrialba aegyptiaca* は「立体規則性PGA」を菌体外に生産する（Ashiuchi, 2013）。本アーキアのゲノム情報に従えば、既知（納豆菌等）のPGA合成オペロンは存在しない。翻って考えれば、立体規則性PGA合成マシナリーの同定が新たな生化学メカニズムの発見と理解深化にも繋がる可能性が高い。

本書では、アーキアPGA合成遺伝子群のハイスループットクローニング、並びに発酵PGAの効率回収に資する「油水二相反応システム」の導入事例を紹介する。PGAの画期的なプラスチック機能化技術とその利便性等についても検討したので報告する。

実験方法

PGA合成遺伝子群のハイスループットクローニングに資する「メチレンブルースクリーニング」法

長期凍結保存していた *N. aegyptiaca* ゲノムライブラリーを復元した。具体的には、大腸菌 DH10B 株を宿主とする独立クローン約 50,000 個/mL からなるライブラリー保存液を本研究に使用した。PGAの視覚化のため、メチレンブルー染色液（メチレンブルー 3 水和物, 0.25vol%；無水エタノール, 5vol%；酢酸, 1.5vol%；蒸留水, 93.5vol%）を調製した。

酢酸セルロースに対するタンパク質の付着性は乏しい。実際、接着性の高い牛血清アルブミンでもほとんど接着しないことが分かる（Fig.1）。これまでのタンパク質研究の経験知に反して、分子接着性に優れたPGAの場合、酢酸セルロースにも強固に接着するとされている。電気的に陰性であるカルボキシ基側鎖を多数有するPGAが塩基性色素のメチレンブルーで選択的に視覚化できることから、アーキアPGA合成遺伝子群のハイスループットクローニングに資する「メチレンブルーによる陽性クローン選抜法」を考案した（Fig.2）。具体的には、上述のゲノムライブラリーをブルーホワイトセクション用培地に植菌し、37°Cで一晩静置培養後、白色コロニーを単離した。識別化した各クローンをPGA合成用GS培地（Fig.2）に移植した後、PGA生産誘導を確実にするため48時間まで培養を継続した。該培地表面を酢酸セルロース膜（孔径, 0.45 μ m；直径, 80mm）で覆い、細胞表層に蓄積した高分子物質を転写した（Fig.2, step a）。転写膜を風乾した後、低分子量の夾雑物を取り除くために水洗した。続いてメチレンブルー染色液に1分間浸した（Fig.2, step b）。染色された転写膜を蒸留水で脱色した後、再度乾燥して分析に供した。

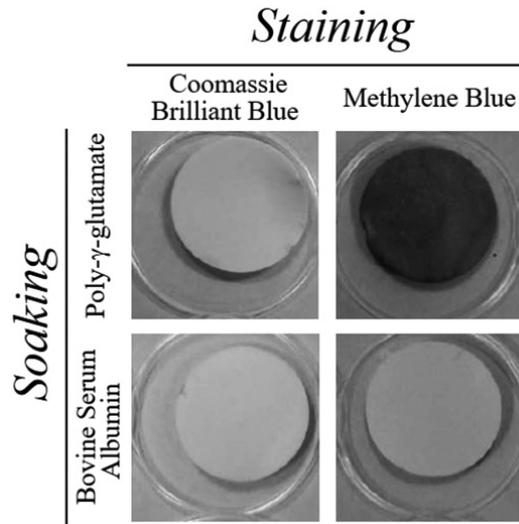


Fig. 1. Potent adhesion of poly- γ -glutamate to cellulose acetate membrane. Bovine serum albumin and poly- γ -glutamate solutions were prepared at the concentrations of 10 and 1.0mg/mL, respectively. One mL of the solutions was dropped on the membrane, followed by water-soaking and air-drying. Coomassie brilliant blue- and methylene blue staining methods were applied to the visualization of adhered protein and poly- γ -glutamate, respectively.

陽性クローンが保持するプラスミドベクターの調製とクローン化DNA断片の塩基配列決定

メチレンブルスクリーニングにより得られた陽性クローンの各々をアンピシリン添加LB培地5mLに植菌, 37°Cで16時間培養後, 遠心分離で菌体を回収した. High Pure Plasmid Isolation Kitを用い, 回収した菌体からプラスミド溶液100 μ Lを得た. 次いでBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing KitとPCR Thermal Cyclerを用いてシーケンスPCRを実施した. Sephadex G-50 Fine DNA GradeをTE緩衝液で膨張させMicro Bio-Spin Chromatography Columnに充填した脱塩カラムを作製. PCRプロダクトを供試し4200rpm/4°C/5分間の遠心分離条件下で脱塩した. 脱塩DNA溶液10 μ Lと等量のHi-Di Formamide溶液を混合した. 遺伝子解析装置ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer 10G/50に供試し. クローン化DNA断片の塩基配列を決定した.

PGA生産能に関する相対的評価基準の設定(標準化)

納豆菌の一般的なPGA生産要件(菌体用量, 10⁹細胞/mL培地; 培養温度, 30°C)における1細胞当たりのPGA生産能(10pg/細胞)を「1」と定義することで, 多種多様なPGA合成微生物との能力比較ができるようになった. また, 使用する微生物によってPGA合成に要する時間が異なるものの, これまでに「納豆菌72時間」「アーキア360時間」「大腸菌クローン24時間」が平均的な所要時間であることを認めている. 本件, かかる相対評価の値が10⁻²を下回った場合, 独自開発のPGAマイクロ精製プロセス(Ashiuchi & Misono, 2007)を介

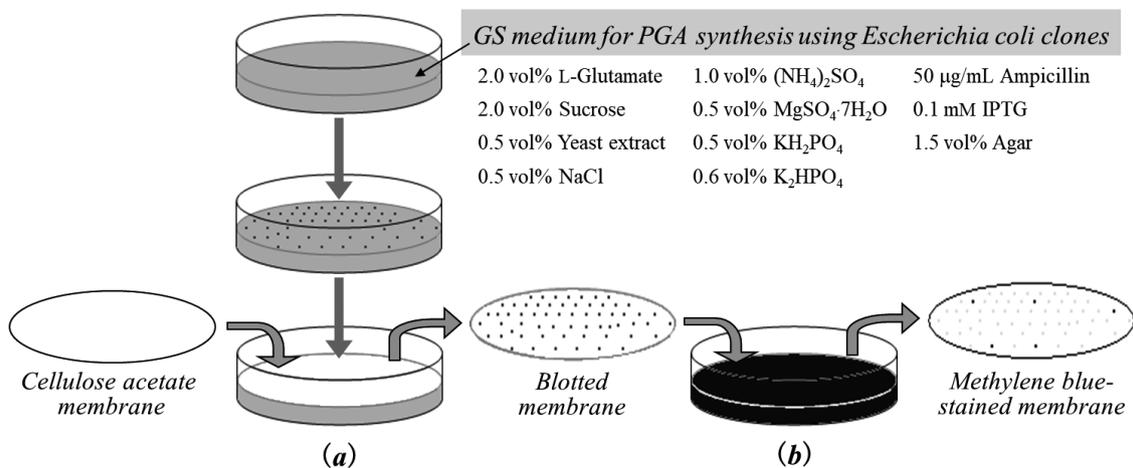


Fig. 2. a, a cellulose acetate membrane was put on an agar plate containing GS medium, where colonies of the library clones of *E. coli* developed after the cultivation at 30°C for 48h, to transfer extracellular poly- γ -glutamate from *E. coli* cells onto the membrane; and b, the method of methylene blue staining to visualize poly- γ -glutamate on the membrane.

入させた後に再評価する。なお、今回宿主として用いた大腸菌には高分子量（成熟型）PGAを合成する能力も分解する能力も持たないことが分かっている。

発酵PGAの効率回収

先行開発された特許公開技術（芦内ら，2020）に準拠して行われた。

PGAイオンコンプレックス（PGAIC）の効率製造

先行開発された特許出願技術（芦内ら，2022）に準拠して行われた。

PGAICの抗菌性評価試験

先行開発された特許登録技術（柴谷ら，2019）に準拠して行われた。

PGAICによる新型コロナウイルス不活化試験および細胞毒性試験

新型コロナウイルス（*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) JPN/TY/WK-521) 不活化試験およびヒト細胞（VeroE6/TMPRSS2/JCRB1819）毒性試験は「ISO 21702」に準拠して行われた（芦内ら，2022）。また、本試験では「プラーク測定法」に基づいて感染価を算出した。

PGAICのナノファイバー化

先行開発された特許登録技術（西村・芦内，2015）に準拠して行われた。

結果および考察

アーキアPGA合成遺伝子群のハイスループットクロニング

ショットガンクロニング／酢酸セルロース膜レプリカ／メチレンブルー染色の各手法を組み合わせたハイスループットクロニング法（Fig.2）を開発し、これまでに2株の陽性クローンを得ている（Fig.3A, PC1&PC2）。両株共通の読み枠（Fig.3B, *orfAB*）として「ペプチドグリカン合成酵素」に推定構造上の類似性が示唆される「OrfB」を発見したが、アーキアは一般にペプチドグリカンを要しない。PGAはペプチドグリカンの部分構造にみられる「イソペプチド結合」で主鎖を成すバイオポリマーであることを背景に、両株共通の読み枠には「アーキアPGA」合成装置の中核部位がコードされているとの作業仮説を立てた。次いで納豆菌（*Bacillus subtilis*）、好塩アーキア（*N. aegyptiaca*）、納豆菌のPGA合成遺伝子群 *pgsBCAE* を保持する大腸菌クローン（PGS）、並びに上記のアーキアPGAを合成する大腸菌クローン（PC1&PC2）の1細胞当たりのPGA合成能を精査比較した（Fig.3C）。さらに、液体振盪培養（Liquid）と固体静置培養（Solid）の違いにより該PGA合成能に差が生じるかどうかについても調査した。まず、好塩アーキアではSolid条件のみPGAを生産し、これまでの情報と矛盾しない結果になった。Solid, Liquidのいずれの条件でもPGA生産が認められる納豆菌でも本質的にはSolid条件の方が1細胞当たりのPGA合成能が高いことが示された。大腸菌クローンを用いた

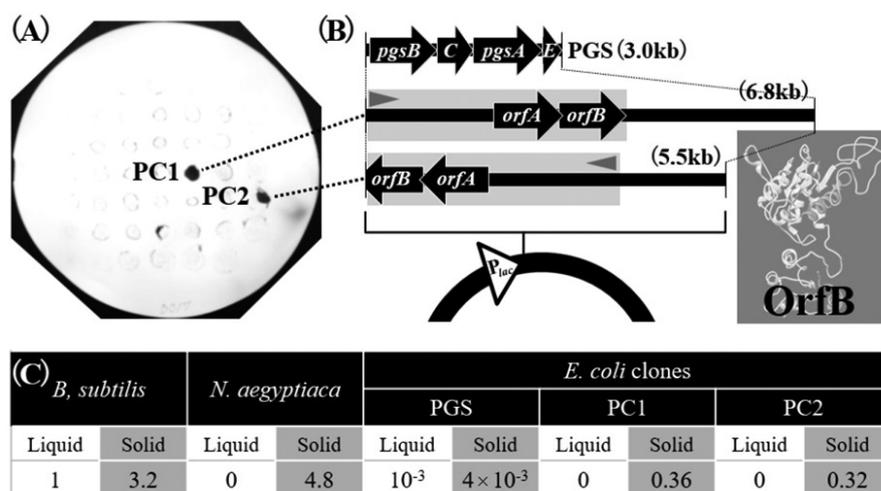


Fig. 3. Identification and functional analysis of archaeal poly- γ -glutamate synthesis operon. Panels A, positive clones; B, cloned operon structures; and C, poly- γ -glutamate productivities (x10pg/cell) of several microbes under the culture conditions.

比較実験の結果はさらに興味深いものになった。実際、納豆菌由来の該遺伝子群を持つ PGS クローンでの場合、培養の形態に関わらず PGA を合成したが、好塩アーキア由来の該遺伝子群を持つ PC クローンにはともに Solid 条件下でのみ PGA を生産するという性質が引き継がれていた。さらに、PGS クローンよりも大量に PGA が合成できることも分かった。これまで PGA 研究に携わってきた本件代表者の私信として Liquid 条件でも無理なく PGA を生産する納豆菌やその近縁種の方がむしろ稀有な存在で、それ以外の PGA 生産種 (Ashiuchi *et al.*, 2006) では一般に Solid 条件依存性であると考えている。現在、Solid 条件依存的な生産特性を打破する新機能遺伝子の同定と単離を図るため、納豆菌とアーキアの PGA 合成遺伝子群を基礎とするクロスハイブリッドオペロンの作製と大規模な塩基配列の改変による微生物細胞の生産機能拡張という新たな研究課題にも取り組んでいる。

発酵 PGA の効率回収を可能にする「油水二相反応システム」の導入

アーキア PGA 合成遺伝子群のハイスループットクローニングという課題に取り組む一方、低分子のファインケミカルや微量の酵素タンパク質の増産で成功している遺伝子工学がバイオポリマーにもそのまま適用可能とみる風潮には注意が必要と考える。実際、成熟型 PGA の発酵合成は培地総重量の 1% 程度で限界を迎えるが、かかる制限は PGA 自体の物理化学特性 (粘性等) によるところが大きい。一般の納豆菌でも容易に到達で

きる濃度域であることを考えれば、PGA の発酵合成を司る分子装置の発現量 (転写翻訳等) を高めても実質的な PGA の増産には繋がらないという結果は想像に難くない。言い換えれば、ワンバッチ当たりの生産性に重きを置く従来型の戦略が (産業展開が期待されている) 発酵バイオポリマー (PGA 等) の低コスト化・汎用化にはさほど有効ではないということを意味する。一方で現行の PGA 回収方法には改良の余地が残されていた。実際、エタノール等の大量投入とそれに伴う処理液容量の増大、混入した大量の不純物を除去するための多段階精製プロセス等、コスト高に繋がる多くの課題が解決できずにいた。芦内らは、歯磨き粉の薬用成分「ヘキサデシルピリジニウムカチオン (HDP⁺)」と「アニオン性 PGA」の間で発生する選択性の高い (協同的) 会合現象「イオンコンプレックス (IC) 化」を見いだすとともに (Ashiuchi *et al.*, 2018)、反応原理に基づき簡便・迅速、かつ特異的な発酵 PGA の連続回収法を完成させている (芦内ら, 2020)。新製のイオン結合性複合体は、「PGA イオンコンプレックス (PGAIC)」と呼ばれている (Fig. 4A)。アニオン性 PGA が (水に易溶・アルコールに絶対不溶の) 超親水性ポリマーとして振る舞うのに対し、PGAIC の方は (水に絶対不溶の) 耐水性超分子物質として回収することができる。低級・中級アルコールには超溶解性を示すことも分かっている。実際に PGAIC/エタノール溶液ならば、該重量 (wt)% (容量 (vol)% ではない) 換算で最大 80% に達し、溶剤にゾル・ゲル性を帯びさせることも可能である。今回、PGA・

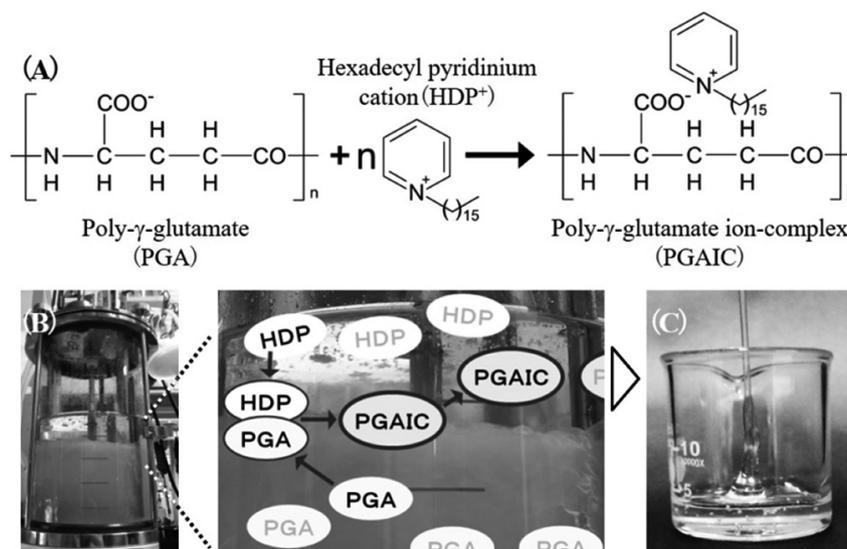


Fig. 4. Synthesis and properties of poly- γ -glutamate ion-complex. Panel A, formation of γ -glutamate ion-complex from poly- γ -glutamate and hexadecyl pyridinium cation; B, recovery of poly- γ -glutamate as poly- γ -glutamate ion-complex; and C, viscous nature of poly- γ -glutamate ion-complex in alcohol.

PGAIC間で認められる劇的な溶解特性の変化を利用した「油水二相反応システム」がPGA発酵生産プロセスにも導入できるかどうかの検討を重ねた (Fig.4B)。結果、発酵PGAの反復回収と油相中でのPGAICの連続濃縮が可能になるものと示唆された (Fig.4C；芦内ら, 2020)。本システムを構築する上で「油相形成に用いるアルコール種の選定」が最重要課題になるとの推測がなされていた。本件の選定にあたっては、①相分離特性；②水への溶解度；③飽和水の殺菌能；④PGAICの溶解度；の4点を検討事項とした。脂肪族一級アルコール類を対象に調査したところ、ペンタノール [①あり；②(疎水パラメータからの換算値として) 2.2wt%；③(バシラスに対するMKCとして) >2.2wt%；④~50wt%] が好適溶媒として選定された。また、②と③の数値からペンタノール飽和水の殺菌力は乏しいが静菌的な効果が現れる可能性は避けられないため、使用したPGA生産菌の増殖可能菌体数を逐次追跡する工程を組み込むことで最新の特許公開技術 (芦内ら, 2020) にまで仕上げることができた。参考までに、エタノールの場合、③の数値は>50wt%と高濃度を要するが、実際には②が任意 (<∞) であるが故に、殺菌力のある (ウイルス不活化も可能な) アルコール溶液として広く利用されている。

PGAのイオンコンプレックス化と先進機能性超分子部材等としての新用途開発

わが国でも持続可能な開発目標SDGsへの関心が高まっている。PGA・PGAICは、『17』の世界目標のうちでも12番目「つくる責任・つかう責任」との親和性が高い。さらに、13番目の気象変動 (地球温暖化等) 対策では「グリーントランスフォーメーション (GX)」が切り札的存在になりつつあるが、「脱炭素・脱化石資源」の方向性にも適うPGAICプラスチックにはGXビジョンを支える新たな社会基盤材料としての価値顕在化に期待が持てる。ポストコロナ世代が中心となる「人新世・ポストSDGs」の時代には、さらに「こわす責任」まで意識できるような環境配慮社会へと成長することが望まれる。過日のエレン・マッカーサー財団による『2050年には海洋プラスチックごみの総重量が魚を超える』とした報告書は世界に衝撃を与えた (ELLEN MACARTHUR FOUNDATION, 2016)。利便性・経済性を重んじ「こわす責任」を放棄し続けてきたプラスチックの開発戦略が「海の豊かさ」を守ろうとする14番目の目標を脅かしている。一方、飲料水や医療品を貧困な地域にも行き渡らせるとした第3番目の目標「ユニバーサル・ヘルスカバレッジ」に照らせば、安くて軽い化成プラスチックに求められる役割はポストコロナの社会でも変わらず大きくなると予想される。逆に自然環境中の微生物が活発

に増殖することを許容する代償としての「生分解性」を謳うこれまでのバイオプラスチックでは、公衆衛生の強化が求められる今日、いわゆる「ウイズコロナ」の時代においては産業化や社会実装に寄せられた期待も小さく萎む恐れがある。コロナパンデミックと環境汚染・気象変動といった地球レベルの難題に曝される現代社会において、殺菌 (微生物活動の排除) と生分解 (微生物活動の促進) という明らかに相反するとされてきた機能の両立を可能にする稀有のバイオ新素材「PGAIC」の早期実用化を求める声が日増しに高まっている。本著では、先進機能性超分子部材等としての新用途の開発にも繋がるような画期的な事例を紹介する。

現下の世界的な情勢や期待を鑑み、超広域抗菌スペクトルを具備するPGAICを部材とするポリマーコーティング剤 (芦内ら, 2022) が新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) にも不活化効果が発揮できるかどうかを調べた。プラスチック表面 (PET等) でSARS-CoV-2は長時間にわたり感染性を維持するとされていたが、本試験でもこれまでの知見に矛盾しない結果が得られた (Fig.5A)。これに対しPGAICでコーティングされたPETフィルムで試験した場合、SARS-CoV-2は事実上完全に不活化されていることが明らかになった (Fig.5B；細胞無毒性も同時に確認)。2020年10月29日、国際機関IPBESは170万種のウイルスが未発見であり、最大85万種がヒトに感染しうると報告した。未知ウイルスの拡散抑止 (広範な捕捉や不活化を介した) のための「零次の防御壁」を開発し、ポストコロナの社会構造やインフラ (鉄道・学校・病院・住宅等) においては、標準的な生活機能として導入を急ぐ必要がある。これを「社会免疫」 (芦内, 2021) と呼ぶ。変異しやすい遺伝子産物 (新型コロナのスパイクタンパク質等) を標的とする特異点重視 (ワクチン等) の戦術とは一線を画す構想であり、「エンベロープ」と呼ばれる (新興・再興ウイルスに多い) 共通

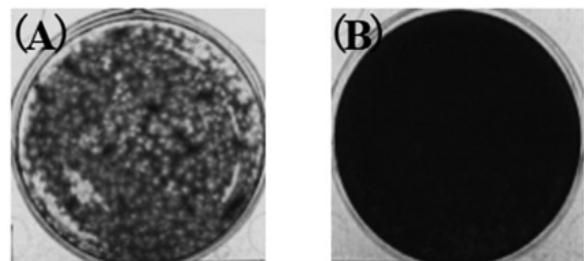


Fig. 5. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by poly- γ -glutamate ion-complex agent. Panels A, plaque formation of SARS-CoV-2 survived on PET films; and B, that on poly- γ -glutamate ion-complex-coated PET films.

点を叩くことのできるPGAICプラスチック部材の社会実装を進め、未知のウイルス感染症の侵入等に対しても零次の段階で「防御する」ことを提案する。

今日のコロナ禍では、感染拡大阻止に資する新技術が強く求められる一方、ポストコロナに入ると、より多面的な解決策が求められ、環境や持続可能性にも配慮した新成長戦略が必要になる。微生物やウイルスの捉え方にも変化が生まれる。例えば、共有結合で重合した（従来型の）プラスチックがPGAICと同程度の「抗菌・抗ウイルス効果」と半永久的な「環境（外部刺激）耐久性」を持ち得た場合、自然流出により、分解者そのものの活力を根本から奪う恐れがある。特に、難培養微生物が大半を占める海洋においては、一元的な発想に頼って作り続けられる抗菌・抗ウイルス製品が別次元の海洋破壊の引き金になる恐れがある。PGAICに「環境配慮型」超分子材料としての適性が確認されている（Ashiuchi *et al.*, 2018）。ここではPGAICのさらなる高性能化と汎用化を図るため、量産型ナノファイバー部材の開発に着手した。種々検討の結果、PGAIC 50gからナノファイバー塗布シート（規格、90cm×4.0m；目付、0.6g/m²；基材、PET不織布）にしてワンロール分が製造できるまでになった（Fig.6）。PGAICナノファイバーは耐水性だが、水中に置くと材質不問の接着性を回復することが分かっている。かかる「水中接着性」を利用し、生分解性プラスチック（脂肪族ポリエステル製）との重層フィルムを調製した（Fig.6, step a）。次いで重層フィルムを水道水（Fig.6, step b）と海水（Fig.6, step c）の各々に室

温（～25℃）で2時間浸漬後、代表的な水系微生物「大腸菌」（柴谷ら, 2019；Hakumai *et al.*, 2016）の培養基に投入したところ、本重層フィルムにも優れた抗菌性が認められる一方（step b）、海水中ではごく短時間（実験室条件で数分程度）で生分解性に復帰する「スイッチング機能」が発揮されていることが示された（step c）。今後、海洋生分解性評価試験（ISO標準化；Fig.6, step d）を活用しながら、分解加速現象の立証に繋がるような画期的な成果を取得する等、本件のより一層の進展が待たれる。

要 約

微生物は肉眼では見るることのできない微小な存在であるが、地球上のあらゆる環境に生息し、地球の成り立ちや私たちの生活にも密接な関わりをもっている。事実、熱水が噴出する海底の高温環境、極地等の低温環境、深海のような高圧／超貧栄養環境、塩湖のような高塩環境等、極限環境に適応している。地球外生命探索のモデルにもなりそうな「（アーキアを含む）極限環境微生物」の適応戦略に関する理解を深め、終局、「新産業成長分野の創出」や「今日的課題の克服」にも繋げようとする学術構想への期待は大きい。一方、極限環境微生物は、その特殊な培養条件等から、汎用的な「バイオ変換工場」としての応用には不向きとされ、環境配慮型プラスチック基材として期待される「アーキアPGA」についてもその生合成を司る分子装置に関する知見は皆無であること等、多くの課題が残されていた。本研究では、まずアー

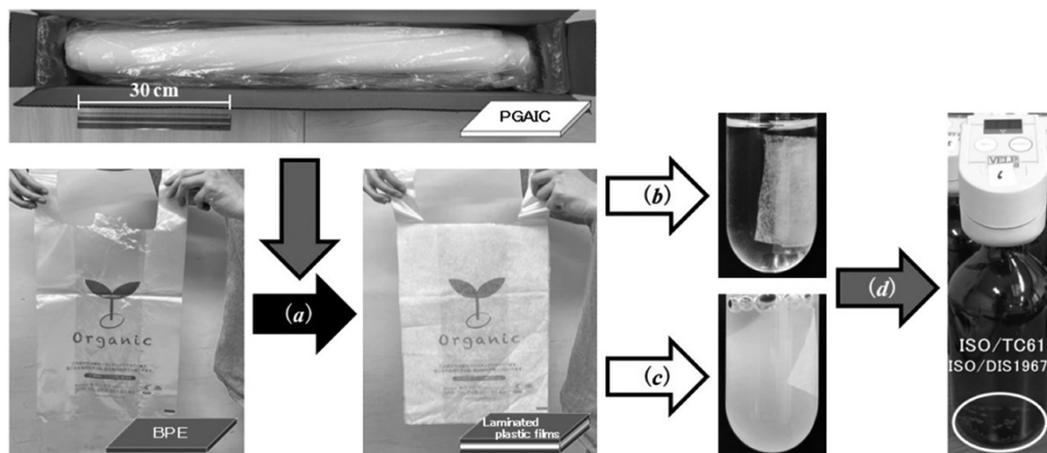


Fig. 6. Mass-fabrication of poly- γ -glutamate ion-complex and its application to prepare absorbent non-woven cloths made out of *electro*-spun. Steps a, an aliphatic polyester-based biodegradable plastic film was laminated with poly- γ -glutamate ion-complex as a hydrophilic coating agent; b, the antimicrobial activities of the laminated film against *E. coli* were assayed in tap water; c, or in sea water; and d, the assessment of the degradability of the laminated film in marine environment according to ISO standards is now in progress.

キアPGA合成遺伝子群のハイスループットクローニングに着手した。単離した遺伝子群のインビボ分析から、アーキアPGA合成装置は「固体培養に依存した機能発現調節機構」に支配されている可能性が示唆された。以後、納豆菌とアーキアのPGA合成遺伝子群に基づいたクロスハイブリッドオペロンの作製とそれを利用したPGA生産機構の全容解明が求められるようになった。最近、ワンバッチ当たりの生産性向上に重きを置く従来の方法論が発酵バイオポリマー（PGA等）の低コスト化・汎用化には有効ではなく、むしろPGA回収技術の方に改良の余地が残されていることが分かってきた。今回、発酵PGAの効率回収に資する「油水二相反応システム」の導入事例を紹介した。本件は最新の特許公開技術（芦内ら、2020）にまで仕上げることができた。また、この反応プロセスで新製されたイオン結合性複合体「PGAIC」は、コロナパンデミックと環境汚染・気象変動といった地球レベルの難題に曝される現代社会において、殺菌（微生物活動の排除）と生分解（微生物活動の促進）という明らかに相反するとされてきた機能の両立を可能にする稀有のバイオ新素材という位置づけにあることが分かってきた。実際、PGAICを含むポリマーコーティング剤が新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対する不活化効果を発揮することに加え、環境先進的なスイッチング機能を備えたPGAICナノファイバーの量産化と接着繊維性部材としての新たな応用例についても触れた。現下の世界的な情勢を鑑み、アーキアPGAから創り出すことのできる環境配慮型「メディシナルプラスチックス」（芦内、2021）の実装化を急ぐ必要がある。今後、異分野融合技術の導入を視野にあらゆる試みに挑戦する。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 白米優一, 芦内 誠. 2020. イオンコンプレックス化によるポリ-ε-リジンの抗菌性能強化. 日本生化学会大会 (9月14-16日, オンライン)
- 2) 芦内 誠, 白米優一. 2020. メディシナルバイオプラスチックスと、「社会免疫」(ソーシャル・イムニティー)という新たな可能性について. 日本人工臓器学会大会 (11月12-14日, 高知)
- 3) 芦内 誠, 白米優一. 2020. 抗菌性と生分解性の両立を可能にするスイッチング・バイオプラスチックス新素材の開発. 日本生物工学会西日本支部大会 (11月14日, 岡山)

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 芦内 誠, 白米優一, 大岩聖佳, 石原 悠. 2020. イオン性ポリマーの製造方法. 特開2020-158677 (国立大学法人高知大学, 出光興産株式会社)
- 2) 芦内 誠, 白米優一, 大成冬真. 2021. 接着剤と接着方法. 特願2021-059214 (国立大学法人高知大学)
- 3) 芦内 誠, 白米優一, 小野寺正孝. 2022. ポリ-γ-グルタミン

酸イオンコンプレックスの製造方法. 特願2022-060467 (国立大学法人高知大学, 東洋濾紙株式会社)

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた東洋濾紙株式会社・小野寺正孝氏(新型コロナ不活化試験等)、シノワ株式会社・塩見健太 (PGAIC ナノファイバー量産化等)、高知大学農林海洋科学部・環境バイオマテリアル学研究室 (旧生物工学研究室) の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Ashiuchi, M. 2013. Microbial production and chemical transformation of poly-γ-glutamate. *Microb. Biotechnol.* **6**: 664-674.
- 芦内 誠. 2021. メディシナルバイオプラスチックスと、「社会免疫」(ソーシャル・イムニティー)という新たな可能性について. *人工臓器* **50**: 22-25.
- 芦内 誠, 白米優一, 大岩聖佳, 石原 悠. 2020. イオン性ポリマーの製造方法. 特開2020-158677 (国立大学法人高知大学, 出光興産株式会社)
- 芦内 誠, 白米優一, 小野寺正孝. 2022. ポリ-γ-グルタミン酸イオンコンプレックスの製造方法. 特願2022-060467 (国立大学法人高知大学, 東洋濾紙株式会社)
- Ashiuchi, M., Hakumai, Y., Nakayama, S., Higashiuchi, H. & Shimada, K. 2018. Engineering antimicrobial coating of archaeal poly-γ-glutamate-based materials using non-covalent crosslinkages. *Sci. Rep.* **8**: 4645 [p. 1-9].
- Ashiuchi, M. & Misono, H. 2007. Micro-purification and structural assays of poly-γ-glutamate, a D-amino acid-containing biopolymer. *In* Konno, R., Brückner, H., D'Aniello, A., Fisher, G., Fujii, N. & Honma, H. (eds.), *D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acid and Protein Research—Practical Methods and Protocols*, p. 403-407 (Chap. 5.7), NY, Nova Science Publishers.
- Ashiuchi, M., Nakamura, H., Yamamoto M. & Misono, H. 2006. Novel poly-γ-glutamate-processing enzyme catalyzing γ-glutamyl DD-amidohydrolysis. *J. Biosci. Bioeng.* **102**: 60-65.
- ELLEN MACARTHUR FOUNDATION 2016. *The New Plastics Economy: Rethinking the Future Plastics*.
- Hakumai, Y., Yamaguchi, K., Nakayama, S. & Ashiuchi, M. 2016. Effective elimination of water-borne *Escherichia coli* using archaeal poly-γ-glutamate-based materials. *AIMS Microbiology* **2**: 222-229.
- Nascimento, B.M. & Nair, N.U. 2020. Characterization of a membrane enzymatic complex for heterologous production of poly-γ-glutamate in *E. coli*. *Metab. Eng. Commun.* **11**: e00144.
- 西村浩和, 芦内 誠. 2015. 繊維とその製造方法. 特許第5709158号 (東洋紡株式会社, 国立大学法人高知大学)
- 柴谷滋郎, 中森雅彦, 白馬弘文, 宝田 裕, 芦内 誠. 2019. 抗真菌剤およびコーティング剤. 特許第6488473号 (東洋紡株式会社, 国立大学法人高知大学)

植物バイオマス生産を制御する微生物由来 気相コミュニケーション物質に関する包括的研究

上 田 晃 弘

広島大学大学院統合生命科学研究科
〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4

Comprehensive research on microbial substances in gas phase communication to regulate plant biomass production

Akihiro Ueda

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University
1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 739-8528

This research was aimed to understand indirect interactions between plants and microbes through comprehensive identification of microbial substances in gas phase communication to regulate plant biomass production. Indirect interactions between plants and microbes were studied by cultivating both organisms in the same petri dish without direct contact. Bacterial species isolated from different environments showed either beneficial or detrimental effects on *Arabidopsis* growth. Some of the microbial volatile organic compounds (mVOCs) emitted from beneficial bacteria had growth promoting effects on *Arabidopsis*. Thirty-four differentially expressed genes were identified in response to 2-undecanone, one of the beneficial mVOCs. 2-Undecanone treatment highly induced expression of the *OSR1* gene whose product functions in enlarging organ size in *Arabidopsis*. These findings implied that *Arabidopsis* growth promotion may be controlled by the *OSR1* function through 2-undecanone mediated transcriptional activation.

Key words: Plant growth promotion, Plant-microbe interaction, 2-Undecanone, Volatile organic compounds

緒 言

近年、持続的な植物生産体制構築への関心が高まりつつある。開発途上国を中心とした人口増加に伴う食料需要の増加に対応するためには、農耕地面積の拡大か、植物生産の効率化を図る必要がある。しかしながら、世界的な砂漠化や土壌の劣化が進む中で農耕地面積の大幅な増加は見込めないため、作物品種や肥培管理技術の改良による植物の生産性向上のための技術開発に期待が寄せられている。温暖化やゲリラ豪雨、海面上昇等の気候変動にも対応しつつ、自然生態系や環境にも配慮した農業活動が求められている。また、国際情勢の悪化による肥料資源や燃料資源の高騰は農業生産を不安定にする（清水, 2010；俵谷・和崎, 2012）。これらの資源は有限であるため、その効率的な利用方法や環境中における資源

リサイクル技術の開発も不可欠である。

このような情勢の中、化学肥料や化学農薬に頼らない、あるいはその使用量を低減させることを目的とした微生物資材の開発やその利活用が注目されつつある（Mahanty *et al.*, 2017）。微生物資材とは、農業生産現場において植物の生産性の増加や安定化を図ることを目的として使用される微生物（群）を資材化したものである。微生物資材として使用される微生物は、植物の生育促進に資する能力を持つことから植物生育促進微生物（Plant Growth Promoting Microbe, PGPM）とも呼ばれる。最も普及した微生物資材の1つに根粒菌資材が挙げられる。マメ科植物と双利共生関係を築き、大気中の窒素固定能を有する根粒菌はマメ科植物栽培時の窒素施肥量の軽減に役立つ。他にも様々な属種や能力を持ったPGPMが単離され、その生理学的特性の解明や微生物資材化の研究が進んでいる。例えば、植物の必須元素のうち、リンや鉄は植物が容易に利用できない形態で土壌中に存在することが多いが、ある種の微生物には土壌中で金属類

と結合して難利用性となったリンの可溶性能や微生物等の利用により有機態リンとなったフィチン分解能、また、難溶性の鉄やカリウムの可溶性能が見られる。これらの能力を有した微生物の生理活性が活発な土壌では、難利用性の必須元素が植物に吸収されることで必須元素の循環化が促進される。その他、植物の生育促進に資する植物ホルモン（様）物質の生産や植物病原性微生物への拮抗作用（染谷ら, 2017）、植物の環境ストレス耐性の向上（Mani *et al.*, 2016; Nautiyal *et al.*, 2013）など、様々な微生物の単離事例が報告されている（Gouda *et al.*, 2018）。

上述のような PGPM の単離手法は植物や土壌根圏への微生物の直接接種が主流であった。植物細胞内への侵入力が弱い細菌の場合には、植物に傷をつけたり、圧力調整によるインフィルトレーション法で植物内部へと細菌を侵入させたりすることで感染を成立させる。このように植物と微生物が直接近傍で物質の授受を介して相互作用することを直接的相互作用という。植物-微生物直接的相互作用では、近接する植物細胞と微生物間で主としてアミノ酸やタンパク質、糖類などの水溶性物質が互いに影響を及ぼす。マメ科植物が根粒菌との共生関係を成立させるときに放出するフラボノイド類、微生物が放出する植物の根の生長を促進させるオーキシン様物質、病原性微生物が植物細胞内に分泌するエフェクター分子などはこの一例である。植物-微生物相互作用の理解は直接的相互作用研究によって多くの知見がもたらされてきたのが現状であるが、近年、植物と微生物は間接的にも相互作用しうる事例が報告されてきた（Park *et al.*, 2015; 上田ら, 2019）。間接的相互作用では植物と微生物間には隔たりがあるため、双方が放出するガス状物質（主に揮発性物質）がコミュニケーションツールとして使われる。ガス状物質の中には、他の生物種の生理状態に影響を及ぼすものがあることも分かってきた。例えば、細菌が放出する 2-undecanone は植物生育促進作用、dimethyl disulfide は植物生育抑制作用をそれぞれ持つ（Ledger *et al.*, 2016; Plyuta *et al.*, 2021）。しかしながら、微生物がなぜそのような物質を放出するのか、どのような環境刺激によりその生産を加速させるのか、またガス状物質を放出する生態的意義など、全貌は明らかとなっていない。本研究では、植物-微生物間接的相互作用の検出をベースとして、植物のバイオマス生産を制御しうる微生物由来の気相コミュニケーション物質（微生物由来揮発性物質, microbial volatile organic compounds, mVOCs）が存在するのかを検証し、気相コミュニケーション物質の同定やそれを生産する微生物種の同定を行い、微生物由来の気相コミュニケーション物質による植物生育促進機構の解明を目的とした。植物バイオマス生

産に影響を与える mVOCs の網羅的な同定により、有用植物の生産性を向上させる栽培技術の確立の基盤を構築する。

実験方法

自然環境からの微生物の単離

様々な環境の土壌や植物、水サンプルから培養可能な微生物の単離を行った。サンプル採取は、高塩環境（広島県安芸津市、岡山県瀬戸内市、北海道厚岸町、沖縄県石垣市）や高温・低 pH 環境（大分県別府市）、貧栄養環境（広島県東広島市、北海道清里町）などで行った。土壌サンプルは 10 倍量の滅菌生理食塩水中で 24 時間激しく振盪し、その上清を微生物の単離に用いた。植物サンプルは乳棒と乳鉢ですりつぶした後に 10 倍量の滅菌生理食塩水を添加して 24 時間激しく振盪し、その上清を微生物の単離に用いた。それぞれの上清や水サンプルは LB 培地（1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl）や PDA 培地（3.9% (w/v) Difco PDA, 0.01% (w/v) Chloramphenicol）に適当な倍率で希釈後に塗布し、培養可能な細菌や真菌のシングルコロニーの単離を行った。

シロイヌナズナとの隔離共培養系を用いた植物生育促進微生物のスクリーニング

2 分割シャーレ内の片側に 1/2 濃度の MS 培地（Murashige & Skoog, 1962）、もう片側に LB 培地あるいは PDA 培地を作成した。シロイヌナズナ（Col-0）の種子は 1 滴の Tween-20 を添加した 2% (v/w) 次亜塩素酸ナトリウム溶液中で 15 分間表面殺菌を行った後、滅菌水で数回洗浄後に 4℃ で 5 日間の春化处理を行った。1/2 濃度の MS 培地上にシロイヌナズナの種子 10~15 粒を播種し、LB 培地あるいは PDA 培地上には単離済みの細菌あるいは真菌を接種した。2 分割シャーレはパラフィルムとサージカルテープで密閉し、23℃、16 時間日長、光強度 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件下でシロイヌナズナと微生物の隔離共培養を行った。約 15 日間培養後、シロイヌナズナの乾物重量を測定した。微生物非接種区のシロイヌナズナの乾物重量をベースとして、微生物接種区の相対乾物重量を評価した。植物生育促進効果を示した細菌種の同定については定法に従って、16S rDNA 配列の解読と BLASTn 解析により行った。

GC-MS 分析

植物生育促進効果を持つ細菌シングルコロニーをかきとり、20 mL の LB 液体培地内で増殖させた。恒温振盪培養器内で 28℃、回転数 120 min^{-1} で 24 時間振とう培養

後、新鮮な20mLのLB培地に濁度(OD₆₀₀)が0.01となるように再懸濁して再度、24時間振とう培養を行った。培養フラスコ上部の気相に蓄積された細菌由来のガス状物質はSPME法により15分間、捕集・濃縮した。SPMEファイバーに捕集されたガス状物質は、ガスクロマトグラフ-質量分析器(GC-MS)による定性分析に供試した。得られたマススペクトラムを用いて化合物ライブラリー検索を行った。

揮発性物質を用いたシロイヌナズナの生育促進作用の検証

2分割シャーレ内の片側に1/2濃度のMS培地を作成し、もう片側にはGC-MSにより同定された揮発性物質を様々な濃度で十分に湿らせた1cm²のろ紙を置いた。1/2濃度のMS培地上にシロイヌナズナの種子10~15粒を播種し、シャーレをパラフィルムとサージカルテープで密閉し、23℃、16時間日長、光強度100μmol/m²/sの条件下で培養を行った。約15日間培養後、シロイヌナズナの乾物重量を測定した。揮発性物質の植物生育促進効果はイネを用いた温室内の土耕でも検証した。水稻育苗用粒状培土でイネを1か月間栽培した。ミルサーで粉碎した乾物サンプル(50mg)は2mL硝酸と1mL過酸化水素水中で120℃、3時間酸分解してその後、誘導結合プラズマ発光分光分析器(ICP-OES)を用いた元素分析に供試した。網羅的遺伝子発現解析のために、パーミキュライトを用いた土耕ポット栽培を行った1か月齢のシロイヌナズナ個体を100μM 2-undecanoneを充満させた2L容器内に24時間静置(揮発処理)、あるいは2-undecanone溶液を葉面散布して2L容器内に24時間

静置(スプレー処理)した。その後、葉からTotal RNAを抽出してBGI株式会社のRNA sequence解析に供試した。反復は各処理区から独立した2サンプルを供試し、発現量に有意な差が見られた遺伝子群の抽出を行った。

結果および考察

間接的相互作用によりシロイヌナズナの生育を制御する微生物群のスクリーニング

2分割シャーレを用いた隔離共培養をベースとした植物-微生物間接的相互作用系を用いて、植物生育促進効果を持つ微生物群のスクリーニングを行った。細菌800種類を隔離共培養した時のシロイヌナズナの相対乾物重を評価した(図1)。一次スクリーニングの結果、132種類の細菌がシロイヌナズナの乾物重量を1.5倍以上に増加、253種類の細菌が0.5倍以下に減少させたことが分かった。シロイヌナズナの生育抑制作用を持つ細菌群のうち、201種類はシロイヌナズナの発芽そのものを抑制し、52種類は発芽後の実生の生育を抑制していた(図1)。この観察結果から、細菌が放出する揮発性物質には発芽抑制と実生の生育抑制と2つの異なる生理作用を持つものが存在することが推察された。生育促進作用を示した細菌群は再現性を検証するために二次スクリーニングに供試した結果、43種類まで絞り込むことができた。真菌については、自然環境から単離した150種類について同様のスクリーニングを実施したが、シロイヌナズナの生育を顕著に増加させる種を見つけることができなかった。生育促進および生育抑制効果を示したシロイヌナズ

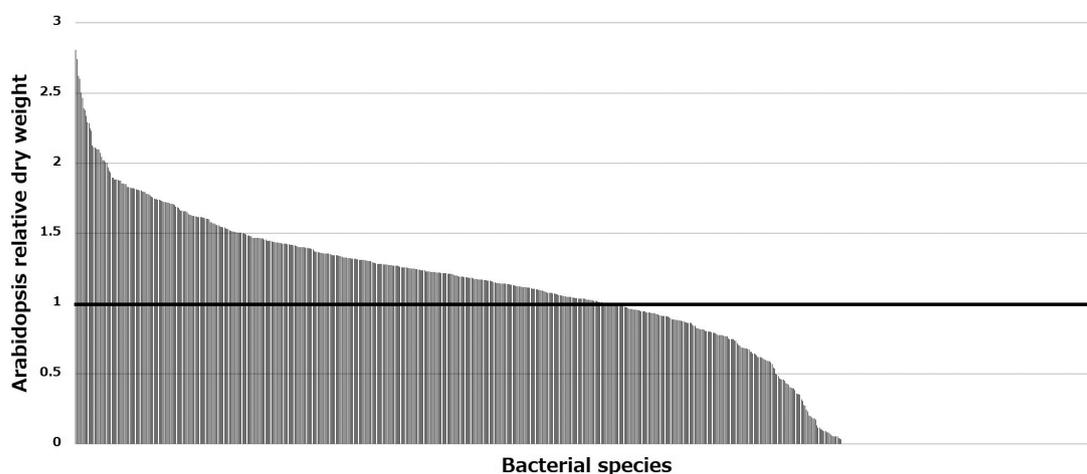


Fig. 1 Screening of plant growth promoting bacteria through indirect interactions between Arabidopsis and bacteria. Eight hundreds bacterial species isolated from different natural environments were screened to test whether each bacterium can affect Arabidopsis growth. Arabidopsis relative dry weight was evaluated by the ratio of dry weight cultivated with bacteria to dry weight cultivated without bacteria.

ナと細菌の隔離共培養の様子を図2に示した。

スクリーニングにより得られた43種類の細菌群について、16S rDNA配列に基づいた菌種同定を行った。その結果、間接的にシロイヌナズナの生育を促進させる26種類の細菌群の属種が明らかとなった(表1)。多様な細菌群がシロイヌナズナの生育促進作用を持つことが分かった一方で、*Pseudomonas syringae*のように一般的には植物病原性細菌に分類される菌種も同定された。

気相コミュニケーション物質の同定

次に、植物—微生物間接的相互作用において植物の生

育促進に資する微生物由来の気相コミュニケーション物質(ガス状物質)の同定を試みた。微生物の体内で生産されて気相に充満する物質であることから、揮発性物質も多く存在することが予想されるが、実際にはどのような物質が放出されているのか不明である。そこで微生物培養フラスコ内の上部気相部分に放出されたガス状物質を多く検出するためにSPME法を用いた。SPME法ではガス状物質を捕集するためのファイバー材質を変えることで、分子量や揮発性、極性等、性質が異なる様々な物質の検出が可能になる(表2)。様々なSPMEファイバーを用いて26種類の細菌由来のガス状物質の定性分



Fig. 2 Arabidopsis growth without bacteria (left), with plant growth promoting bacteria (middle), and with plant growth inhibiting bacteria.

Table 1 Plant growth promoting bacteria isolated in this study.

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Aeromonas veronii</i>	<i>Pseudarthrobacter equi</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>
<i>Bacillus muralis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>Enterobacteriaceae</i> bacterium	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Erwinia persicina</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Escherichia</i> sp.	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Kluyvera intermedia</i>	<i>Salinicola tamaricis</i>
<i>Microbacterium maritopicum</i>	<i>Stakelama</i> sp.
<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Neobacillus drentensis</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Table 2 SPME fibers used to detect microbial substances in gas phase communication

Fiber	Target substance	Molecular weight
Polydimethylsiloxane	Volatile compounds	60–600
Polyacrylate	Nonpolar semivolatile compounds	80–300
Polyethylene glycol	Alcohols	40–275
Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene	Volatiles, Amines, Aromatic nitro compounds	50–300
Carboxen / Polydimethylsiloxane	Gas compounds, low molecular weight compounds	30–225
Divinylbenzene / Carboxen / Polydimethylsiloxane	C3~C20 volatiles	40–275

析を行った結果の一部を表3に示した。計63種類の物質が検出され、その多くは長鎖の炭水化物や揮発性が高い物質が多くみられた。また、1種類の細菌から複数の種類のガス状物質が放出されることや、いくつかの物質については複数の細菌種からの放出が確認された。

微生物由来揮発性物質を用いた植物生育促進機構の解明
 検出された微生物由来揮発性物質すべてが植物の生育促進に寄与しているかどうかは不明である。そこで2-undecanoneを含めたいくつかの揮発性物質存在下でのシロイヌナズナの生育調査を行った(図3)。その結果、

Table 3 Identified mVOCs

Substance name	Molecular weight	Chemical formula	Structural formula
3-Methyl-1-butanol	88	C ₅ H ₁₂ O	
Dimethyl disulfide	94	C ₂ H ₆ S ₂	
2-Nonanone	142	C ₉ H ₁₈ O	
2-Undecanone	170	C ₁₁ H ₂₂ O	
2-Tridecanone	198	C ₁₃ H ₂₆ O	

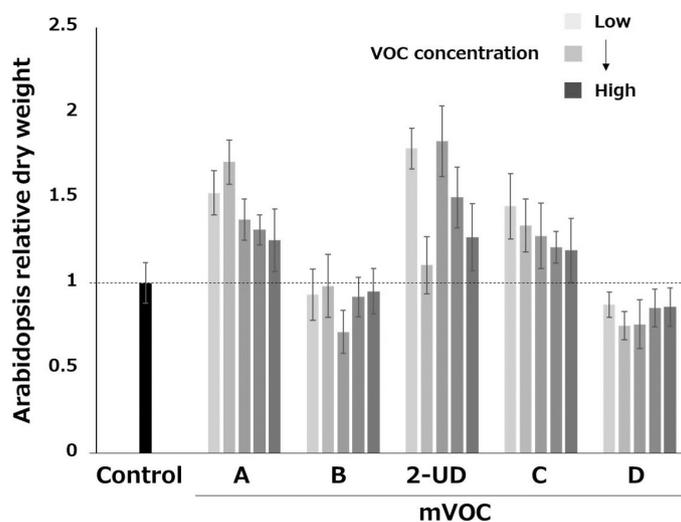


Fig. 3 Arabidopsis growth with mVOCs (compounds A, B, C, D, and 2-undecanone (2-UD)).



Fig. 4 Venn diagram of differentially expressed genes in Arabidopsis in response to 2-undecanone treatment.

化合物 A や 2-undecanone, 化合物 C のようにシロイヌナズナの生育促進作用を持つものや, 化合物 B や化合物 D のように生育には影響を与えない, あるいは生育を抑制するものが存在していた. 1 種類の細菌から複数のガス状物質が放出された結果を併せて考えると, シロイヌナズナの生育促進に寄与する細菌種からは, ①生育促進ガス状物質が 1 種類あるいは複数種類, 高濃度で放出されていた, ②生育抑制ガス状物質も放出されていたが, 生育促進ガス状物質の種類が多い, あるいは濃度が高かった, などの事例が考えられ, 複数種の細菌由来のガス状物質がシロイヌナズナの生育に複合的に影響を与えていた可能性が示唆された.

細菌由来のガス状物質によるシロイヌナズナの生育促進機構についての理解を深めるために, 2-undecanone ($C_{11}H_{22}O$, 分子量 170) を用いた機能解析を進めた. 2-undecanone 作用下でのシロイヌナズナの葉における遺伝子発現応答を調べるために, 2-undecanone を揮発処理した場合とスプレー噴霧した場合の RNA sequence 解析を行った. その結果, 揮発処理の場合には 547 遺伝子, スプレー処理の場合には 68 遺伝子の発現変動が確認された (図 4). 両方の処理により共通して発現変動した遺伝子群は, 発現量が増加したものは 23 遺伝子, 発現量が減少したものは 11 遺伝子であった. 共通して発現量が増加した遺伝子群の中には, 発現量が増加した際にはシロイヌナズナの生育促進に寄与するものが含まれていた (表 4). 特に, 最も発現量が増加 (\log_2 比で 5.0) した *OSR1* 遺伝子 (At2g41230) はシロイヌナズナの器官サイズ制御に関わる転写因子である. *OSR1* による器官サイズの制御は細胞肥大によってもたらされることが示されているため, 2-undecanone によるシロイヌナズナの生育促進機構の一部は *OSR1* による器官サイズの増大が関わっている可能性が示唆された.

2-undecanone を用いた植物生育促進作用について, イネを用いた温室での土耕栽培でも検証を行った. 2-undecanone を用いて 1 か月間, イネを栽培した結果,

イネ個体の重量の増加が確認された (図 5). この時のイネ体内の必須元素のうち, 主要なものについて分析を行ったところ, P や K, Ca や Mg 等の元素の蓄積量の増加が確認された (図 5). このことから, 2-undecanone がもたらす植物の生育促進効果は特定の必須元素の蓄積量の増加ではないことが示唆された. 同様の傾向は 2-undecanone 処理を行ったシロイヌナズナでも観察されたため, 2-undecanone による植物の生育促進には器官サイズの増加が起こった後に, 培地から生育に必要な必須元素の吸収が引き起こされた可能性が示唆された.

要 約

本研究では, 植物バイオマス生産を制御する微生物由来のガス状コミュニケーション物質の同定を行い, 植物-微生物間接的相互作用の解明を行った. 自然環境から単離した細菌の一部は, 接触せずとも植物の生育を促進あるいは抑制する作用を持つ種が存在することが明らかとなった. これらの細菌からは様々なガス状物質が放出されており, その一部には植物の生育を促進する作用が見られた. 植物生育促進作用を持つガス状物質の 1 つである 2-undecanone をシロイヌナズナに作用させた場合, 様々な遺伝子群の発現変動が見られた. 特に, 器官サイズの増大を制御する *OSR1* の発現誘導が見られたことから, 2-undecanone 処理による植物の生育促進機構は *OSR1* による器官サイズの制御によってもたらされている可能性が示唆された.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 上田晃弘, 2021. 植物生育促進細菌をもっと使えるように, 日本農芸化学会日本農芸化学会中四国支部 支部創立 20 周年記念 第 31 回若手研究者シンポジウム. (招待講演)

Table 4 Differentially expressed genes in Arabidopsis in response to 2-undecanone treatment

Gene ID	Protein Name/Function	Volatilized Log ₂ ratio	Sprayed Log ₂ ratio
At2g41230	Organ size related 1 (OSR1)	5.0	2.5
At1g30135	Jasmonate-zim-domain protein 8	4.2	2.0
At1g77640	DREB transcription factor	4.2	1.8
At4g08950	Exordium	4.0	2.3
At3g10040	Hypoxia response attenuator 1	3.8	2.8
At1g75450	Cytokinin oxidase 5	3.0	1.4
At5g56870	Beta-galactosidase 4	2.8	2.9
At1g36060	DREB transcription factor	2.8	2.0
At3g16670	Pollen Ole e 1 allergen and extensin	2.7	1.0
At1g72060	Serine-type endopeptidase inhibitor	2.6	2.1
At5g12050	Auxin-regulated growth promotion/Rho GTPase-activating protein	2.4	1.4
At3g47340	Glutamine-dependent asparagine synthase 1	2.3	1.9
At1g05020	Anth protein 180	2.3	1.7
At1g11260	Sugar transporter 1	2.2	2.5
At5g18030	SAUR-like auxin-responsive protein family	2.2	1.5
At5g07000	Sulfotransferase 2B	2.0	1.4
At4g15233	ATP-binding cassette G42	1.9	1.3
At4g27450	Hypoxia response protein	1.9	2.4
At3g45590	Senescence associated gene 1	1.7	2.4
At4g36850	PQ-loop repeat family protein	1.6	4.1
At3g13450	Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta	1.5	1.4
At1g30820	Cytidine triphosphate synthase	1.4	1.5
At5g13740	Zinc induced facilitator 1	1.3	1.2
At5g46830	NaCl-inducible gene 1	-3.6	-5.1
At5g48850	Sulphur deficiency induced 1	-2.8	-2.6
At3g49570	Response to low sulfur 3	-2.4	-2.0
At3g28270	Unknown	-2.4	-2.1
At4g01080	Trichome birefringence like 26	-2.3	-1.9
At5g24660	Response to low sulfur 2	-2.3	-2.3
At3g49580	Response to low sulfur 1	-2.3	-2.1
At2g15020	Unknown	-2.2	-2.8
At1g75280	Unknown	-1.9	-2.0
At3g22550	Unknown	-1.7	-1.7
At5g26220	Gamma-glutamyl cyclotransferase 2;1	-1.6	-2.2

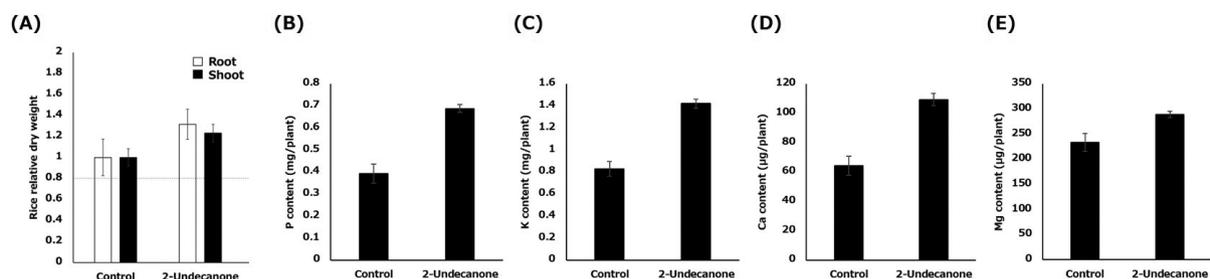


Fig. 5 Rice growth promotion with 2-undecanone treatment (A). Accumulation of essential elements such as P (B), K (C), Ca (D), and Mg (E) were analyzed in rice shoots.

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広島大学大学院統合生命科学研究所植物栄養生理学研究室の学生諸氏に感謝の意を表します。

文 献

- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S., Patra, J.K. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* **206**: 131-140.
- Ledger, T., Rojas, S., Timmermann, T., Pinedo, I., Poupin, M.J., Garrido, T., Richter, P., Tamayo, J., Donoso, R. 2016. Volatile-mediated effects predominate in *Paraburkholderia phytofirmans* growth promotion and salt stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Microbiol.* **7**: 1838.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., Tribedi, P. 2017. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**: 3315-3335.
- Mani, D., Kumar, C., Patel, N.K. 2016. Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and lead contaminated soils using *Gladiolus grandiflorus* L. cut flower. *Ecotoxicol. Env. Saf.*, **124**: 435-446.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Nautiyal, C.S., Srivastava, S., Chauhan, P.S., Seem, K., Mishra, A., Sopory, S.K. 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **66**: 1-9.
- Park, Y.S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J.M., Park, K. 2015. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **461**: 361-365.
- Plyuta, V.A., Chernikova, A.S., Sidorova, D.E., Kupriyanova, E.V., Koksharova, O.A., Chernin, L.S., Khmel, I.A. 2021. Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 82.
- 清水徹朗. 2010. 化学肥料原料の資源問題と食料安全保障, **20**: p. 4-5, 農中総研 調査と情報.
- 染谷信孝, 諸星知広, 竹内香純. 2017. *Pseudomonas protegens* - 植物の守護者と命名された細菌, *土と微生物* **71**: 37-43.
- 俵谷圭太郎, 和崎淳. 2012. リン酸資源の枯渇に対応したリン栄養研究 1. 講座のねらい, *土肥誌* **83**: 173-176.
- 上田晃弘, 大戸貴裕, 近藤もも, 大村尚. 2019. 植物生育促進細菌の実用化に向けた試み, *土と微生物* **73**: 5-9.

ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による 高効率クエン酸生産糸状菌の育種

桐村 光太郎

早稲田大学理工学術院先進理工学部応用化学科

〒169-8555 新宿区大久保3-4-1

Breeding of citric acid hyper-producers in *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*)
by modifying the organic acids transport systems using the genome editing system

Kohtaro Kirimura

Faculty of Science and Engineering, Waseda University

3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

With the objective to generate citric acid hyper-producing strains by modifying the organic acids transport systems, functional analyses on the genes encoding mitochondrial organic acids-transporter proteins such as *cocA* and *ctpA* and the citrate exporter gene (*cexA*) were performed in *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) by the genome editing system. Genome sequencing analyses and metabolites analysis using high-precision LC-MS/MS revealed no productions of mycotoxins such as ochratoxins and fumonisins by *A. tubingensis* WU-2223L, a parental citric acid-producing strain. Under the conditions of citric acid production, 7 genes encoding mitochondrial organic acids-transporter proteins were transcribed. Thus, knock-out strains were generated by disruption of each gene by the genome editing system. Among 7 knock-out strains, only the *cocA*-knockout strain showed drastic decrease of citric acid production, indicating that COCA protein encoded by *cocA* must be the main transporting system concerning citric acid hyper-production. On the other hands, the *cexA*-knock out strain produced no citric acid, indicating that CEXA protein encoded by *cexA* is the only citrate exporter from cytosol to extracellular fraction (culture broth). The *cexA*-high expression strain using *tef* promoter produced high amount of citric acid in comparison to the parental strain WU-2223L. Thus, our results in this research clearly indicate that breeding of hyper citric acid-producing strains is possible by modifying the organic acids-transport systems using the genome editing system.

Key words: *Aspergillus*, citrate exporter, citric acid fermentation, genome editing system, mitochondrial organic acids-transporter

緒言

クエン酸は、食品や飲料の酸味料、医薬品や化成品の安定（化）剤やpH調整剤、化学工業の分野では機能的樹脂等の原料などとして広く利用されている（Kirimura & Yoshioka 2019）。クエン酸はそのすべてが糸状菌 *Aspergillus niger*（クロコウジカビ、現在の *Aspergillus* Section *Nigri* に属する菌株）による工業的発酵生産によって供給され（Bennett 2010; Kirimura & Yoshioka

2019）、2016年にはクエン酸の世界的年間生産量は210万トンに達している（Kirimura & Yoshioka 2019）。この量は、エタノール、グルタミン酸ナトリウムに次ぐもので、クエン酸は工業的な発酵生産物の代表例である。現在の主要なクエン酸生産会社は、Archer Daniels Midland Company, Cargill Incorporated ATP Group, Tate & Lyle PLCなどで、これらでは2015年頃から工場の増設や新設も進んでいる。また、自社向けのようだが大手製薬企業がクエン酸生産工場を新設するなど供給体制にも変化が見られる。一方、日本の年間クエン酸需要は約6万トンと見積もられ、純国産は200-300kgで、ほぼ全量が中国からの輸入品である。

E-mail: kkohtaro@waseda.jp

共同研究者：矢口 貴志（千葉大学真菌医学研究センター）。

筆者らは、糸状菌(カビ) *A. niger* (*Aspergillus* Section *Nigri*) によるクエン酸をはじめとする有機酸の生産とその機構解明に関して研究を展開してきた (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2019; Kobayashi *et al.*, 2014, 2016; Yoshioka *et al.* 2020a). とくに、研究室保有のクエン酸生産糸状菌 *A. tubingensis* WU-2223L (NBRC111403) については、ゲノム配列を決定し (Yoshioka, *et al.* 2020b), 当該菌株の育種に適したゲノム編集システムを構築している (Yoshioka and Kirimura 2021). rDNA の D1/D2 領域や ITS 領域, カルモジュリンをコードする領域等の DNA 分類指標 (Nakamura *et al.* 2017; 矢口 2009) に準拠して作成した WU-2223L 株の分類学的な系統樹を Fig.1 に示す. *Aspergillus* Section *Nigri* の中で *A. tubingensis* は焼酎製造に使用される (商品では黒麹菌と表示されることが多い) *A. luchuensis* と近縁にある (Fig.1 (A)). クエン酸生産糸状菌については, *A. niger* ATCC 1015 のようにゲノム比較研究が行われたものもあるが, クエン酸生産能力をゲノム情報から類推することは困難であった (Andersen *et al.* 2011). 一方, 従来の研究例ではクエン酸生産糸状菌は *A. niger* として表記されることが多かった (Bennett 2010; Kirimura & Yoshioka 2019). しかし, 本研究の供試菌である WU-2223L 株は種としては *A. niger* と近縁だが別種であり, クエン酸生産菌が種として *A. niger* だけに偏在しているわけではないことがわかる. また, WU-2223L 株は *A. tubingensis* の標準菌株である CBS134.48 株とはやや異なる位置にある (Fig.1 (B)). Table 1 に示すように, WU-2223L 株のゲノムサイズは 35.0 Mb で, 11,493 個の推定遺伝子 (gene model) が見出されている. ゲノム配列が既知の近縁の標準菌株との比較も Table 1 に示すが, *A. luchuensis* NBRC4314 (Yamada *et al.* 2016) や *A. tubingensis* CBS134.48 とゲノムの大きさはほぼ同じである.

筆者らは, WU-2223L 株を供試菌として, 世界に先駆けてクエン酸やシュウ酸の生産において有機酸の輸送系が極めて重要な役割を担っていることを明らかにした (Kirimura *et al.* 2016, 2019). さらに, ミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸の輸送の主経路としてミトコンドリア局在型の有機酸輸送体 (COCA と略, Fig.2) を特定した (Kirimura *et al.* 2019). Fig.2 に, WU-2223L 株についてのクエン酸生産の想定図を示すが, 本研究ではミトコンドリア局在型の有機酸輸送体およびサイトゾルから細胞外へのクエン酸排出系 (CEXA, これをコードする遺伝子が *cexA*) についても研究を進めた.

本研究では, WU-2223L 株がマイコトキシン非生産性であることを明らかにし, ゲノム編集システムの改良を行った. さらに, クエン酸の輸送系をコードする遺伝子群を解析し, ゲノム編集システムを利用した輸送系の改

変に基づく新規なクエン酸生産糸状菌の育種を目的として実施した.

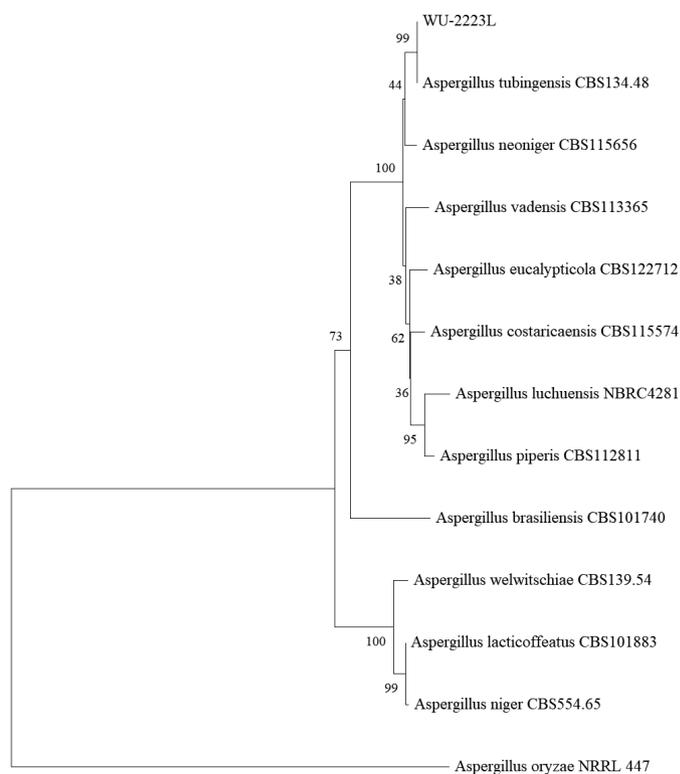
実験方法

使用菌株と培地, 代謝産物の分析

クエン酸高生産糸状菌として, *Aspergillus tubingensis* WU-2223L を主として使用した. WU-2223L 株は, 宇佐美が日本の土壌より単離したもので, 当時の分類基準に基づいて便宜的に *A. niger* と同定されていた (Usami 1978). 筆者らは, 最新の分類指標に準拠して WU-2223L 株を *A. tubingensis* と再同定し, ゲノム配列を決定し登録した (Yoshioka *et al.* 2020b). また, 遺伝子組換えやゲノム編集には, WU-2223L 株から作製した亜硝酸非還元性の *niaD* 欠損株としての LND-1 株 (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2019), 非同相組込みが起こりにくい *kueA* 破壊株である DKL-2P 株 (Honda *et al.* 2011) などを使用した. 最少寒天培地としては 30 g/L グルコースを炭素源とする Czapek-Dox 培地に 20 g/L 細菌培養用寒天を添加して固化させたものを使用した. 比較のための形態観察には, CYA 培地や MEA 培地を使用し, 25℃ または 37℃ で静置培養を行った (矢口 2009). クエン酸生産には, とくに記載しないかぎりクエン酸生産の促進剤として 2% (v/v) メタノールを添加した SLZ 培地を使用した (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2021). SLZ 培地の組成は, 120 g/L グルコース, 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.014 g/L MnSO₄ · 5H₂O, 0.01 g/L FeCl₃ · 6H₂O, 0.075 mg/L ZnCl₂ をイオン交換水に溶解し, pH 3.0 に HCl で調整したもの. 培養には, 500 mL 容の肩付き (坂口) フラスコに 60 mL SLZ 培地を分注し, 分生子を接種後, 30℃ にて所定時間往復振とう培養した. 標準的には 12 日間培養し, クエン酸生産量やグルコース消費量を HPLC により測定した (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2021). マイコトキシンの高精度分析は, 既報に準じて LC-MS/MS を使用して行った (Nakagawa *et al.* 2020).

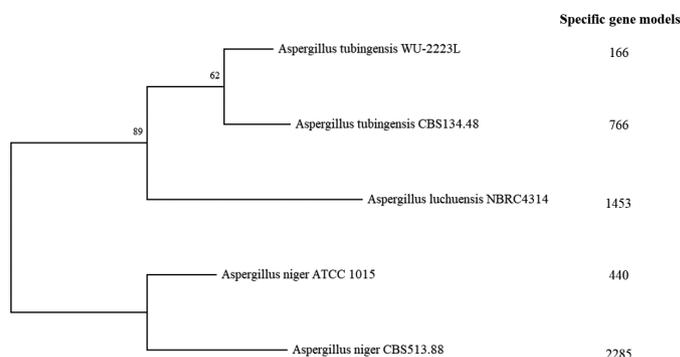
DNA や RNA の調製, プラスミドの作製や保存, 遺伝子操作

DNA, RNA, cDNA の調製や取り扱い, PCR による DNA の増幅は既報に準じて行った (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2021). また, 遺伝子組換えの宿主としては, *Escherichia coli* K-12 株由来の JM109, DH5α 等の各種菌株を使用した (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Kirimura & Yoshioka 2021).



0.01

(A)



0.01

(B)

Fig. 1. Classification of *Aspergillus tubingensis* WU-2223L based on gene and genome. (A) Phylogenetic tree of fungal strains belonging to *Aspergillus* section *Nigri*, to re-identify strain WU-2223L. The tree was generated based on the sequences of rDNA-ITS, β -tubulin and calmodulin genes using MEGA X (Kumar *et al.* 2018), in accordance with the reported method (Hong *et al.* 2013). The sequences of these genes excluding those of strain WU-2223L originated from the type strains belonging to *Aspergillus* section *Nigri* (Hong *et al.* 2013; Varga *et al.* 2011) and *Aspergillus oryzae* (Frisvad *et al.* 2019). (B) Genome comparison among typical *Aspergillus* section *Nigri* strains. The phylogenetic tree was generated based on the similarity of conserved protein-encoding genes by Orthofinder (Emms & Kelly 2015). The number of strain-specific genes were described as the sum of “unassigned gene” and “species-specific orthologues”, which were annotated by Orthofinder.

Table 1 Genome sequence of *A. tubingensis* WU-2223L

	<i>A. tubingensis</i> WU-2223L	<i>A. tubingensis</i> CBS134.48 ¹⁾	<i>A. luchuensis</i> NBRC4314 ²⁾
Genome Size	35.0Mb	35.2Mb	34.7Mb
G+C content	49.3 %	49.2 %	50.4 %
Gene models	11,493	12,322	11,691
Protein length	501	475	484
Exons per gene	3.2	3.2	2.8
Exon length	465bp	495bp	660bp

1) The genome sequence analyzed by de Vries *et al.* (2017) was used.

2) The genome sequence and statistics were cited from Yamada *et al.* (2016).

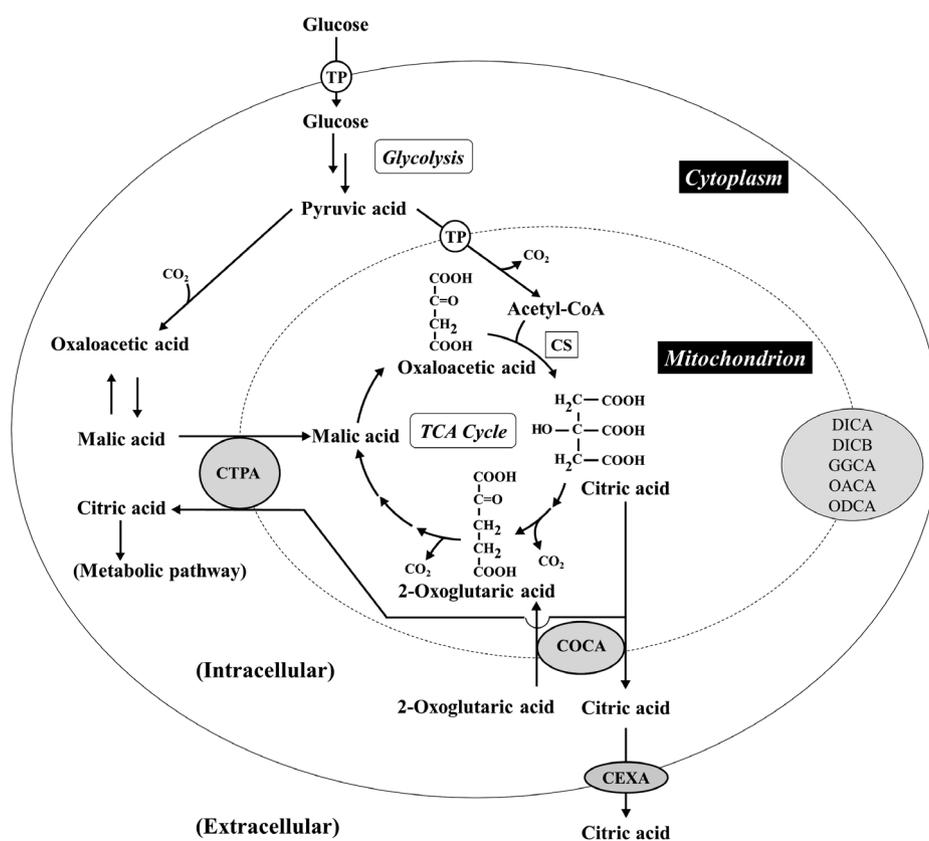


Fig. 2. Metabolic pathway for production of citric acid by *Aspergillus tubingensis* WU-2223L.
Abbreviations: CS, citrate synthase; TP, glucose transporter.

糸状菌の形質転換とゲノム編集

糸状菌の形質転換や CRISPR/Cas9 system と guideRNA (gRNA) expression cassettes を使用するゲノム編集は、既報に準じて行った (Kirimura *et al.* 2016, 2019; Yoshioka & Kirimura, 2021).

転写解析と qPCR による遺伝子コピー数の決定

cexA の転写解析は、Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Takara) および TBGreen® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara) を使用した RT-qPCR 法によって行った。 *cexA* cDNA は ISOGEN II (ニッポンジ

ン)と GeneAce cDNA Synthesis Kit (ニッポンジーン) を使用して調製し (Yoshioka & Kirimura, 2021), *cexA* のコピー数は, *cexA* 増幅のために設計した *cexA_F3* および *cexA_R3* primers を使用して行った (未発表).

実験結果

マイコトキシン非生産性の検証

食品や医薬品製造の分野では, *Aspergillus* Section *Nigri* に属する菌株は安全性が高いとみなされており, アメリカ食品医薬品局 (FDA) より食品添加物に与えられる安全基準合格証としての GRAS (Generally Recognized As Safe) の認定も受けている. しかし, 一部の菌株のゲノムには, マイコトキシン生合成の遺伝子クラスターが存在するとの指摘があり (Frisvad *et al.* 2011; Susca *et al.* 2014, 2016), 工業微生物については安全性の観点からマイコトキシン生産性の有無を判別することが重要な課題となっている. そこで, WU-2223L 株のマイコトキシン生産性について検証した. *Aspergillus* 属糸状菌で懸念されるマイコトキシンは, オクラトキシン, フモニシン, アフラトキシンおよびパツリンであるため, WU-2223L 株のゲノム情報クエン酸生産糸状菌 (Yoshioka, *et al.* 2020) と代謝産物解析 (Nakagawa *et*

al. 2020) の両面からそれらの非生産性を検証した. まず, WU-2223L 株のゲノム情報より各マイコトキシンの生合成遺伝子クラスターを探索した. アフラトキシンとパツリンでは, 該当する遺伝子が存在しなかった. つぎに, オクラトキシンとフモニシンでは, Fig. 3 および Fig. 4 に示すように, それぞれの生産菌の有する完全長のクラスターと比べて数十 kb に渡る大規模な欠損が存在することを明らかにした. また, 該当箇所を検出するためのプライマーを作製し, PCR によって得られた増幅産物の長さを調べた. Fig. 3 (B) と Fig. 4 (B) に示すように, これらはゲノム情報の通りの大きさを示した. さらに, 増幅産物の塩基配列を決定し, ゲノム情報との一致を確認した. なお, WU-2223L 株のゲノム配列を精査し, 微生物が産生する毒素 (いわゆる生物毒) をコードするような遺伝子が存在しないことも確認した. 一方, 代謝産物の解析として, クエン酸生産培地にて培養した培養液上清を濃縮して LC-MS/MS による高精度分析に供し, いずれのマイコトキシンも不検出 (検出限界未満) であることを確認した ((独) 農業・食品産業技術総合研究機構, 食品総合研究所, 中川博之主任研究員との共同研究として実施). 以上より, *A. tubingensis* WU-2223L がマイコトキシン非生産性の安全なクエン酸高生産菌であることを明らかにした (Yoshioka *et al.* 2022).

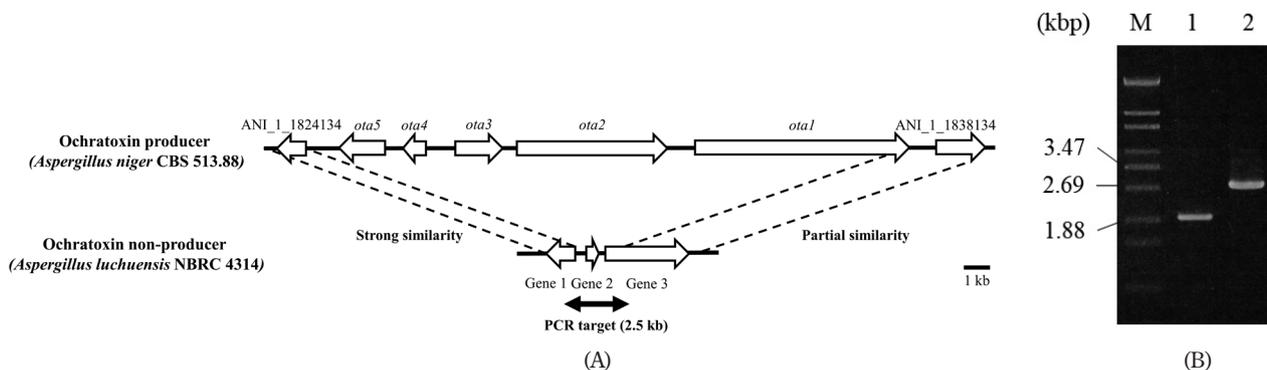


Fig. 3. PCR amplification of the ochratoxin biosynthetic gene cluster. (A) Schematic image of the ochratoxin biosynthetic gene cluster in an ochratoxin-producing strain (*A. niger* CBS 513.88) and nonproducing strain (*A. luchuensis* NBRC 4314). PCR target described the region amplified by PCR, i.e., the primers annealing sites. (B) Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M represents the molecular weight marker (λ /Styl) digest. Lanes 1 and 2 represent the PCR products amplified from the genomic DNA of strain WU-2223L and *A. luchuensis* NBRC 4314, respectively. Note that the region between *ota1* and ANL_1_1838134 was partially conserved, but its intermediate sequences were not found in the genome sequences of strain WU-2223L or *A. luchuensis*.

PCR conditions are the followings:

The primer pair Pr1 and Pr2 was used for the amplification of the putative ochratoxin biosynthetic gene cluster in the genome of *A. tubingensis* WU-2223L by KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan). The PCR amplification program was as follows: denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 98 °C for 10s, annealing at 61 °C for 30s, and extension at 68 °C for 2 min.

Pr1: TRY GRK RGC RGA AGG GGR TGC KTA W

Pr2: AYT GGA AGG TMR YRA GGT MYG GCR G

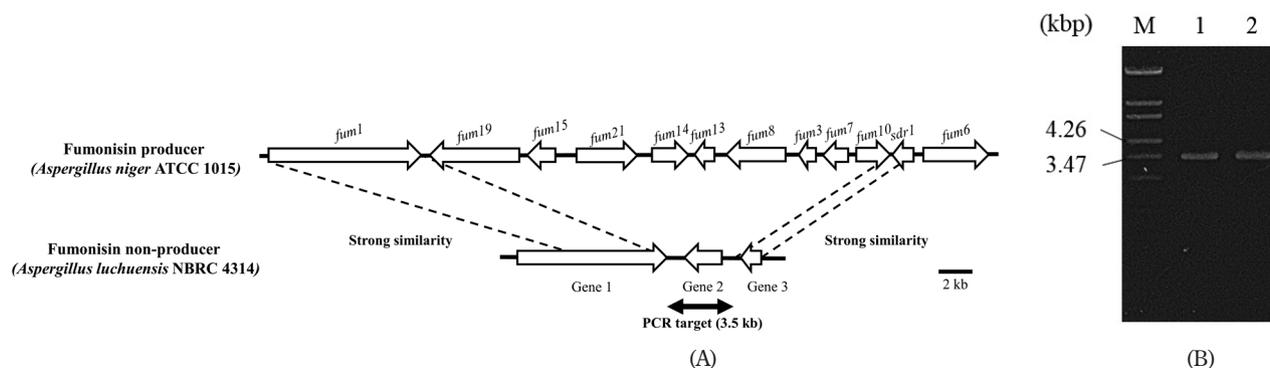


Fig. 4. PCR amplification of the fumonisin biosynthetic gene cluster. (A) Schematic image of the fumonisin biosynthetic gene cluster in an ochratoxin-producing strain (*A. niger* ATCC1015) and nonproducing strain (*A. luchuensis* NBRC 4314). PCR target described the region amplified by PCR, i.e., the primers annealing sites. (B) Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M represents the molecular weight marker (λ /*Styl*) digest. Lanes 1 and 2 represent the PCR products amplified from the genomic DNA of strain WU-2223L and *A. luchuensis* NBRC 4314, respectively. The primer pair Pr3 and Pr4 was used for the amplification of the putative fumonisin biosynthetic gene cluster in the genome of *A. tubingensis* WU-2223L by KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan). The PCR amplification program was as follows: denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 63 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 3 min. The genomic DNA of *A. luchuensis* NBRC 4314, an ochratoxin- and fumonisin-nonproducing safe strain used for brewing was also used under the same conditions as the positive control.
Pr3: ATG CGC CTT CAA TTT CAT CC
Pr4: CAT AAT ACG CGC CAG TTT ATC G

Table 2 Genes encoding mitochondrial organic acids transporter in the genome of strain WU-2223L

Gene	Locus tag in <i>A. tubingensis</i> WU-2223L	Locus tag in <i>A. niger</i> CBS513.88	Putative transport substrates
<i>cocA</i>	AtWU_10869	ANI_1_874084	Citrate/2-oxoglutarate
<i>ctpA</i>	AtWU_07281	ANI_1_1474094	Citrate/malate
<i>dicA</i>	AtWU_06197	ANI_1_234024	Dicarboxylate
<i>dicB</i>	AtWU_06565	ANI_1_356094	2-Oxoglutarate/malate
<i>ggcA</i>	AtWU_07325	ANI_1_1282064	2-Oxoglutarate/malate
<i>oacA</i>	AtWU_01160	ANI_1_942124	Oxaloacetate
<i>odcA</i>	AtWU_08996	ANI_1_206074	2-Oxoglutarate

ミトコンドリア局在型の有機酸輸送体をコードする遺伝子群の解析

WU-2223L株のゲノム情報より、ミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸の輸送に関わるミトコンドリア局在型の有機酸輸送体（対向輸送を行うと想定されるもの）をコードする遺伝子は12個存在することが判明した。さらに、クエン酸発酵条件下ではその中で7個が転写されていた。Table 2に推定される基質とともに各遺伝子と locus tag, *cocA* や *ctpA* のような（遺伝子の）略号を示す。locus tag については、クエン酸生産系状菌

でゲノム配列が登録されている *A. niger* CBS513.88 のものを対照として示す。これらの遺伝子は locus tag の番号から明らかのように、ゲノム上にクラスターとして局在するわけではなく、ゲノム上の各所に分散していることがわかる。本研究では、Table 2に示す各遺伝子についてノックアウト株を作製し、作製した種々の株については表現型（寒天培地上での形態や分生子の形状）を調べた。遺伝子 *cocA* はクエン酸と2-オキシソグルタル酸等の対向輸送体（COCA）を、遺伝子 *ctpA* はクエン酸とリンゴ酸の対向輸送体（CTPA）をコードすると想定さ

れ、クエン酸生産と密接に関連すると想定された。これらの遺伝子ノックアウト株と原株である WU-2223L 株の固体寒天培地上での生育や電子顕微鏡による分生子形成の比較を行った。Fig.5 (A) に示すように、寒天培地上では WU-2223L 株と比較して *ctpA* ノックアウト株 ($\Delta ctpA$) については大きな相違は観察されなかったが、*cocA* ノックアウト株 ($\Delta cocA$) ではどの培地を使用した場合にも生育遅延が観察された。一方、Fig.5 (B) に示すように、分生子形成については3株について変化は観

察されなかった。しかし、個々の分生子表層の状態を電子顕微鏡で観察すると一部の菌株には相違が認められたことから、現在さらに詳細に検討している (未発表)。他の5種の遺伝子ノックアウト株については、表現型の相違は認められなかった (未発表)。

遺伝子ノックアウト株のクエン酸生産性

7種の各遺伝子ノックアウト株について、SLZ液体培地を使用したクエン酸発酵試験を行った。6種の遺伝子

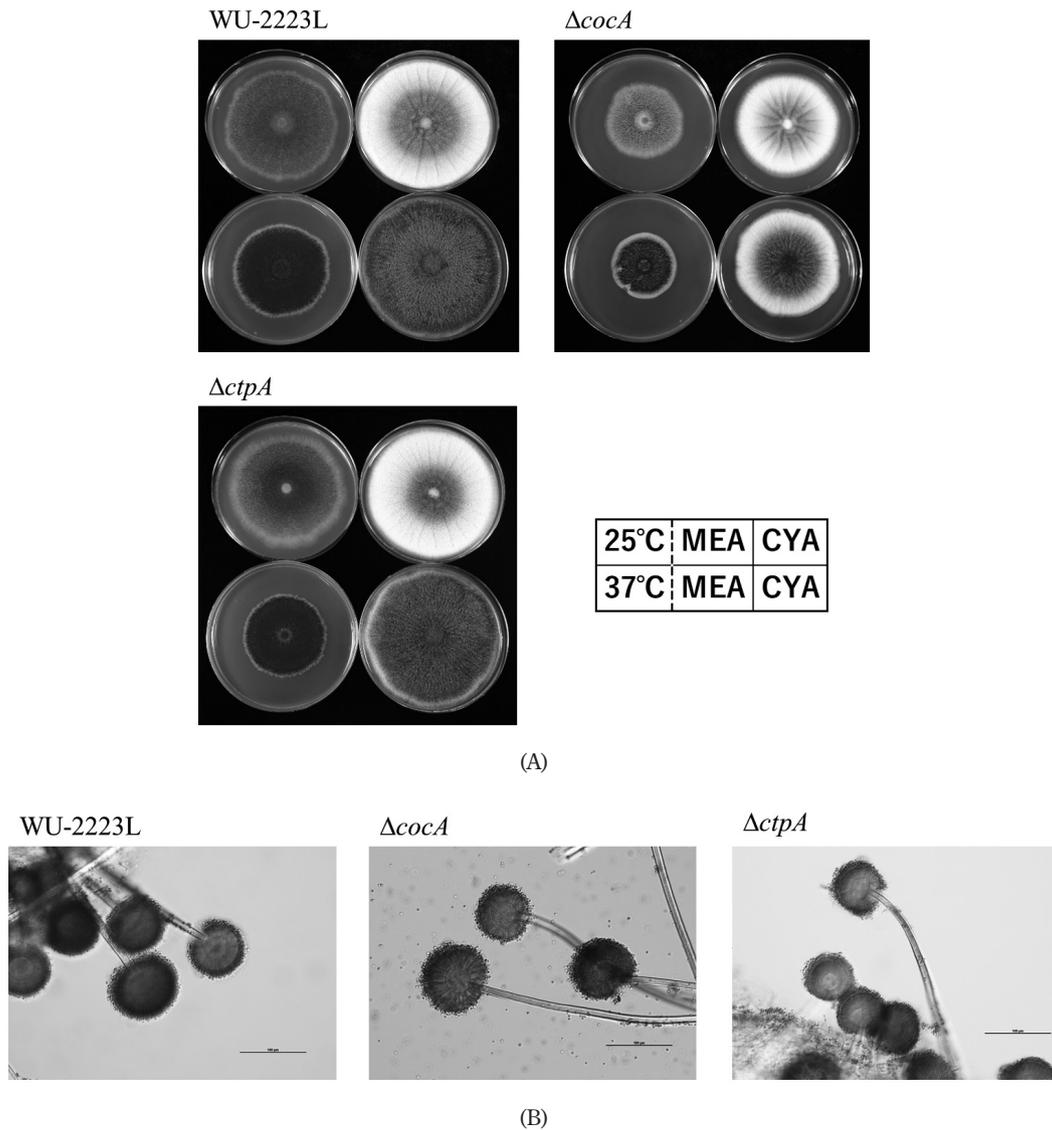


Fig. 5. The phenotype of *A. tubingensis* strains, WU-2223L, *cocA*-knockout strain ($\Delta cocA$) and *ctpA*-knockout strain ($\Delta ctpA$). (A) The growth on agar medium. The conidia of each strain were inoculated onto MEA or CYA agar medium and incubated at 25°C or 37°C. The legend of each sample is shown in white box at bottom right. (B) The microscopic image of conidiophore in each strain. The scale bar represents 100 μm.

ノックアウト株についてはクエン酸生産量に大きな変化は認められなかったが、*cocA* ノックアウト株についてはクエン酸生産量が激減した。筆者らは、既報で薬剤耐性遺伝子の挿入による *cocA* 遺伝子破壊でクエン酸生産量が激減することを明らかにしているが、本研究ではゲノム編集により得られたマーカー遺伝子非挿入かつ対象遺伝子 (open reading frame) を完全に欠失した株を用いてこの点を再確認したことになる。また、クエン酸とリンゴ酸の対向輸送を行うとされる *ctpA* ノックアウト株ではクエン酸生産量に変化が見られなかった (未発表)。すなわち、WU-2223L株では、クエン酸生産に関与する輸送系遺伝子は *ctpA* ではなく *cocA* であることを遺伝子破壊による方法 (Kirimura *et al.* 2016, 2019) のみならずゲノム編集システムによる遺伝子ノックアウトで再確認したことになる。

ゲノム編集システムの改良

筆者らは、安定性や改変の容易さに優れた DNA を gRNA 源として利用することに着目し、WU-2223L 株の育種に適したゲノム編集システムを作製している (Yoshioka & Kirimura, 2021)。選択マーカーとしては、ATP スルフリラーゼをコードする sC 遺伝子や硝酸還元酵素をコードする *niaD* 遺伝子を使用している。本研究では、複数の gRNA 配列を 1 つの DNA 断片として糸状菌細胞に導入することで、複数の遺伝子が高効率で同時に置換されることを想定し、sC および硝酸還元酵素をコードする *niaD* 遺伝子を標的に遺伝子ノックインを利用して遺伝子ノックアウトを行った。sC に対してはピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*) の挿入、*niaD* に対してはプロモーターと ORF を含む約 1.6kb の欠失を起こすノックインドナー DNA を使用した。予想通り、WU-2223L 株由来の相同組換え効率向上株を宿主として、セレン酸耐性株として単離された。また、sC のノックアウト株は全てその遺伝子座に *ptrA* が挿入されており、それらの 95% 以上が *niaD* も同時に (意図したとおりにノックインによって) ノックアウトされていた。また、遺伝子置換株の選択マーカーとして利用する sC 遺伝子に関して分子内相同組換えを利用して sC 遺伝子の相補 (復帰) によるマーカーレスキューが可能なノックインドナーを作製した (Yoshioka & Kirimura, 2021)。さらに、本研究では後述の研究に適するように改良を加え、遺伝子置換に際して繰り返し利用可能なマーカーレスキュー法を開発した。すなわち、上記の方法で取得した目的の遺伝子変異を有する sC ノックアウト株において分子内相同組換えによりワンステップで sC⁺ (メチオニン非要求性) となるノックインドナーを構築した。また、より簡便な遺伝子ノックアウト法として Fig. 6 に示すように、特定

の遺伝子のノックアウトと外来のマーカー遺伝子の消去を同時に実行可能なゲノム編集システムの開発に成功した (未発表)。本研究で用いた方法では、sC 遺伝子に予め *ptrA* を挿入したノックアウト株を作製しておき、*ptrA* と標的遺伝子に対してゲノム編集を行い sC 遺伝子座へのノックインによる相補で形質転換体を選抜した。本法は各ミトコンドリア輸送体のノックアウト、さらに細胞膜に存在するミトコンドリア排出系 *cexA* の遺伝子ノックアウトおよび *cexA* 高発現株の作製に当該方法を適用した。

メタノール効果非依存性のクエン酸高生産株の作製

クエン酸をサイトゾルから細胞外に排出するタンパク質をコードする遺伝子に関しては、ゲノム比較研究を基に独立した 2 つの研究グループから発表された (Odoni *et al.* 2019; Steiger *et al.* 2019)。特定の *Aspergillus* 属糸状菌のゲノムに遍在する当該遺伝子は、現在ではクエン酸排出体 (citrate exporter) をコードするものとして *cexA* と呼称されている。しかし、クエン酸を大量に生産する菌株で *cexA* が唯一のサイトゾルから細胞外への排出系遺伝子であるかどうかは不明であった。一方、WU-2223L 株ではゲノム上に *cexA* が 1 個存在し、オルソログは存在しなかった。そこで、本研究で新規に開発したゲノム編集システムを駆使して、WU-2223L 株由来の *cexA* 遺伝子ノックアウト株を作製し、クエン酸生産試験を実施した。当該 *cexA* 遺伝子ノックアウト株では、当然のことながら *cexA* 遺伝子の転写はないことを確認した。さらに、*cexA* 遺伝子ノックアウト株では培地へのクエン酸の排出は認められなかった。すなわち、*cexA* のノックアウトによってクエン酸非生産株が作製されたこと、換言すればサイトゾルから細胞外へのクエン酸輸送系をコードする遺伝子が *cexA* だけであることが明らかになった。一方、本研究では 2% (v/v) メタノール添加条件下でのグルコース 120g/L からのクエン酸生産を標準条件としている。Table 3 に示すように、WU-2223L 株はグルコースを炭素源とした場合には 2% (v/v) メタノール添加条件下でクエン酸を高生産する。なお、従来はこのメタノール効果の標的がどこにあるのかが不明であったが、筆者らは *cexA* がこの標的の 1 つと予想した。すなわち、グルコースを炭素源とした場合には異化抑制によって *cexA* の発現が抑制されること、2% (v/v) メタノール添加によってこれが解除されることを作業仮説とし、この点について検証することとした。グルコース存在下で機能する高発現プロモーターの 1 つに *tef* プロモーターが知られている (Nakari-Setälä & Pnetttilä 1995; Kitamoto 1998)。筆者らは、*tef* プロモーターの下流に *cexA* 遺伝子を配置した遺伝子カセットを作製し

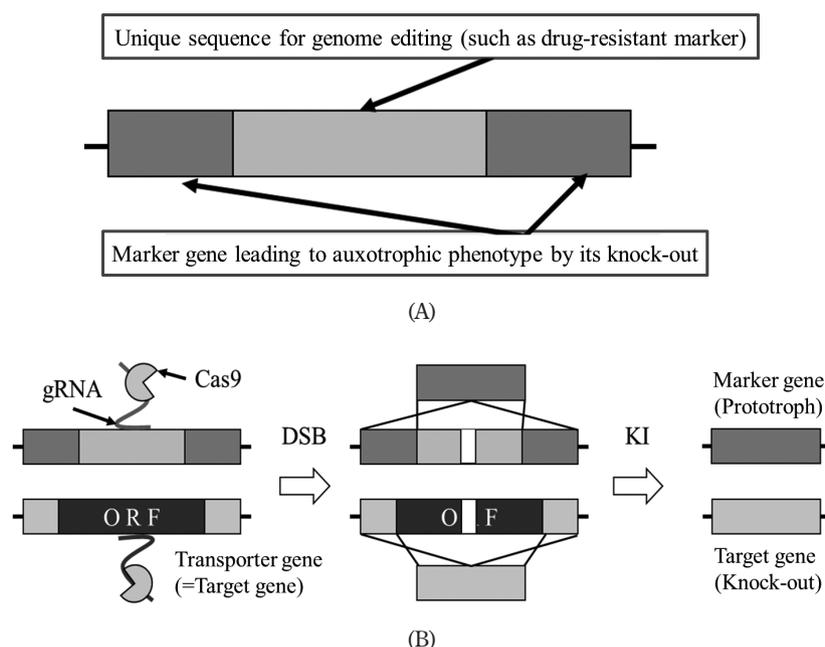


Fig. 6. Schematic representation of genome editing for knock-out of genes encoding mitochondrial transporters. (A) The marker gene, which leads to auxotroph by its knock-out, was disrupted by insertion of unique gene such as drug-resistant marker in advance. In this study, *sC* gene encoding ATP-sulfurylase was used as “marker gene”, and the resultant host strain exhibited sulfate-auxotrophy and pyrithiamine-resistance due to insertion of *ptrA* into *sC*. (B) Scheme of seamless disruption to omitting total ORF region in target gene (mitochondrial transporter gene) by co-genome editing. The gRNA targeting both target and *ptrA* genes were introduced into fungal protoplast with Cas9 nuclease and knock-in donors (vector DNA for *sC*-complementation and replacement of target gene). double strand break (DSB) was induced in these gene locus. Subsequently, the gene knock-out for complementation of marker gene and disruption of target gene occurred by homologous recombination (HR), i.e., in this study, *sC* was complemented by re-introduction of intact *sC* by donor DNA containing flanking region and ORF. Finally, the objective transformant was isolated as prototrophic strain: in this study, sulfate-assimilating isolate derived from *sC*-complementation.

Table 3 Effects of methanol on citric acid production

Strain	Citric acid (g/L)
WU-2223L	
with methanol	67
without methanol	19
LhC-2	
with methanol	78
without methanol	74

Under the standard conditions, 2% (v/v) methanol was added to the synthetic medium (SLZ medium) containing 120 g/L glucose as sole carbon source. Cultivations were performed by shake culture in 500 mL-Sakaguchi flasks containing 60 mL medium at 30 °C for 12 days.

WU-2223L株に導入したところ、当該遺伝子カセットが2個導入された組換え株LhC-2を取得した。Table 3に示すように、LhC-2株は、2% (v/v) メタノール添加条件でも無添加条件でも高いクエン酸生産を示し、しかも2% (v/v) メタノール添加条件下のWU-2223L株より高いクエン酸生産量を示した。すなわち、*cexA*高発現株を作製することによって、メタノール無添加条件下でもクエン酸高生産が可能な株、すなわちメタノール効果非依存性のクエン酸高生産株の作製に成功した。

考 察

本研究では、ゲノム情報に基づくマイコトキシン遺伝子群の解析と代謝産物の高精度分析の両者の検討から、*A. tubingensis* WU-2223Lがマイコトキシン非生産性の安

全なクエン酸高生産菌であることを明らかにした。また、適切なプライマーを使用したPCRによる解析を併せて実施し、ゲノム情報から予想される大きさ（だけ）に増幅産物が現れることを明らかにした。これらの結果は、ゲノム解析に基づく検証を明確に支持する。なお、Fig.3 (B) と Fig.4 (B) に示すように、非特異的な増幅産物が検出されないことから、プライマー設計とPCR条件が極めて適切に設定されたことがわかる。ゲノム配列が明らかにされていない *Aspergillus* 属糸状菌に関しても、当該PCR条件を適用すれば、オクラトキシンとフモニシンの生合成遺伝子クラスターの検出が可能と考えられる。

本研究では、ミトコンドリア局在型の有機酸輸送体に関する7種の遺伝子ノックアウト株を作製し、*cocA* 遺伝子の重要性を再確認することができた。現在、各ノックアウト株における（ノックアウトした遺伝子以外の）他の有機酸輸送体遺伝子の転写状況を検討中である。さらに、*cocA* と *ctpA* の二重ノックアウト株を作成すると、増殖が極めて遅延すること、クエン酸が全く生産されなくなることを見出した（未発表）。すなわち、*cocA* ノックアウト株では *ctpA* 遺伝子が *cocA* の欠損を相補していること、*cocA* と *ctpA* の二重ノックアウト株ではミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸の輸送が極めて困難になり生育への大きな悪影響があることを予想している。本研究で取得した種々のノックアウト株を有効に使用して、ミトコンドリア局在型の有機酸輸送体に関する詳細な機構解明を進める予定である。

クエン酸発酵におけるメタノール効果に関しては、坂口と馬場（1942）、Moyer（1953a, b）が独立して発表している。メタノール効果（培地へのメタノール添加）によって細胞内外に種々の変化が認められるが（Usami 1978; Maddox *et al.* 1986）、その本質は明らかにされていなかった。本研究で使用した WU-2223L 株は 2% (v/v) メタノール添加条件下でグルコースからのクエン酸生産量が高い（メタノール効果を示す）が、*cexA* 高発現株である LhC-2 株はメタノール無添加条件下でもクエン酸生産量が高く、メタノール効果非依存性の生産株の作製に成功した。本研究で、メタノール効果にクエン酸排出系タンパクをコードする *cexA* が関与することを初めて明らかにしたことは意義深いと考えている。とくに、*cexA* 高発現株の作製によってメタノール効果非依存性の生産株の作製、さらにグルコースによる異化抑制を解除したクエン酸生産糸状菌の育種を可能にしたことは他の有機酸発酵研究全般への波及効果は極めて大きい。

cexA の遺伝子解析から（結果省略）、CEXA はプロトン流入共役型の排出タンパク質と想定され、敷衍すれば間接的には ATP 利用型である。ミトコンドリアからサ

イトゾルへのクエン酸の輸送が対向輸送型で、サイトゾルから細胞外へのクエン酸の排出が ATP 利用型、すなわちエネルギー消費型の輸送系であることは、供試菌においてはクエン酸輸送の使い分けがなされていることを意味する。クエン酸発酵という特異な現象は、クエン酸の輸送に関しては、ミトコンドリアからサイトゾル、サイトゾルから細胞外への2つの輸送系の協調によって成立していると考えられる。今後の課題として、CEXA へのエネルギー供給（あるいは ATP 供給）がどのように行われているのかを解明することが重要である。特異的な仕組み（machinery）をコードする *cexA* およびその遺伝子産物である CEXA の両者の機能を解明することによって、クエン酸発酵の機構がより明確になると考えられる。

以上より、本研究の結果は、ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による高効率クエン酸生産糸状菌の育種が可能であることを明らかにしている。

要 約

本研究では、ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による高効率クエン酸生産糸状菌の育種を目的とした研究を実施した。供試菌としては *Aspergillus* Section *Nigri* に属する *Aspergillus tubingensis* WU-2223L 株を使用した。 *Aspergillus* 属糸状菌で懸念されるマイコトキシンは、オクラトキシン、フモニシン、アフラトキシンおよびパツリンであるが、ゲノム情報と LC-MS/MS を使用した高精度代謝産物解析の両面からの検証を行い、WU-2223L 株がこれら4種のマイコトキシン非生産性であることを明らかにした。クエン酸生産条件下では、ミトコンドリアからサイトゾルへのクエン酸の輸送に関わるミトコンドリア局在型の有機酸輸送体（対向輸送を行うと想定されるもの）をコードする遺伝子12個の中で7個が転写されていることを確認したため、ゲノム編集システムを利用して各遺伝子のノックアウト株を作製した。7種のノックアウト株の中で、クエン酸と2-オキソグルタル酸の対向輸送を行うと想定されるタンパクをコードする遺伝子 *cocA* ノックアウト株でクエン酸生産が激減した。したがって、ミトコンドリアの有機酸輸送体では、COCA タンパクがクエン酸生産に貢献していると考えられる。 *Aspergillus* 属糸状菌では、クエン酸をサイトゾルから細胞外に排出するタンパクをコードする遺伝子が *cexA* とされるが、WU-2223L 株ゲノムにも *cexA* が存在する。そこで、ゲノム編集システムにより *cexA* ノックアウト株を作製し諸性質を検討したところ、培地へのクエン酸の排出は認められなかった。すなわち、*cexA* のノックアウトによってクエン酸非生産株

が作製されたこと、換言すればサイトゾルから細胞外へのクエン酸輸送系をコードする遺伝子が *cexA* だけであることが明らかになった。つぎに、グルコース存在下で高発現が可能な *tef* プロモーターの下流に *cexA* 遺伝子を配置した遺伝子カセットを作製し WU-2223L 株に導入し、高発現株を作製した。 *cexA* 遺伝子が2個導入された組換え株 LhC-2 は、親株 WU-2223L 株より高いクエン酸生産量を示した。以上より、本研究の結果は、ゲノム編集システムを利用した有機酸輸送系の改変による高効率クエン酸生産系状菌の育種が可能なることを明らかにしている。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 吉岡 育哲, 桐村 光太郎. クエン酸生産系状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L を宿主とした CRISPR/Cas9 システムによる高効率かつ迅速な遺伝子置換. 日本農芸化学会2020年度大会(福岡), 講演要旨集 3A08a09 (2020年3月).
- 2) 小田 祐之亮, 滝口 有沙, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎. タンパク質データベースを利用した *in silico* 解析による新規アコニット酸イソメラーゼの探索と活性の検出. 日本農芸化学会2020年度大会(福岡), 講演要旨集 3C03p02 (2020年3月).
- 3) 飯塚 恭平, 佐伯 詩歩, 石井 義孝, 桐村 光太郎. *Aspergillus niger* NRRL328由来Ⅲ型PKS An-CryAを利用した新規ポリケチドの合成. 日本化学会第100回春季年会(千葉), 講演予稿集 2PC-158 (2020年3月).
- 4) 吉岡 育哲, 高橋 弘喜, 楠屋 陽子, 矢口 貴志, 桐村 光太郎. クエン酸高生産菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L のドラフトゲノムの決定. 日本農芸化学会2021年度大会(仙台), 講演要旨集 2A03-03 79 (2021年3月).
- 5) 大浦 智之, 吉岡 育哲, 脇本 紗梨, 桐村 光太郎. ゲノム編集システムを用いたクエン酸生産系状菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体遺伝子ノックアウト株の作製と性能評価. 日本農芸化学会2021年度大会(仙台), 講演要旨集 2B02-01 123 (2021年3月).
- 6) 飯塚 恭平, 石井 義孝, 桐村 光太郎. III型PKSを利用した methylmalonyl-CoA からの新規多置換芳香族化合物の合成. 日本農芸化学会2021年度大会(仙台), 講演要旨集 2A01-01 60 (2021年3月).
- 7) 吉岡 育哲, 桐村 光太郎. クエン酸高生産系状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L の育種を目的とした CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子置換法の開発. 第73回日本生物工学会大会(オンライン), 講演要旨集 G2H4 (2021年10月).
- 8) 柴田 朗, 吉岡 育哲, 中川 博之, 桐村 光太郎. ゲノムおよび代謝産物の分析に基づくクエン酸高生産菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L のマイコトキシン非生産性の検証. 日本農芸化学会2022年度大会(オンライン), 講演要旨集 4B02-11 (2022年3月).

原著論文

- 1) Yoshioka, I., Kobayashi, K. & Kirimura, K. 2020. Overexpression of the gene encoding alternative oxidase

for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing *Aspergillus niger* expressing oxaloacetate hydrolase gene. J. Biosci. Bioengineer. 129: 172-176.

- 2) Yoshioka, I. & Kirimura, K. 2021. Rapid and marker-free gene replacement in citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by the CRISPR/Cas9 system-based genome editing technique using DNA fragments encoding sgRNAs. J. Biosci. Bioengineer. 131: 579-588.
- 3) Yoshioka, I., Nakagawa, H. & Kirimura, K. 2022. Nonproduction of mycotoxins by citric acid hyperproducer *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L: Evidence for its biosafety based on the analyses of genome sequence and metabolites. JSM Mycotoxins. (paper submitted)

謝 辞

本研究は、公益財団法人発酵研究所 2020年度 大型研究助成(課題番号 L-2020-3-021)を得て実施しました。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ならびに関連各位に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。マイコトキシンを含む代謝産物の高精度分析について共同研究を実施していただいた(独)農業・食品産業技術総合研究機構、食品総合研究所の中川博之主任研究員に感謝の意を表します。

文 献

- Andersen, M.R., Salazar, M.P., Schaap, P.J., *et al.* 2011. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 21:885-897.
- Bennett, J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*, p 1-17. *In* Machida, M., Gomi, K. (ed), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Emms, D.M. & Kelly, S. 2015. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biol.* 16:157.
- Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. & Houbraeken, J. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*. 93:1-63.
- Frisvad, J., Larsen, T., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. & Nielsen, K. 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*. 6.: e23496.
- Honda, Y., Kobayashi, K., & Kirimura, K. 2011. Increases in gene-targeting frequencies due to disruption of *kueA* as a *ku80* homolog in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1594-1596.
- Hong, S.B., Lee, M., Kim, D.H., Varga, J., Frisvad, J.C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraeken, J., & Samson, R.A., 2013. *Aspergillus luchuensis*, an industrially

- important black *Aspergillus* in east Asia. PLoS ONE, 8: e63769.
- Kirimura, K., Kobayashi, K., Ueda, Y. & Hattori T. 2016. Phenotypes of gene disruptants in relation to a putative mitochondrial malate-citrate shuttle protein in citric acid-producing *Aspergillus niger*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80: 1737-1746.
- Kirimura, K., Kobayashi, K. & Yoshioka, I. 2019. Decrease of citric acid produced by *Aspergillus niger* through disruption of the gene encoding a putative mitochondrial citrate-oxoglutarate shuttle protein. Biosci. Biotechnol. Biochem., 83: 1538-1546.
- Kirimura, K. & Yoshioka, I. 2019. Bio-based chemicals, citric acid, p 158-165. In Murray, M. Y. (ed), Comprehensive Biotechnology, 3rd ed. Elsevier, London.
- Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K. & Tsukagoshi, N. 1998. Utilization of the TEF1-a gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 85-92.
- Kobayashi, K., Hattori, T., Honda, Y. & Kirimura, K. 2014. Oxalic acid production by citric acid-producing *Aspergillus niger* overexpressing the oxaloacetate hydrolase gene *oahA*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41: 749-756.
- Kobayashi, K., Maruebi, J. & Kirimura, K. 2016. Bioproduction of trans-aconitic acid from citric acid by whole-cell reaction of *Escherichia coli* heterologously expressing the aconitate isomerase gene from *Pseudomonas* sp. WU-0701. Chemistry Select 1: 1467-1471.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35: 1547-1549.
- Maddox, I.S., Hossain, M. & Brooks, J.D. 1986. The effect of methanol on citric acid production from galactose by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 203-205.
- Moyer, A.J. 1953a. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. II. Fermentation of crude carbohydrates. Appl. Microbiol. 1: 7-13.
- Moyer, A.J. 1953b. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. I. Nature of the alcohol effect. Appl. Microbiol. 1: 1-7.
- Nakagawa, H., Hashimoto, R., Matusno, Y., Sago, Y., Yokoyama, K. & Takahashi, H. 2020. Detection and determination of fumonisins B1, B2, and B3 contaminating Japanese domestic wine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Curr. Microbiol. 77: 3057-3064.
- Nakamura, S., Sato, H., Tanaka, R., Kusuya, H., Takahashi, H. & Yaguchi, T. 2017. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification and discrimination of *Aspergillus* species. BMC Microbiol. 17: 100.
- Nakari-Setälä, T. & Penttilä, M. 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3650-3655.
- Odoni, D.I., Vazquez-Vilar, M., van Gaal M.P., Schonewille, T., Martins dos Santos V.A., Tamayo-Ramos, J.A., Suarez-Diez, M. & Schaap, P.J. 2019. *Aspergillus niger* citrate exporter revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions. FEMS Microbiol. Lett. 366: fnz071.
- 坂口謹一郎, 馬場眞一郎. 1942. 黒黴の酸酐酵に就て (第1報補遺). 日本農芸化学会誌. 18: 1033-1034.
- Steiger, M.G., Rassinger, A., Mattanovich, D. & Sauer, M. 2019. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. Metabol. Engineer. 52: 224-231.
- Susca, A., Proctor, R.H., Butchko, R.A.E., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A. & Moretti, A. 2014. Variation in fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and non-producing black *Aspergilli*. Fungal Genet. Biol. 73: 39-52.
- Susca, A., Proctor, R. H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A.F. & Moretti, A. 2016. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. Front. Microbiol. 7: 1412.
- Usami, S. 1978. Production of citric acid by submerged culture. Mem. School Sci. Engineer. Waseda Univ. 42: 17-26.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., & Samson, R.A. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology. 69: 1-17.
- de Vries, R.P., Riley, R., Wiebenga, et al. 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. Genome Biology. 18: 28.
- 矢口貴志. 2009. 真菌の分類と同定. モダンメディア 55: 205-216 (2009).
- Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., et al. 2016. Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314. DNA Res. 23: 507-515.
- Yoshioka, I. & Kirimura, K. 2021. Rapid and marker-free gene replacement in citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L by the CRISPR/Cas9 system-based genome editing technique using DNA fragments encoding sgRNAs. J. Biosci. Bioeng. 131: 579-588.
- Yoshioka, I., Kobayashi, K. & Kirimura, K. 2020a. Overexpression of the gene encoding alternative oxidase for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing *Aspergillus niger* expressing oxaloacetate hydrolase gene. J. Biosci. Bioeng. 129: 172-176.
- Yoshioka, I., Nakagawa, H. & Kirimura, K. 2022. Non-production of mycotoxins by citric acid hyperproducer *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L: Evidence for its biosafety based on genome sequence and metabolite analyses. JSM Mycotoxins. 72: 75-83.
- Yoshioka, I., Takahashi, H., Kusuya, Y., Yaguchi, T. & Kirimura, K. 2020b. Draft genome sequence of *Aspergillus tubingensis* WU-2223L, a citric acid-producing filamentous fungus belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. Microbiol Resour. Announc. 9: e00702-20.

2016年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：2016年10月～2022年3月

細菌の環境適応・機能進化機構の包括的理解と環境細菌の高度利用 および未開拓潜在機能開発への応用

永田 裕二

東北大学大学院生命科学研究所微生物進化機能開発寄附講座

〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Comprehensive studies on bacterial adaptation and evolution mechanisms and development of advanced technologies to use unexplored bacterial functions

Yuji Nagata

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577

The main purposes of this study were (i) to understand comprehensively the evolutionary mechanisms behind the emergence of artificially synthesized environmental pollutants-metabolizing bacteria and (ii) to develop new technologies to use unexplored microbial functions. We focused on γ -HCH-degrading bacteria, and conducted studies at the gene (genome), enzyme, cell, and population levels. At the gene (genome) level, it was demonstrated that genome evolution related to γ -HCH metabolic function in the soil microbial population is ongoing. In addition, it was suggested that MV may function as a reservoir of genetic information. At the enzyme level, the high potential of dehalogenases and their usefulness as materials for functional development were demonstrated. At the cell level, structural information on ABC transporter essential for γ -HCH utilization was obtained. In addition, the CO₂-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO phenotype) was found, and its mechanism was partially revealed. At population level, it was observed that a clonal population diversified and coexisted through experimental evolution, and the involvement of TBDR in the coexistence was demonstrated. In addition, the importance of non-degrading bacteria in the γ -HCH-degrading bacterial community was demonstrated, and some mechanisms we found in this study are directly applicable for practical application such as bioremediation.

第一章 はじめに

人類の活動によって、様々な化学物質が環境中に放出され、深刻な環境問題を引き起こしている一方で、人為起源の難分解性物質をも分解・資化する微生物の存在が知られている (Janssen *et al.*, 2005). それら微生物は、比較的短期間で新奇物質代謝能を獲得したと考えられ、環境浄化への応用だけでなく、生物の環境適応・進化機構の解明という基礎学問的にも優れた研究対象である。これまでに、様々な環境汚染物質分解資化細菌に関する研究が行われ、難分解性の環境汚染物質の中では比較的易分解性である芳香族化合物の分解資化細菌の分解代謝系

遺伝子群は、発現制御系を備えたセットとして存在し、可動性遺伝因子に載って環境細菌中に流布していることが明らかになっている (Tsuda *et al.*, 1999). これに対して、人工農薬などの高度に難分解性の環境汚染物質については、完全分解細菌の報告例はあるものの (Janssen *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2016), それら細菌がどのように新奇代謝能力を獲得したのかは不明な点が多い。

有機塩素系殺虫剤 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン (γ -HCH) は人為起源の難分解性物質であり、ストックホルム条約により残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) にも指定され、その汚染に対する国際的な取り組みが求められている。HCH には8つの異性体 (鏡像異性体を含めると9つ) が存在する。殺虫活性を有するのは γ -HCH のみであるが、工業生産の際に、主に4つの異性体 α -, β -, γ -, δ -体が生じ、これら異性体の全てが環境中に残留し、汚染物質として問題になっている (Vijgen *et al.*, 2011). 中でも β -HCH は

E-mail: aynaga@ig.tohoku.ac.jp

教員：永田 裕二 (現、東北大学大学院生命科学研究所).

矢野 大和 (現、国立感染症研究所).

加藤 広海 (現、東北大学大学院生命科学研究所).

佐藤 優花里 (現、東北大学大学院生命科学研究所).

塩素原子の全てがシクロヘキサン環のエクアトリアル位置に存在するために化学的に最も安定である。

γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株は、 γ -HCH が 12 年間散布された日本の試験圃場から単離された (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989)。UT26 株は γ -HCH を唯一炭素源として生育し、その代謝経路と代謝反応を触媒する酵素、およびそれら酵素をコードする *lin* 遺伝子群が解明された (Fig.1)。

本代謝経路において、 γ -HCH は各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である β -ケトアジピン酸を経て代謝されるため、LinA (γ -HCH dehydrochlorinase)、LinB (1,4-TCDN halidohydrolase)、LinC (2,5-DDOL dehydrogenase)、LinD (2,5-DCHQ reductive dehalogenase)、LinE (CHQ 1,2-dioxygenase)、LinF (マレイル酢酸 reductase) の 6 つの代謝酵素によって担われる β -ケトアジピン酸までの代謝が γ -HCH 分解に特異的な反応と考えられる (Nagata *et al.*, 2007)。UT26 株は、

γ -HCH の完全分解が可能であるが、代謝過程で有毒な dead-end 産物を生じる (Fig.1)。また、*linA*、*linB*、*linC* は構成的に発現している (Nagata *et al.*, 2007)。さらに、*lin* 遺伝子群はゲノム中に散在し、第一染色体に存在する *linA*、*linB*、*linC* はオペロンを形成していない (Nagata *et al.*, 2011)。*linA*、*linC* および *linRED* クラスターの近傍には挿入配列 IS6100 が存在し、*lin* 遺伝子群の遺伝的不安定さの主要因となっている。このように、UT26 株の γ -HCH 代謝経路は洗練度が低く、成立して間もない代謝系であることを示唆する多くの特徴を有している (Nagata *et al.*, 2019)。

UT26 株以外にも、 γ -HCH を分解資化する細菌株が世界各地の汚染環境から単離されているが、分解に関与する酵素遺伝子が解明されている γ -HCH 分解資化菌は、ほぼ全てスフィンゴモナッド細菌群に属する (Lal *et al.*, 2010)。スフィンゴモナッド細菌群は *Alphaproteobacteria* に属するグラム陰性菌で、外膜にリポ多糖を持たずにス

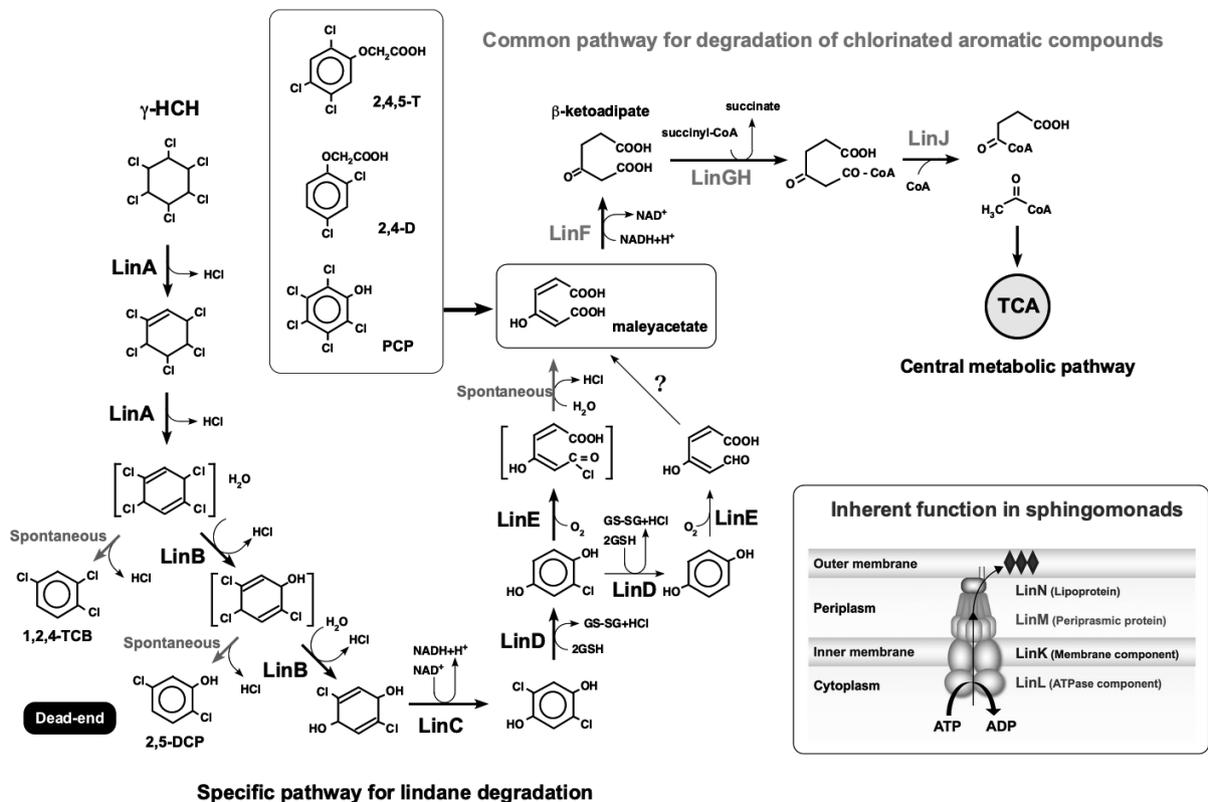


Fig. 1 Functions necessary for γ -HCH utilization in sphingomonads (Nagata *et al.*, 2019). β -Ketoacid pathway is common pathway for the degradation of aromatic compounds and is widely distributed among environmental bacteria. 1,2,4-TCB and 2,5-DCP are dead-end products, and 2,5-DCP has toxic effect on the cells. The LinKLN-type ABC transporter, which is an inherent function in sphingomonads, is involved in the tolerance for the toxic effect of 2,5-DCP.

フィンゴ糖脂質を持ち (Kawahara *et al.*, 1990), 多様な難分解性物質の分解能を有する株が単離されていることから, 潜在的に多彩な物質代謝能を有する細菌群と考えられている (Stolz, 2009). 我々の研究グループは, UT26 株に加えて, γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingomonas* sp. MM-1 株, *Sphingobium* sp. MI1205 株, *Sphingobium* sp. TKS 株の全ゲノム配列を完全決定した (Tabata *et al.*, 2016). これらの株は, 16S rRNA 遺伝子の解析により, 互いに系統学的にある程度離れているが, γ -HCH 分解に関しては, UT26 株の *linA* から *linE* とほぼ同一の遺伝子を利用する. このことは, 同一起源の γ -HCH 分解細菌株が世界中に広まったのではなく, 複数の祖先株がほぼ同一の γ -HCH 代謝に必要な「特殊遺伝子」を獲得し, γ -HCH 分解細菌株が世界各地で「独立に」誕生したことを強く示唆する. また, 代謝酵素遺伝子以外にも, UT26 株の γ -HCH 分解資化には *linKLMN* がコードする ABC トランスポーターが必須である (Endo *et al.*, 2007). *linKLMN* ホモログは, 他の γ -HCH 分解細菌株のみなら

ず, γ -HCH 分解能を持たないスフィンゴモナッド株にも保存されており, スフィンゴモナッド細菌群がコア機能として有する γ -HCH 分解に必要な因子と考えられている (Endo *et al.*, 2007). すなわち, 適当な遺伝的背景を持つ細菌株が特殊性の高い酵素をコードする *lin* 遺伝子群を獲得し, 代表的な γ -HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株で解明された代謝経路で γ -HCH を分解資化すると考えられる. さらに, 多様化と選択の過程を経て, 進化型の γ -HCH 分解資化細菌が生まれると推察される (Fig.2) (Nagata *et al.*, 2019).

しかし, このモデルにはまだまだ多くの謎が残っている. そもそも, 特殊遺伝子をどこから, どのように獲得したのか? 酵素進化のメカニズムはどのようなものなのか? 進化に重要な細胞機能とはどのようなものなのか? また, 実際の環境中では分解細菌が単独で存在している状況は考え難く, 他細菌細胞との相互作用も重要なはずである. すなわち, 集団の形成と集団としての進化はどのようなものなのか?

以上の背景を踏まえ, 本寄付講座では, γ -HCH 分解資化細菌を主な研究対象として, 遺伝子 (ゲノム)・酵素・細胞・集団の各レベルから細菌が有する「特殊」機能を多面的に解析することで, 細菌の環境適応・機能進化機構の本質を包括的に理解し, 得られる知見を元に細菌の実環境での高度利用, および画期的な未開拓潜在機能開発に応用するための基盤を確立することを目的として, 研究を実施した.

第二章 研究成果の概要

1. 特殊性の高い遺伝子の起源と細菌がそれら遺伝子を獲得する機構

細菌が人工化合物の分解等で利用する特殊性の高い遺伝子の起源と, 細菌がそれら遺伝子を獲得する機構の解明を目的として, γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株の土壌環境中でのゲノム進化に関する解析, γ -HCH 代謝における鍵反応を触媒する 2 種類の脱ハロゲン酵素 LinA と LinB をコードする遺伝子のキャプチャリング系の構築を実施すると共に, メンベリベシクル (MV) が遺伝情報リザーバーとしての機能する可能性について検討した.

かつて UT26 株が単離された土壌 (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989) を γ -HCH で再汚染化したところ, 菌叢が変化し, メタゲノム中の γ -HCH 分解関連遺伝子の割合が顕著に増加した. γ -HCH 分解細菌株が増加したと考えられたため, 本再汚染化土壌から γ -HCH 分解細菌株を単離した. 単離株の代表株である TA15 株は, UT26 株とゲノムの基本骨格は同一であったが, *lin* 遺

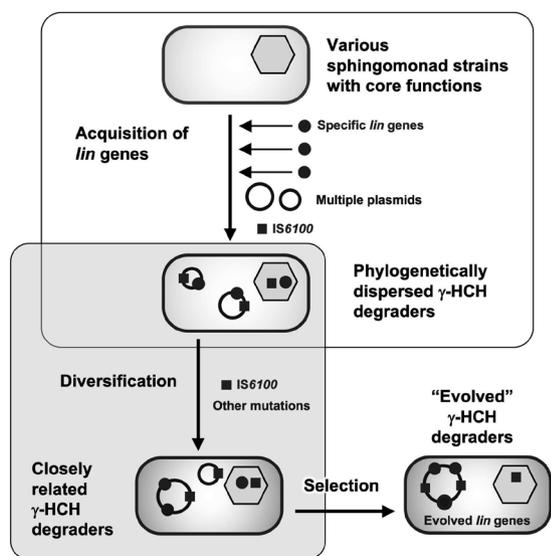


Fig. 2 Proposed model for the emergence and evolution of γ -HCH-degrading sphingomonad strains (Nagata *et al.*, 2019). Ancestral various non- γ -HCH-degrading sphingomonad strains with core functions, e.g. LinKLMN-type ABC transporter and β -ketoacid pathway turned to be primitive γ -HCH degraders by the acquisition of specific *lin* genes using sphingomonads-specific multiple plasmids and IS6100. The primitive γ -HCH degraders were diversified by the involvement of IS6100 and other mutations. The selective pressure may produce the 'evolved' γ -HCH degraders.

伝子群の構成と存在様式が異なっていた (Kato *et al.*, 2022) (Fig.3).

特に, *lin* 遺伝子群の集中化と *linB* 遺伝子のコピー数の増加という顕著な違いが観察され, γ -HCH 分解機能に関する UT26 株との違いが予想された. そこで, 本株の γ -HCH 分解機能を検討したところ, 本株は UT26 株に比べて dead-end 産物の蓄積量が少なく, γ -HCH の代謝バランスの観点から, UT26 株に比べて進化型である可能性が示唆された (Kato *et al.*, 2022). 以上, 実際の土壤中, γ -HCH 分解機能に関するゲノム進化が進行中であることを提示した. ただし, 両者のゲノムの異なる点を詳細に解析した結果, IS6100 の転移により「UT26 株の構造から TA15 株の構造に変化したヶ所」だけでなく, 「TA15 株の構造から UT26 株の構造に変化したヶ所」も存在し, 単純に「UT26 株から TA15 株に変異した」のではなく, 両者は共通の先祖型株から派生した株であると考えられる (Kato *et al.*, 2022).

一方, 天然の γ -HCH 分解細菌では, 分解に関与する *lin* 遺伝子群がゲノム中に散在し, 近傍に存在する IS6100 等の影響で遺伝的に不安定であるという問題が

ある (Tabata *et al.*, 2016). そこで, UT26 株ではゲノム中に散在する *linA* から *linF* 遺伝子をクラスター化して IS6100 を持たない他のスフィンゴモナッド株に導入することで, 人工的な γ -HCH 分解細菌を構築した. 作製した人工株の中には, 明らかな γ -HCH 資化能を示し, dead-end 産物の蓄積量が天然株より少ないものもあり, 今後, 天然株には存在しない発現制御系を備えさせるなど, 本研究で得られた知見を元にして, より改良型の人工株の作製が期待できる. さらに, これら人工株を元に *linA* と *linB* のキャプチャリング株を構築し, これら株が, 当該遺伝子導入により γ -HCH 資化能を回復することを確認した.

新たに蛍光標識するなどして作製した天然株由来の *linA* と *linB* のキャプチャリング株と, 上記の人工株由来のキャプチャリング株を各種環境試料と混合し, 当該遺伝子の取得を試みたが, 期間内で目的の遺伝子取得株は得られなかった. 本研究で作製した既存株で, さらに実験を行う必要がある. しかし, 本研究でのスクリーニングの過程で, 明確な γ -HCH 資化能を示さないにも関わらず, γ -HCH 培地上でわずかながらクリアゾーンを

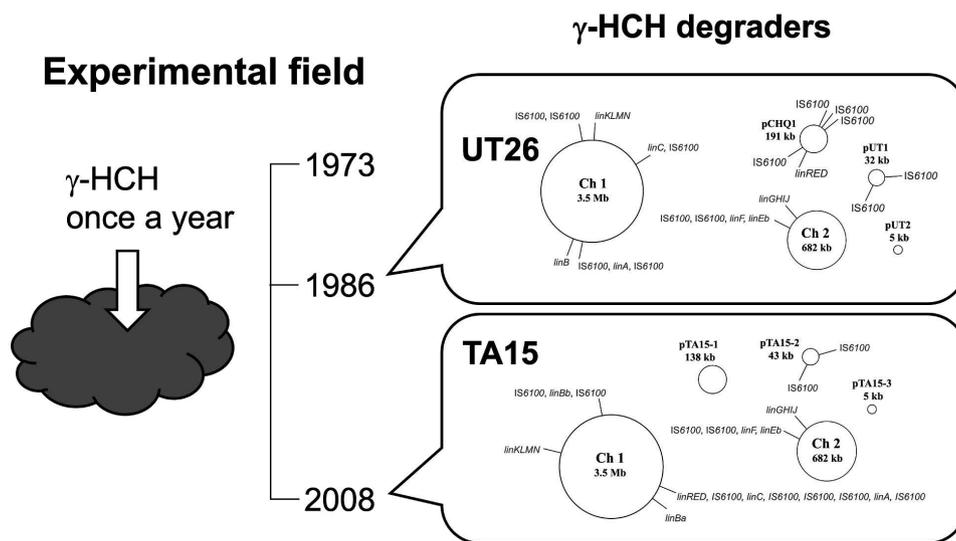


Fig. 3 Genome evolution related to the γ -HCH metabolic function in the soil microbial population (Kato *et al.*, 2022). γ -HCH-degrading strain, *Sphingobium* sp. TA15, was newly isolated from an experimental field soil from which the archetypal γ -HCH-degrading strain, *S. japonicum* UT26, was isolated previously. Comparison of the complete genome sequences of these 2 strains revealed that TA15 shares the same basic genome backbone with UT26, but also has the variable regions that are presumed to have changed either from UT26 or from a putative common ancestor. Organization and localization of *lin* genes of TA15 were different from those of UT26. It was inferred that transposition of IS6100 had played a crucial role in these genome rearrangements. The accumulation of toxic dead-end products in TA15 was lower than in UT26, suggesting that TA15 utilizes γ -HCH more effectively than UT26. These results suggested that genome evolution related to the γ -HCH metabolic function in the soil microbial population is ongoing.

形成して生育する株が土壌環境試料に存在し、スクリーニングを阻害した。このようなノイズを排除するために、キャプチャリング株の改良を含め、さらなる取得系の改良が望まれる。

本研究では、近年、環境中で「遺伝情報のリザーバー」や「水平伝播のベクター」として機能することが示唆されているMVに着目した (Toyofuku *et al.*, 2019; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)。まず、 γ -HCH 分解細菌 UT26 株がMVを産生することを明らかにした。また、 γ -HCH 資化に必須のABCトランスポーターLinKLMN 遺伝子破壊株では、野生株より多量のMVを産出した。さらに、UT26 株のMVにはDNaseによる分解を受けにくい *linA* 遺伝子が含まれることを示し (Fig. 4), MVが遺伝情報リザーバーとして機能する可能性を提示した。今後、UT26 株が産出するMVに存在する遺伝情報が、実際に細菌細胞に取り込まれて機能するか、検討する必要がある。

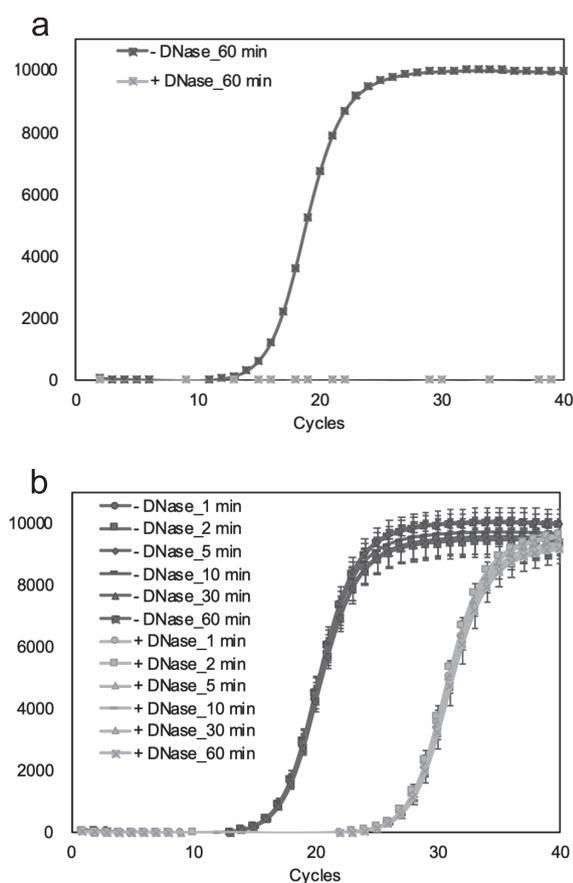


Fig. 4 Membrane vesicle (MV) produced by UT26 has potential as genetic information reservoir. Effect of DNase treatment on abundance of *linA* gene in genomic DNA solution (a) and in membrane vesicle fraction (b) was analyzed by qPCR.

2. 脱ハロゲン酵素の機能進化

脱ハロゲン酵素は、有機ハロゲン系化合物の分解の鍵となる酵素であり、有機ハロゲン系化合物が環境汚染物質や工業副産物など、主要な有害物質グループのひとつであることから、応用的な観点から極めて重要な酵素である (Fetzner, 1998)。また、様々な人工的に合成された有機ハロゲン化合物が存在することから、それらに直接アタックする脱ハロゲン酵素は、酵素の起源や進化、構造-機能相関関係の研究にも適した研究材料である (Nagata *et al.*, 2016)。本研究では、脱ハロゲン酵素の機能進化に関する知見を得ることを目的として、 γ -HCH 代謝系に関与する脱ハロゲン酵素のうち、類似酵素が知られていないユニークな脱塩化水素酵素 LinA (Imai *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 1993a; Nagata *et al.*, 2016) と、多くの類似酵素が知られており、構造-機能相関の研究に適した HLD の一員である LinB (Nagata *et al.*, 1993b; Nagata *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 2015; Nagata *et al.*, 2016) に関する解析を行った。

γ -HCH 代謝に関わる LinB は、細菌が広く有し、基質特異性が広く、活性特性が変化しやすいという特徴を有する HLD の一員である (Moriuchi *et al.*, 2014) が、既知の γ -HCH 分解菌で利用されている HLD は LinB のみである。本研究では、 γ -HCH 分解細菌 UT26 株の *linB* 遺伝子を他の HLD あるいは HLD ホモログ遺伝子に置換した株を作製し、LinB 以外の HLD も γ -HCH 代謝に関与し得ることを明示した。さらに、HLD の γ -HCH 代謝機能に関する実験進化系を構築し (Fig. 5), 特に、error-prone PCR により変異を導入する *in vitro* 進化実験系において、実際に、dead-end 産物を蓄積しにくいという γ -HCH 代謝における機能が向上したと考えられる進化型酵素の取得に成功した。

以上、*in vivo* での生育を指標としたスクリーニングを用いる本実験進化系は良好に機能し、 γ -HCH 資化に対する HLD の進化過程の一端を観察することができたと結論した。今後、得られた進化型酵素のより詳細な解析で、LinB 型の活性の鍵となるアミノ酸残基の機能解明が期待できる。

ポリ塩化ビフェニル (PCB) /biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株 (Kimbara *et al.*, 1989) は、*Betaproteobacteria* に属し、全ゲノム配列も決定されている (Ohtsubo *et al.*, 2012)。KKS102 株のゲノムに、N 末端側に *Escherichia coli* K12 株の tRNA adenosine deaminase (TadA) (Wolf *et al.*, 2002) と有意な相同性を示す CDA 領域、C 末端側に HLD と相同性を示す融合タンパク質をコードする遺伝子を見出し、*dahX* と命名して解析を行った。遺伝子破壊株の解析から、本酵素の CDA 領域は、通常の増殖に必須ではないが、重要であ

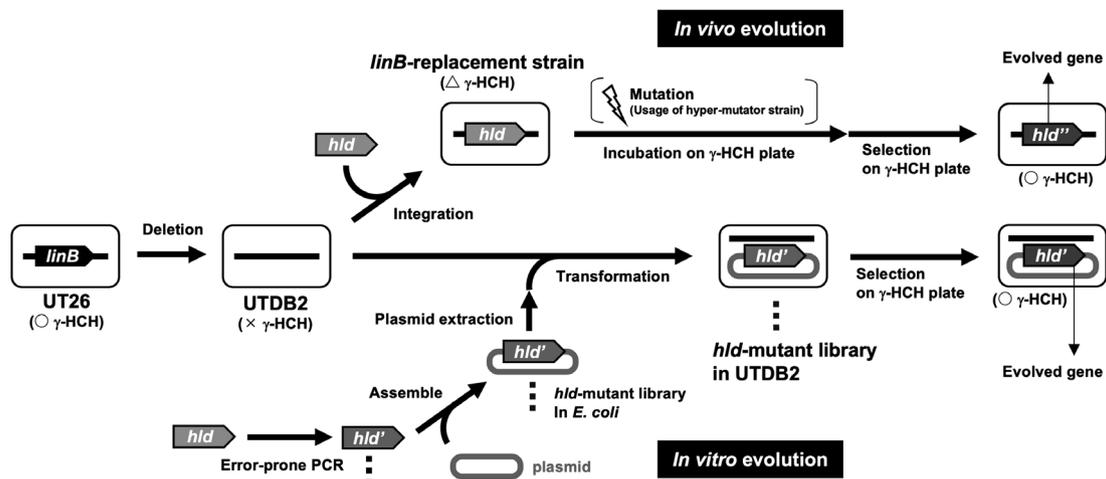


Fig. 5 Strategy for experimental evolution of haloalkane dehalogenase (HLD) and its related proteins toward γ -HCH utilization.

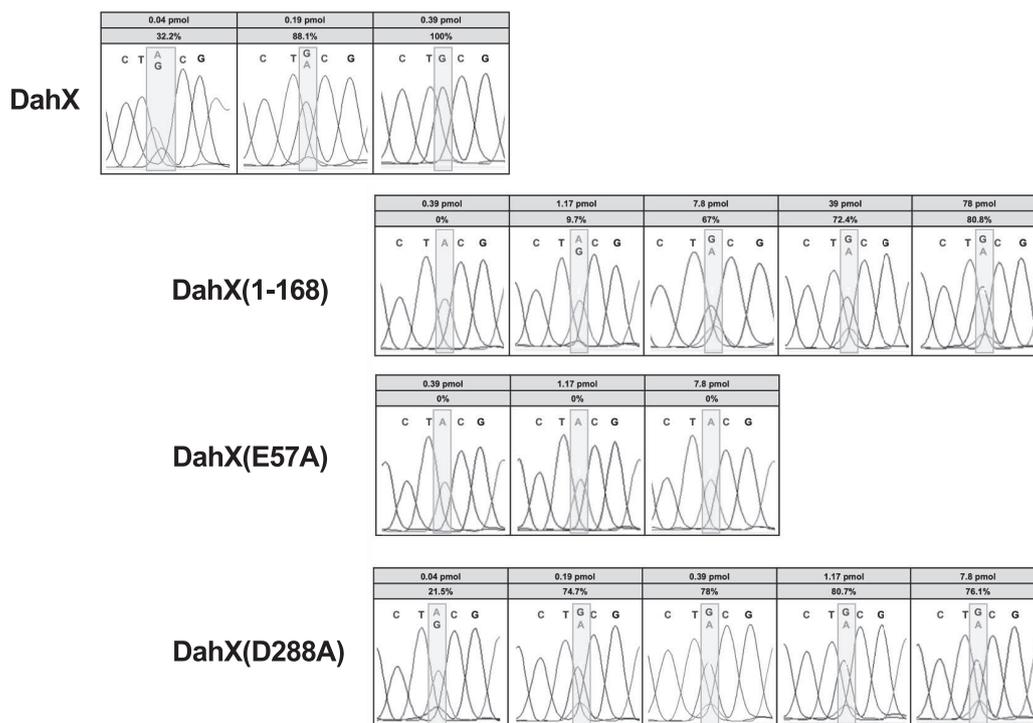


Fig. 6 tRNA-editing activity of DahX and its derivatives. tRNA^{Arg}_{A₃₄}CG was incubated with purified DahX and its derivatives, and the change of A₃₄ to I was detected by Sanger sequencing. Note that I is sequenced as G in this system. Concentration of proteins and ratio of the editing (%) are shown at the top of each wave form data.

ることが明らかになった。本酵素のHLD領域は、新奇の基質特性を有するHLD活性を示した。また、CDA領域はtRNA-specific deaminase活性を示し、HLDと融合すること、およびHLD活性がtRNA-specific deaminase活性にも影響を及ぼしていると示唆された (Fig. 6)。

以上、通常の増殖にも重要なtRNA-specific deaminase活性を有する酵素と融合して存在する新奇なHLDを発見した。

さらに、酵素としても、コードする遺伝子としてもユニークな脱塩化水素酵素であるLinAが、 γ -HCH関連物

質だけでなく、重要な環境汚染物質である人工殺虫剤 DDT を DDE に変換する活性も有することを明らかにした。すなわち、人工化学物質の分解に関わるユニークな脱ハロゲン酵素の新たな潜在能力を提示した。以上、本研究において、脱ハロゲン酵素の潜在能力の高さと機能開発の素材としての有用性を提示することができた。

3. 細菌の環境適応・進化に関する細胞機能

細菌の環境適応・進化に関する細胞機能に関する知見を得ることを目的として、 γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株の分解代謝酵素以外の γ -HCH 資化に必須な因子である ABC トランスポーター LinKLMN と、本株の低栄養環境での増殖現象について解析を行った。

UT26 株の LinKLMN に関する以前の研究では、薬剤耐性遺伝子で当該遺伝子を破壊した株が用いられていた (Endo *et al.*, 2007) ため、本研究では、当該領域のみをマーカーレスで完全欠失した *linKLMN* 破壊株を新たに作製し、新たに作製した相補用プラスミドを持つ相補株と合わせて解析を行った。その結果、破壊株では、(i) コハク酸を唯一炭素源とした際の生育能が上昇すること、(ii) 細胞染色剤の取り込み能が上昇すること、(iii) 野生株に比べて多量の MV を産生すること、が明らかになった。さらに、LinKLMN 特有の機能を規定する因子と考えられる LinM と LinN の生化学的解析を実施

し、(iv) 大腸菌で発現・精製した LinM にリン脂質が結合していると示唆された。以上の結果は、LinKLMN は細胞膜成分の輸送を介して細胞外膜の integrity に関与するという仮説を支持する。一方、LinM と LinN がそれぞれ多量体を形成し、互いに相互作用する可能性を示唆する結果が精製蛋白質のゲルろ過クロマトグラフィー解析により得られた。特に LinN については、構造学的解析を進め、8 量体構造であることが TEM 解析により強く示唆された (Fig.7)。

これらの結果は、LinM と LinN の多量体の内部のチャンネルを輸送基質が通過するという LinKLMN の予想モデル図 (Fig.1) と矛盾しない。

UT26 株は *Alphaproteobacteria* に属する従属栄養細菌であり、生育に有機炭素源を必要とし、炭素源を添加しない無機塩培地では生育しないが、本株がアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *adhX* 遺伝子の高発現で炭素源非添加の無機培地で CO₂ 依存的に細胞増殖する現象 (HYGO 表現型) を見出した (Fig.8) (Inaba *et al.*, 2020)。

本現象は、広く環境細菌が有する機能である可能性が示唆され、また、UT26 株は独立栄養細菌の CO₂ 固定機構の鍵酵素遺伝子ホモログは有しておらず、HYGO 表現型において新規の CO₂ 固定経路が機能している可能性も考えられたため、機構解明を進めた。特に、より定量的な解析が可能な qTn-Seq 法を開発し、HYGO 表現型に関与する遺伝子の網羅的同定を行った。その結果、HYGO 表現型株は、低栄養環境下でグリオキシル酸回路で CO₂ の放出を抑えつつ、環境中に低濃度で存在するエタノールを主な基質として利用して増殖している可能性が示唆された。今後、HYGO 表現型のより詳細な機構が解明されれば、多くの環境細菌が有する常温・常圧環境

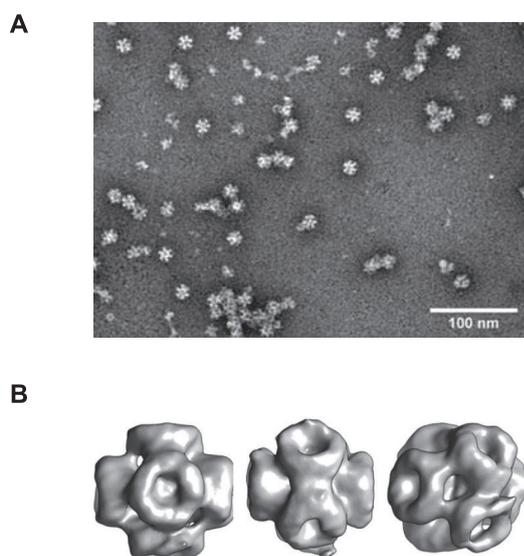


Fig.7 Multimer structure of LinN, a component of LinKLMN ABC transporter system. Purified His-LinN expressed in *E. coli* was analyzed by TEM (A), and 3D structure model of His-LinN was constructed by using single molecules observed by TEM analysis (B).

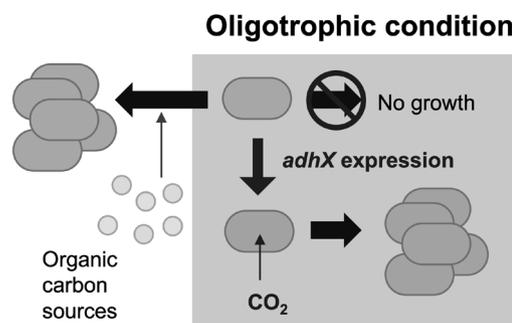


Fig.8 CO₂-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO) phenotype of *Sphingobium japonicum* UT26 (Inaba *et al.*, 2020). A heterotrophic bacterium strain UT26 can grow under oligotrophic conditions by expression of the *adhX* gene encoding alcohol dehydrogenase.

でのCO₂固定機構として生態学的意義が大きいだけでなく、CO₂削減問題への展開も期待できる。また、発酵産業において、有用微生物を培養し物質生産するための培地の費用を抑えるに越したことはない。従属栄養細菌が低栄養環境で生残し、積極的に増殖する機構が解明されれば、こうした有用細菌の培養において、栄養源の添加量を抑えた効率的な培養法が開発できるかもしれない。一方、浄水や工業パイプライン、医療器具など、低栄養と思われる環境でも有害細菌が増殖し、問題となるケースが多い。HYGO表現型の機構は、こうした有害細菌の低栄養環境での増殖機構とも関連している可能性が考えられ、有害細菌の増殖抑制による汚染防止技術への展開も期待できる。さらに、環境バイオテクノロジーの観点からは、分解菌が汚染環境に定着せず、十分な分解能を発揮しないことがしばしば問題となっており (Ramos *et al.*, 2011)、本現象は、分解菌を汚染環境に接種するバイオオーグメンテーションへの直接的応用が期待できる。

4. 細菌集団の形成と進化

細菌集団の形成と進化に関する原理を理解し、バイオレメディエーションなどの実際の応用技術にも資する基礎知見を得るために、有機塩素系殺虫剤 γ -HCH分解能力を有する細菌細胞集団を対象とした研究を実施した。

U26株の*linA*遺伝子下流に緑色蛍光タンパク質ZsGreen1を挿入したSHY12株を構築し、これを祖先株として、クローナルな γ -HCH分解細胞集団を空間構造

のある平板培地上で世代交代を繰り返した結果、染色体の部分欠失を持つ系統が自然発生し、その欠失をもたない系統と共存し続ける現象が観察された (Fig.9)。

それら系統のゲノム解析と集団のメタゲノム解析から、異なる系統の共存の機構のひとつとして、TBDRホモログ遺伝子に変異が起り、膜の透過性の向上と凝集性を獲得することが重要であることが明らかになった。総じて、染色体欠失を保有する株と保有していない株の共存は、資源または空間のニッチ分割が保証されることで成立していることが示唆された。

γ -HCH分解細菌を環境試料から単離する場合、 γ -HCHによる集積培養を行い、固体培地上でのシングルコロニーアイソレーションで分解菌を単離する。その際、一見シングルコロニーと思われる細胞集団の中に γ -HCH分解細菌だけでなく非分解細菌が共存し続けることがあり、純粋分離に種々の培地が必要になるケースがある。このような現象は γ -HCH分解細菌の場合だけでなく、様々な分解細菌の分離の際にしばしば観察される現象である。本研究では、このような経緯で取得したヘテロな γ -HCH分解細菌集団について解析を行った。その結果、(i) γ -HCHを唯一の炭素源とした液体培地による継代培養を繰り返しても、分解菌が優占種とならないこと、(ii) γ -HCHを唯一の炭素源とした固体培地上で、非分解細菌の存在により長期持続的な巨大コロニーを形成すること、から非分解細菌の重要性が明らかになった。さらに、本集団より単離した細菌株の解析により、非分解細

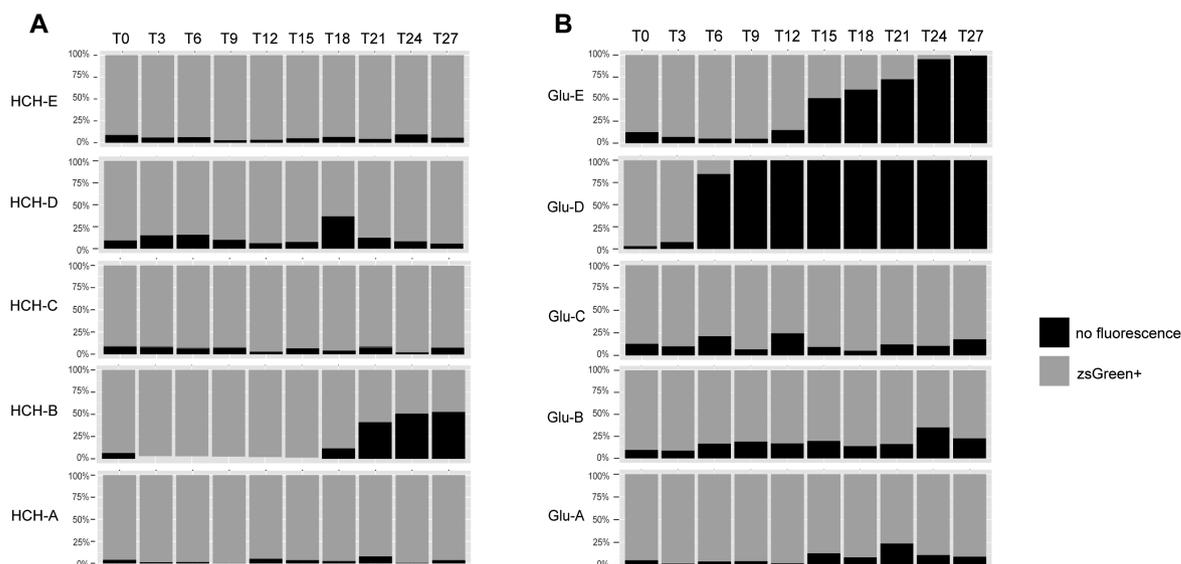


Fig. 9 Coexistence of nonfluorescent and fluorescent cells in evolving populations. (A) Five population lineages evolved on γ -HCH minimal agar plates. (B) Five population lineages evolved on glucose minimal agar plates. Up to 5% cells in each population can be regarded as nonfluorescent cell due to the nature of data analysis.

菌が分解細菌にコロニー伸長する directional colony growth (DCG) 現象を見出すと共に、本表現型を示す *Cupriavidus* 株が巨大コロニー形成にも重要であることを明らかにした。また、移動性細菌を利用して非移動性細菌が棲息域を拡大するヒッチハイク現象 (Finkelshtein *et al.*, 2015; Shrivastava *et al.*, 2018) が、 γ -HCH 分解細菌で観察された。すなわち、非移動性の γ -HCH 分解細菌 UT26 株を移動性の *Paenibacillus* sp. NKL2 株と固体培地上に共接種すると、UT26 株の棲息域拡大と広領域の γ -HCH の分解が観察された (Fig.10AB)。

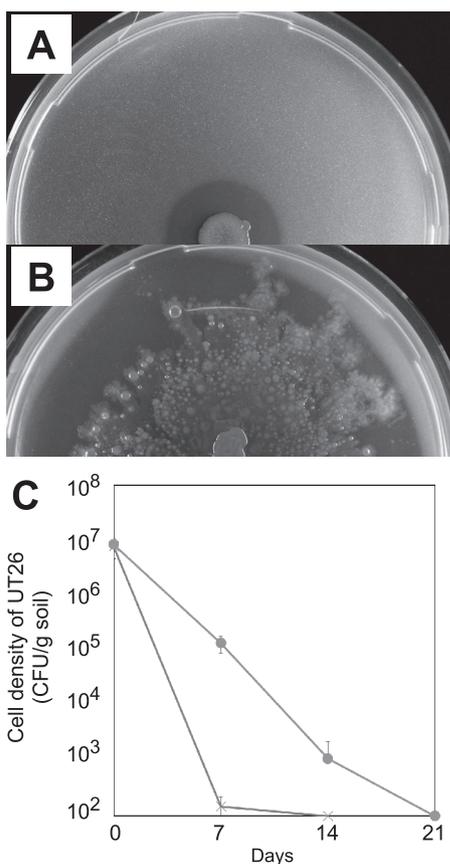


Fig. 10 *Paenibacillus* sp. NKL2 promoted growth of *Sphingobium japonicum* UT26. Colony formation of monoculture of non-swarming UT26 (A) and co-culture of UT26 and a swarming bacterium *Paenibacillus* sp. NKL2 (B) on 1/3LB plate with γ -HCH. Clear zone around the large colony on the plate with cloudy color derived from γ -HCH particles indicates area where UT26 degraded γ -HCH. Effect of co-culturing with NKL2 on survivability of UT26 (monitored by CFU) in soil sterilized by γ -irradiation (C). Monoculture of UT26 (cross) and co-culture of UT26 and NKL2 (circle)

さらに、NKL2 株との共培養が UT26 株の土壤環境での生残性の向上に寄与することが示唆された (Fig.10C)。すなわち、本現象のバイオレメディエーションへの直接的な応用が期待できる。一方、我々は、土壤細菌叢の再構成過程に関する多くのデータを持っており、その中で、土壤細菌叢の初期形成における移動性細菌の重要性が示唆されている。これら細菌種の多くが易培養性で細胞外多糖類 (EPS) を生産することから、易培養性細菌が EPS を介して様々な土壤細菌と相互作用している可能性が考えられた。そこで易培養性の *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株が生産する EPS を唯一の炭素源とする液体培地を用いて土壤微生物集団を集積培養した結果、難培養性の *Verrucomicrobia* 門細菌群の増殖を選択的に促進することを見出し、新たな細菌間の相互作用を利用した難培養性細菌の培養手法を提示した。

第三章 おわりに

人工の化学物質である γ -HCH を分解資化する能力を有する細菌を主な研究対象として、遺伝子 (ゲノム)・酵素・細胞・集団の各レベルから研究を実施し、遺伝子 (ゲノム) レベルでは、 γ -HCH 代謝機能に関するゲノム進化が実際の土壤環境中で進行中であることを明示すると共に、MV の遺伝情報のリザーバーとしての機能の可能性を提示した。酵素レベルでは、 γ -HCH 分解に関与する脱ハロゲン酵素および HLD の潜在能力の高さと、自然界にはまだまだ新奇性の高い類似酵素が存在することを示した。細胞レベルでは、スフィンゴモナッド細菌群の多彩な代謝能力を支える重要な機能と考えられる ABC トランスポーターの機能解明に繋がる知見を得ると共に、低栄養環境での CO₂ 固定を伴う増殖 (HYGO 表現型) という新奇性の高い現象を見出し、その機構に関しても一定の知見を得た。HYGO 表現型は、進化において「多様化」と「選択」が必須であることを考えると、低栄養環境でも何とか細胞数を増やすことで新奇代謝能力の獲得の可能性が広がり、環境適応という観点だけでなく、進化的観点からも重要な因子であると考えられる。集団レベルにおいては、クローナルな集団が実験進化により多様化し共存することを観察でき、共存の機構に関しても TBDR の関与を示すことができた。また、 γ -HCH 分解細菌株単独より、非分解細菌株を含む集団の方が長期持続的に γ -HCH を分解すること、およびその集団形成における *Cupriavidus* 株の重要性を示すと共に、移動性のある *Paenibacillus* 株との共存で γ -HCH 細菌株が固相での棲息域を拡げ、土壤での生残性も上昇することを示した。このような集団レベルで得られた知見は、実際のバイオレメディエーションへの応用にも直結

する成果である。

個々の研究は、各レベルごとに行ったが、様々なレベルで解析したことにより、包括的な知見も得られた。例えば、TBDRがHYGO表現型にも、遺伝的に多様化した集団の共存にも鍵になる因子であること、 γ -HCH代謝において、dead-end産物の蓄積を抑えるという適応が、細菌細胞において酵素レベルでもゲノムレベルでも起こっていること、などを提示することができた。後者に関しては、さらに、 γ -HCH分解細菌集団における非分解細菌の共存の意義として、発現制御系を備えない γ -HCH分解細菌単独では、分解活性が細胞集団全体として強すぎる結果、dead-end産物が溜まりやすいのに対して、非分解細菌が共存することで強すぎる活性のブレーキの役割を果たし、dead-end産物の蓄積を抑制している可能性が予想される。すなわち、分解菌単独では不足している調節機能を他細胞の存在で補っている、と捉えることもできる。このような包括的な知見が得られたのも、本寄付講座のような体制で研究を実施することができた成果であると考えている。

なお、各論では触れられなかったが、植物発現用に改変した合成 *linA* 遺伝子 (Nanasato *et al.*, 2016) をシロイヌナズナに導入し、 γ -HCH耐性および分解活性を示す形質転換完全植物体の作製に成功するなどの成果 (Deng *et al.*, unpublished data) を挙げることもできた。以上、人工化学物質代謝能を有する細菌を軸として様々な角度から多様な研究を実施し、今後の関連分野の研究の発展・展開に繋がる多くの成果を挙げる事ができたと考えている。

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成28年度寄付講座助成で行われたもので、ここに感謝の意を表します。そして、寄付講座特任研究員 (野々山翔太, 現, 東京工業大学) の協力のもとに実施しました。また、東北大学大学院生命科学研究科の津田雅孝教授 (定年退職)、大坪嘉行准教授、東谷篤志教授、田中良和教授、渡辺正夫教授、高田美信技術研究員、東京大学農学生命科学研究科の妹尾啓史教授、大塚重人准教授、筑波大学生命環境系の野村暢彦教授、豊福雅典准教授、山本達也博士、チェコ Masaryk 大学の Jiri Damborsky 教授、Zbynek Prokop 教授、のご支援とご協力、東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発講座に在籍した大学院生の皆さんの協力の賜物です。あわせて感謝します。また、文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B) (永田裕二 19H02865)、挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877; 佐藤優花里 16K14908)、ならびに東北大学男女共同参画

推進センター (TUMUG) が実施する TUMUG 支援事業 (男女共同参画・女性研究者支援事業) の支援 (佐藤優花里) にも感謝致します。

文 献

- Endo, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2007). Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for utilization of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. *J Bacteriol* **189**: 3712-3720.
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 633-657.
- Finkelshtein, A., Roth, D., Ben Jacob, E. & Ingham, C. J. (2015). Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *Mbio* **6**.
- Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A. & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* **18**: 425-432.
- Imai, R., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1991). Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from gamma-hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* **173**: 6811-6819.
- Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989). Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas-paucimobilis*. *Agric Biol Chem* **53**: 2015-2017.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology (Reading)* **166**: 531-545.
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J., Poelarends, G. J. & Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* **7**: 1868-1882.
- Kato, H., Su, L., Tanaka, A., Katsu, H., Ohtsubo, Y., Otsuka, S., Senoo, K. & Nagata, Y. (2022). Genome evolution related to gamma-hexachlorocyclohexane metabolic function in the soil microbial population. *Biosci Biotechnol Biochem* **86**: 800-809.
- Kawahara, K., Matsuura, M. & Danbara, H. (1990). Chemical structure and biological activity of lipooligosaccharide isolated from *Sphingomonas paucimobilis*, a gram-negative bacterium lacking usual lipopolysaccharide. *Jpn J Med Sci Biol* **43**: 250.
- Kimbara, K., Hashimoto, T., Fukuda, M., Koana, T., Takagi, M., Oishi, M. & Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Bacteriol* **171**: 2740-2747.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., *et al.* (2010). Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 58-80.
- Moriuchi, R., Tanaka, H., Nikawadori, Y., *et al.* (2014). Stepwise enhancement of catalytic performance of haloalkane dehalogenase LinB towards beta-hexachlorocyclohexane. *AMB Express* **4**: 72.

- Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993a). Purification and characterization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1582-1583.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993b). Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* **175**: 6403-6410.
- Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansovorga, A. & Takagi, M. (1997). Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3707-3710.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 741-752.
- Nagata, Y., Natsui, S., Endo, R., *et al.* (2011). Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb Technol* **49**: 499-508.
- Nagata, Y., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2015). Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 9865-9881.
- Nagata, Y., Tabata, M., Ohtsubo, Y., and Tsuda, M. (2016) Biodegradation of organochlorine pesticides. *Chapter 512 p 1-30 In Yates M, Nakatsu C, Müller R, Pillai S (ed), Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition ASM Press, Washington, DC.*
- Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ Microbiol Rep* **11**: 630-644.
- Nanasato, Y., Namiki, S., Ohsima, M., Moriuchi R., Konagaya, K., Seike, N., Otani, T., Nagata, Y., Tsuda, M., Tabei, Y., (2016) Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by transgenic hairy root cultures of *Cucurbita moschata* that accumulate recombinant bacterial LinA. *Plant Cell Reports* **35**: 1963-1974
- Ohtsubo, Y., Maruyama, F., Mitsui, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2012). Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971.
- Ramos, J. L., Marques, S., van Dillewijn, P., *et al.* (2011). Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends Biotechnol* **29**: 641-647.
- Senoo, K. & Wada, H. (1989). Isolation and identification of an aerobic gamma-HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci Plant Nutr* **35**: 79-87.
- Shrivastava, A., Patel, V. K., Tang, Y. S., Yost, S. C., Dewhirst, F. E. & Berg, H. C. (2018). Cargo transport shapes the spatial organization of a microbial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 8633-8638.
- Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 793-811.
- Tabata, M., Ohhata, S., Nikawadori, Y., *et al.* (2016). Comparison of the complete genome sequences of four gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res* **23**: 581-599.
- Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology* **17**: 13-24.
- Tsuda, M., Tan, H. M., Nishi, A. & Furukawa, K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. *J Biosci Bioeng* **87**: 401-410.
- Vijgen, J., Abhilash, P. C., Li, Y. F., *et al.* (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res Int* **18**: 152-162.
- Wolf, J., Gerber, A. P. & Keller, W. (2002). *tadA*, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *EMBO J* **21**: 3841-3851.

略語一覧

- ABC transporter: ATP-binding cassette transporter
 CDA: cytidine deaminase
 DDE: 1,1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethylene
 DDT: 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethane
 ECD: electron capture detector
 GC: gas chromatography
 GST: glutathione S-transferase
 HCH: hexachlorocyclohexane
 HLD: haloalkane dehalogenase
 HYGO: high-yield growth under oligotrophic conditions
 MV: membrane vesicle
 PCB: polychlorinated biphenyl
 POPs: persistent organic pollutants
 TBDR: TonB-dependent receptor

特殊性の高い遺伝子の起源と細菌がそれら遺伝子を獲得する機構

加藤 広海, 永田 裕二

東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Origin of highly specific genes and the mechanism by which bacteria acquire these genes

Hiromi Kato, Yuji Nagata

Laboratory of Microbial Evolution and Function Research,
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980,-8577

To gain insight into the origin of highly specific genes that are used by bacteria in the degradation of artificial compounds and the mechanism by which bacteria acquire these genes, studies were conducted on γ -HCH-degrading *Sphingobium japonicum* strain UT26. When the soil from which UT26 was isolated was re-contaminated with γ -HCH, the bacterial flora changed and the proportion of γ -HCH degradation-related genes in the metagenome increased. The γ -HCH-degrading bacterium strain TA15 isolated from the re-contaminated soil had the same basic genome structure as UT26, but the organization and localization of the *lin* genes for the γ -HCH degradation were different. Furthermore, TA15 may be more evolved strain than UT26 in terms of the metabolic balance of γ -HCH. On the other hand, artificial γ -HCH-degrading bacterial strains were constructed by introduction of the *lin* gene cluster that consists of *linA* to *linF* genes, which are dispersed on the UT26 genome, into other sphingomonad strains. Furthermore, we constructed strains for capturing of *linA/linB* genes, and mixed them with various environmental samples, but did not obtain any gene-acquired strains. We demonstrated that UT26 produces membrane vesicle (MV), and its *linKLMN*-deletion mutant produces larger amount of MV than wild-type strain. The *linKLMN* genes encode components of ABC transporter essential for the γ -HCH utilization. MV of UT26 contained the *linA* gene tolerant toward DNase, suggesting that MV may function as a reservoir of genetic information.

Key words: γ -hexachlorocyclohexane, genome, metagenome, membrane vesicle, evolution

緒 言

化学工業の発展に伴い、人工合成の生体異物 (xenobiotic) が大量に製造・使用され、環境に放出された。それら化学物質は、化学的な安定性のために生態系に蓄積し、ヒトや環境に棲息する生物に有害な影響を与え、深刻な汚染問題を引き起こしている。一方、それら物質をも分解資化する能力を持つ微生物が存在し、生物の環境適応・進化という基礎学問的な観点、およびそれら能力を環境

浄化に利用するという応用学的な観点の両面から研究が進められている。

有機塩素系殺虫剤 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン (γ -HCH) は人為起源の難分解性物質であり、ストックホルム条約により残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) にも指定され、その汚染に対する国際的な取り組みが求められている。本物質を分解資化する細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株は、 γ -HCH が 12 年間散布された日本の試験圃場から単離された (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989)。UT26 株は γ -HCH を唯一炭素源として生育し、その代謝経路と代謝反応を触媒する酵素、およびそれら酵素をコードする *lin* 遺伝子群が解明された (Fig. 1)。

本代謝経路において、 γ -HCH は各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である β -ケトアジピ

E-mail: aynaga@ige.tohoku.ac.jp

共同研究者：妹尾 啓史 (東京大学農学生命科学研究科).
大塚 重人 (東京大学農学生命科学研究科).
野村 暢彦 (筑波大学生命環境系).
豊福 雅典 (筑波大学生命環境系).

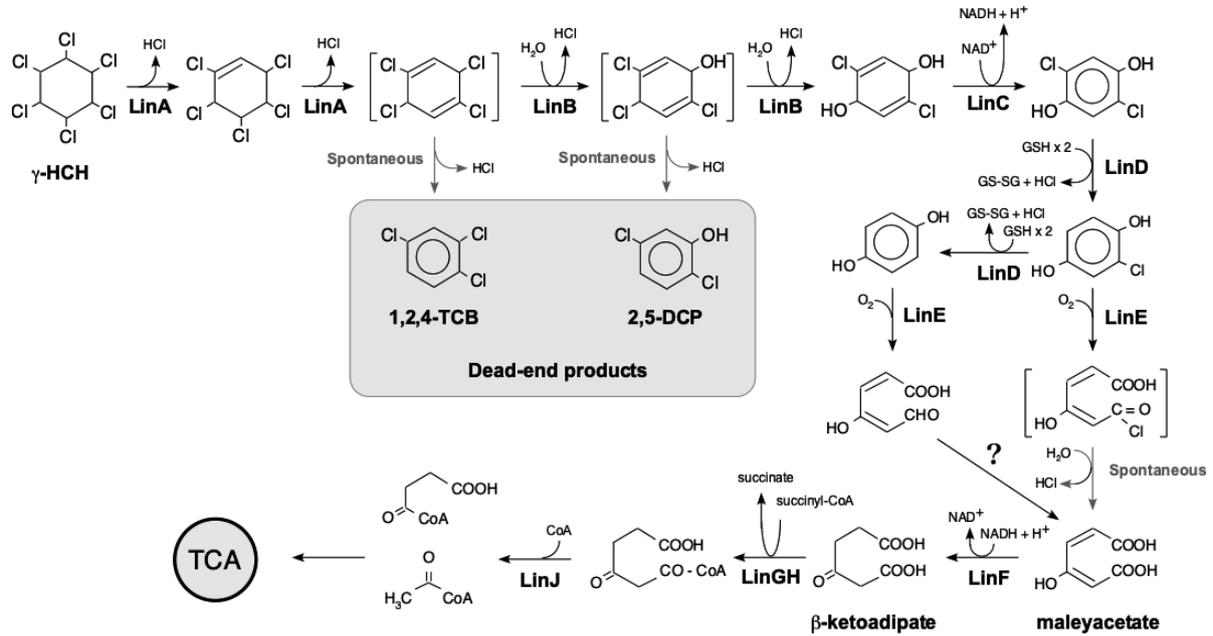


Fig. 1 Degradation pathway of γ -HCH in *S. japonicum* UT26. TCA, citrate/tricarboxylic acid cycle; GSH, glutathione (reduced form); GS-SG, glutathione (oxidized form). Square brackets show unstable compounds that have yet to be detected

ン酸を経て代謝される。多くの環境細菌が本物質の代謝能を有するため、 β -ケトアジピン酸までの代謝が γ -HCH分解に特異的な反応と考えられる。 γ -HCHの β -ケトアジピン酸への変換には、*linA*, *linB*, *linC*, *linD*, *linE*, *linF* 遺伝子がコードする LinA (γ -HCH dehydrochlorinase), LinB (1,4-TCDN halidohydrolase), LinC (2,5-DDOL dehydrogenase), LinD (2,5-DCHQ reductive dehalogenase), LinE (CHQ 1,2-dioxygenase), LinF (マレイル酢酸 reductase) の6つの代謝酵素が必要である。LinAの基質特異性は狭く、検討された基質の中では γ -HCH, γ -PCCH, α -HCH, δ -HCHに対してのみ活性が検出され、 β -HCHや他の検討された塩素化合物には活性を示さなかった (Nagata *et al.*, 1993a)。また、LinAは触媒に補因子が必要ではなく、類似酵素の報告がなく、特殊性が高い新規の脱塩化水素酵素と考えられるが、立体構造的な観点から反応機構が明らかになっている (Okai *et al.*, 2010)。LinBは α/β -hydrolase fold familyに属する加水分解酵素であり (Nagata *et al.*, 1993b; Nagata *et al.*, 1997)、細菌に広く存在するハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) の一員である (Nagata *et al.*, 2015)。一般的に HLDは基質特異性が広く、様々な有機ハロゲン化合物に活性を示し、LinBも α -HCH, β -HCH, δ -HCHなどのHCH関連物質以外にも、様々な

有機ハロゲン化合物に対して活性を示す (Nagata *et al.*, 2015)。

UT26株は、 γ -HCHの完全分解が可能であるが、代謝過程で有毒な dead-end 産物である 1,2,4-トリクロロベンゼン (1,2,4-TCB) と 2,5-ジクロロフェノール (2,5-DCP) を生じる (Fig.1)。また、*linA*, *linB*, *linC*は構成的に発現している (Nagata *et al.*, 2007)。さらに、*lin* 遺伝子群はゲノム中に散在し、第一染色体に存在する *linA*, *linB*, *linC*はオペロンを形成していない (Nagata *et al.*, 2011)。プラスミド pCHQ1 に存在する下流代謝経路遺伝子 *linD*, *linE*はオペロンを形成し、近傍に存在する *linR*がコードする LysR タイプの転写制御因子により発現誘導を受ける (Miyachi *et al.*, 2002)。*linA*, *linC*および *linRED* クラスターの近傍には挿入配列 IS6100 が存在し、*lin* 遺伝子群の遺伝的不安定さの主要因となっている (Nagata *et al.*, 2011)。このように、UT26株の γ -HCH代謝経路は洗練度が低く、成立して間もない代謝系であることを示唆する多くの特徴を有している (Nagata *et al.*, 2019)。

UT26株以外にも、 γ -HCHを分解資化する細菌株が世界各地の汚染環境から単離されているが、分解に関与する酵素遺伝子が解明されている γ -HCH分解資化菌は、ほぼ全てスフィンゴモナッド細菌群に属する (Lal *et al.*,

2010). スフィンゴモナッド細菌群は *Alphaproteobacteria* に属するグラム陰性菌で、外膜にリポ多糖を持たずにスフィンゴ糖脂質を持ち (Kawahara *et al.*, 1990), 多様な難分解性物質の分解能を有する株が単離されていることから、潜在的に多彩な物質代謝能を有する細菌群と考えられている (Stolz, 2009). 我々の研究グループは、UT26 株に加えて、 γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingomonas* sp. MM-1 株, *Sphingobium* sp. MI1205 株, *Sphingobium* sp. TKS 株の全ゲノム配列を完全決定した (Tabata *et al.*, 2016). これらの株は、16S rRNA 遺伝子の解析により、互いに系統学的にある程度離れているが、 γ -HCH 分解に関しては、UT26 株の *linA* から *linE* とほぼ同一の遺伝子を利用する。このことは、同一起源の γ -HCH 分解細菌株が世界中に広まったのではなく、複数の祖先株がほぼ同一の γ -HCH 代謝に必要な「特殊遺伝子」を獲得し、 γ -HCH 分解細菌株が世界各地で「独立に」誕生したことを強く示唆する。また、代謝酵素遺伝子以外にも、UT26 株の γ -HCH 分解資化には *linKLMN* がコードする ABC トランスポーターが必須である (Endo *et al.*, 2007). *linKLMN* ホモログは、他の γ -HCH 分解細菌株のみならず、 γ -HCH 分解能を持たないスフィンゴモナッド株にも保存されており、スフィンゴモナッド細菌群がコア機能として有する γ -HCH 分解に必要な因子と考えられている (Endo *et al.*, 2007). すなわち、適度な遺伝的背景を持つ細菌株が特殊性の高い酵素をコードする *lin* 遺伝子群を獲得し、代表的な γ -HCH 分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株で解明された代謝経路で γ -HCH を分解資化すると考えられる (Nagata *et al.*, 2019). 一方、天然の γ -HCH 分解細菌株は、UT26 株同様に、(i) *lin* 遺伝子群がゲノム中に散在し、近傍に存在する挿入配列 IS6100 の影響で遺伝的に不安定であり、 γ -HCH 分解資化能が安定維持されない、(ii) γ -HCH 代謝過程において dead-end 産物である 1,2,4-TCB と 2,5-DCP を生じる、という適応の不十分さを強く示唆する特徴を有している。これら特徴は γ -HCH 分解細菌株の環境浄化への応用や、遺伝子キャプチャリングの宿主としての利用の際に問題となり、天然株より安定かつ効率的に γ -HCH 分解資化能を発揮する組換え細菌株の育種が望まれる。

難分解性物質の分解遺伝子が可動性遺伝因子 (mobile genetic element, MGE) に乗って微生物集団に伝播することは良く知られているが、それらは、芳香族化合物代謝系の遺伝子が制御系を備えたクラスターという「セット」として転移するケースがほとんどであり (Tsuda *et al.*, 1999), γ -HCH 分解代謝遺伝子群のようにゲノム上に散在する遺伝子群がどのように伝播するのか、また、そもそも特殊性が極めて高い *linA* の起源については全

く未解明である。このように、人為起源の汚染物質による選択圧によって細菌の代謝機能が進化することはもはや明らかといえるが、その機構については不明な点が多い。近年、分子遺伝学、分子生態学やゲノム科学の研究が進み、遺伝子水平伝播の重要性が改めて注目されている。環境汚染物質分解においても、分解遺伝子伝播の重要性が、以下の知見から指摘されている。(i) 系統的に近い分解遺伝子あるいは遺伝子クラスターが地理的に遠い地域から分離された細菌株から見出されている (Whyte *et al.*, 2002). (ii) 同じ汚染物を分解できる違う菌株の分解遺伝子の系統関係は宿主菌の 16S rRNA 遺伝子の系統関係と一致していない (McGowan *et al.*, 1998). (iii) 分解遺伝子あるいは遺伝子クラスターと宿主菌のゲノムの G+C 含量は明らかに差がある (Fong *et al.*, 2000). (iv) 汚染物分解遺伝子が MGE 上に位置する (Top *et al.*, 2002).

これまでに同定された環境汚染物質分解酵素遺伝子の多くは純粋培養された分解菌株由来であるが、自然環境中の微生物の 99% 以上は単離培養が困難と考えられており (Amann *et al.*, 1995), これらの難培養性微生物由来の遺伝子資源の開発と利用も期待されている。Top らは 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 分解プラスミド pJP4 の *tfdA* 遺伝子を欠失させ、当該プラスミド保有株による 2,4-D 汚染土壌からの *tfdA* 遺伝子の獲得に成功している (Top *et al.*, 1996). また、我々は、UT26 株の *linB* 破壊株を γ -HCH 汚染土壌由来の細菌集団と混合し、*linB* を有するプラスミド pLB1 を獲得した (Miyazaki *et al.*, 2006). これらの例は、環境において汚染物質の分解遺伝子が様々な MGEs に担われて転移し、微生物の汚染物質に対する適応・進化に大きく貢献していることを強く示唆する。すなわち、逆に、こうした能力を利用して環境中の遺伝子資源を取得することも可能であると考えられる。このような遺伝子のキャプチャリング実験を高感度で効率的に行うには、取得対象以外の関連遺伝子を安定に保持するなど、優れた受容菌細胞の利用が望まれる。

難培養性細菌とそれらが保持する遺伝子を解析する手法として、近年、メタゲノム解析が用いられている。本手法では、菌株を単離培養する過程を経ずに、環境試料あるいは細菌集団から直接ゲノム DNA を抽出し、シーケンスを行う。HCH 類汚染土壌に関してもメタゲノム解析がなされている。Sangwan ら (2012) は、HCH 濃度が 450,000 ppm という非常に高レベルの汚染土壌のメタゲノム解析により、本環境では HCH 分解能を有する株の報告例のある *Pseudomonas* 属, *Sphingomonas* 属, *Novosphingobium* 属, *Sphingopyxis* 属が高い割合を占めていたことを解明した。また、HCH 類による高濃度、

および低濃度の汚染土壌のメタゲノム中の構成遺伝子の存在比率を比較した結果、高濃度汚染土壌では *lin* 遺伝子群の中でも *linA*, *linB*, および *linC* がより多く検出され、また、*lin* 遺伝子群以外にも、芳香族化合物代謝やストレス耐性、運動性・走化性に関わるタンパク質をコードする遺伝子の存在割合が明らかに高かった (Sangwan *et al.*, 2012)。さらに、高濃度汚染土壌では水平伝達に関する遺伝子も多く存在し、当該環境において遺伝的流動性 (genetic mobility) が上昇していることが示唆された。なお、HCH 類汚染土壌のメタゲノムデータから HCH 分解資化菌である B90A 株と UT26 株の祖先株 genotype の再構築が試みられている (Sangwan *et al.*, 2014)。構築された祖先株の genotype のサイズは B90A 株および UT26 株のゲノムサイズよりも小さく、この祖先株が *linA* と *linC* を水平伝播によって獲得したと考えられた。ただし、HCH 汚染土壌の経時的なメタゲノム解析は行われておらず、HCH 汚染によりどのような時間スケールで土壌メタゲノムが変化していくのか、その変動過程は不明である。その変動過程の解析により、HCH 汚染と HCH 分解に関する遺伝子及び菌株の関係を解明すること、および、環境中に豊富になった分解細菌株の単離及びゲノム解析により、これら菌株の HCH に対する適応・進化過程を解明することが期待される。

γ -HCH 分解細菌について様々な研究が行われてきたが、*lin* 遺伝子群が環境中でどのように存在するのことは未解明のままである。これまでの環境メタゲノミクスの研究によって、微生物の DNA は必ずしも微生物細胞内のゲノムとして存在しているとは限らず、細胞外の溶液中に浮遊したり、鉱物や有機物等に吸着した状態で存在していることが知られており、細胞外 DNA と呼ばれている (Nagler *et al.*, 2018)。このような無機化合物や有機化合物に付着した DNA は分解されにくくなることが報告されている (Levy-Booth *et al.*, 2007)。例えば、DNA が砂や粘土の微粒子、バイオフィームやメンブレンベシクル (MV) に吸着すると、比較的安定に存在できる (Agnelli *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Vorkapic *et al.*, 2016; Schwechheimer and Kuehn, 2015)。これらの点から、*lin* 遺伝子群も環境中において何らかの構造物に付着した状態で存在している可能性がある。特に本研究では、近年、環境中で「遺伝情報のリザーバー」や「水平伝播のベクター」として機能することが示唆されている MV に着目した。MV の直径については様々な報告があるが、おおよそ 20-400 nm である (Toyofuku *et al.*, 2019; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)。MV は外膜タンパク質、ペリプラズムタンパク質、細胞質タンパク質、酵素、細菌毒素、抗原、プラスミド DNA、染色体由

来の DNA 断片、RNA など様々な細胞内成分を内包しており、それら成分を細胞外に分泌、あるいは他細胞に輸送している (Toyofuku *et al.*, 2019; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)。また、内包する化合物の量や種類は生育条件や外界環境によって変化する。これらの点から MV は、微生物の分泌システムのひとつであると考えられている (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)。細胞外に放出される化合物は MV に内包されることで分解から保護される。例えば DNA は MV に内包されることで DNase による分解から保護される (Rumbo *et al.*, 2011)。また、MV は代謝産物の輸送以外にも遺伝子の水平伝播、ファージの感染抑制、細菌間コミュニケーションなど細菌の生態に広く関与している。MV を介した水平伝播は、抗生物質カルバペネムの耐性遺伝子を含むプラスミドが MV を介して非耐性菌に移ることが *Acinetobacter baumannii* 株で初めて報告された (Rumbo *et al.*, 2011)。

ほぼ同一の *lin* 遺伝子群を保持し、複数の祖先株から進化したと考えられる γ -HCH 分解細菌株が単離されているが、これら株の γ -HCH 資化能と分解活性は、体系立てて比較されていない。また、天然の γ -HCH 分解細菌株は γ -HCH 代謝への適応が不十分であり、環境浄化への応用や、遺伝子キャプチャリングの宿主としての利用の際に問題となる。一方、祖先株が、どこからどのようにして *lin* 遺伝子群を獲得したかは依然として不明である。以上の背景を踏まえ、本研究では、高機能分解資化細菌株の育種手法および未開拓遺伝子資源の有効利用法の確立も見据え、(i) 実験室環境下で γ -HCH で再汚染化した土壌における γ -HCH 分解細菌の量的・質的変動の解析、(ii) 天然株より安定かつ効率的に γ -HCH 分解資化能を発揮する組換え細菌株の育種、(iii) 環境試料から特殊性の高い *lin* 遺伝子である *linA* と *linB* の機能を有する遺伝子を取得することを具体的な課題とした。さらに、(iv) γ -HCH 分解細菌の MV の遺伝情報のリザーバーとしての機能についても検討した。

実験方法

実験室環境下で γ -HCH で再汚染化した土壌における γ -HCH 分解細菌の量的・質的変動の解析

γ -HCH を分解資化する細菌株 *Sphingobium japonicum* UT26 株が単離された土壌 (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989) を人工的に γ -HCH で再汚染し、メタゲノム解析により経時的に γ -HCH の存在による土壌中の微生物群集や γ -HCH 分解代謝に関与する遺伝子の変動を観察した。本汚染土壌 (以下 TH と呼称) は、1973 年から 2008 年 6 月まで 10 ppm の γ -HCH を年 1 回土壌に投与した。3 年目以降に高い分解活性が観察され、1986 年に

本土壌試料から集積培養を経て UT26 株の由来株が単離された (Imai *et al.*, 1989; Senoo *et al.*, 1989). また同土壌の γ -HCH 汚染経験のないコントロール土壌を TC とした. 本研究では 2009 年 12 月に採取し, -80°C で凍結保存したものを暗所, 室温で一晩放置して融解させて使用した. 採取時点の TH では γ -HCH 濃度が検出下限未満であり, γ -HCH 分解細菌の密度も低いと考えられた. TH を γ -HCH で再汚染することで, γ -HCH 汚染に伴う *lin* 関連遺伝子群の動態を調べた. ガラス製の容器に 150g の TH を移し, 土壌の γ -HCH 濃度が 1,000ppm (TH-L) または 10,000ppm (TH-H) になるように γ -HCH を添加した. HCH を再添加しない TH をコントロールとした (TH-C). TH-L, TH-H, TH-C を暗所 25°C で培養し, 適宜土壌を少量採取し, HCH 濃度測定とメタゲノム解析に供した. 土壌 (TC, TH, TH-C, TH-L および TH-H) からのメタゲノム DNA の抽出には DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen 社) を用いた. 土壌メタゲノム DNA のショットガンシーケンスのライブラリー (insert size 350 ~ 500bp) を作製し, NovaSeq 6000 (イルミナ社) プラットフォームにて, データ量が 15Gb 以上 (150bp, pair-end) になるようにシーケンスした. 各サンプルのリードデータについて, Metaxa 2 version 2.2 (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015) を用いて, small subunit (SSU: 16S/18S) rRNA 遺伝子のリードを抽出し, 系統アサインを行った. またメタゲノムリード中の γ -HCH 分解関連酵素遺伝子 *linA* ~ *linJ* および挿入配列 IS6100 の *tnp* の存在量を調査した. UT26 株が有する上記遺伝子のアミノ酸配列をデータベースに, メタゲノムリードをクエリに設定し, 相同性解析を行った. 相同性解析には, BLSTX よりも高速で解析が可能な DIAMOND を使用し

た (Buchfink *et al.*, 2015). DIAMOND のデフォルトの条件で得られたリードに対して, identity 98% 以上, クエリカバレッジ 30% 以上のものをヒットリードとして集計し, 各遺伝子にヒットしたリード数をデータベース中の各アミノ酸の長さで除し, さらにサンプル間の存在量を比較するためにトータルリード数で除し, これを各遺伝子の存在量 (gene abundance) として比較解析した.

γ -HCH 分解代謝細菌株の存在の可能性が高い試料から, γ -HCH 分解代謝細菌株の単離を行った. 汚染土壌の懸濁液を γ -HCH を含む寒天培地に接種して培養し, コロニー周辺に γ -HCH 分解の指標であるクリアゾーンを形成した株を純粋分離した. 単離した株のうち, 新規株と推定された株について, 生理的及び分子生物学的な解析を行い, UT26 株と比較した. 新規株の全ゲノム決定では, イルミナ社によるショートリードシーケンスと Oxford Nanopore によるロングリードシーケンスを合わせたハイブリッドアセンブリーを採用した.

γ -HCH 代謝酵素遺伝子人工クラスターを利用した天然株より優れた資化細菌の育種

γ -HCH を各種芳香族化合物代謝経路における共通の中間代謝産物である β -ケトアジピン酸にまで変換する過程 (Fig. 1) が γ -HCH 分解に特異的な反応と考えられるため, 本変換過程に必要な *linA* から *linF* の 6 つの酵素遺伝子を並べた人工 *lin* 遺伝子クラスターを作製した (Fig. 2).

本クラスターでは, γ -HCH 初発分解反応を触媒する LinA の活性が次段階に作用する LinB の活性より相対的に強いと, より多くの dead-end 産物を生じることを考慮し, *linB* と *linA* をクラスターの先頭と最後尾にそれ

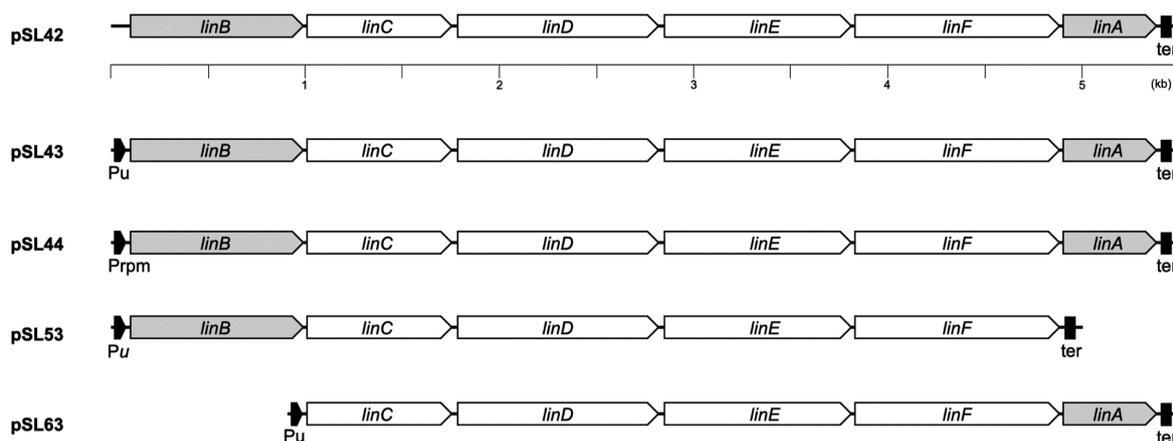


Fig. 2 Construction of *lin* gene clusters used in this study.

ぞれ配置した。まず、挿入したクラスターの発現が、ベクターとして用いる広宿主域プラスミド pBBR1 MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) 由来のプロモーターからの影響を受けることを考慮し、クラスター挿入予定位置の上流に T1 ターミネーターを導入したプラスミド pBBR5T を作製した。次に、pBBR5T にクラスターを導入して pSL42 を作製した (Fig.2)。さらに、pSL42 では、T1 ターミネーター下流にリンカー DNA 配列を導入しており、本配列を利用して、強い構成的発現プロモーター P_u (Nagata *et al.*, 1999) と、弱い構成的発現プロモーター P_{rpm} (Kaczmarczyk *et al.*, 2013) を挿入したプラスミドを作製し、それぞれ pSL43, pSL44 と命名した (Fig.2)。

γ -HCH 分解活性の評価には検出器として ECD を装備したガスクロマトグラフィー (GC) を用いた。また、 γ -HCH 資化能は、1/10W 無機培地 (Inaba *et al.*, 2020) に γ -HCH を 750mg/L となるように加えて作製した γ -HCH 固体培地に菌体をスポットし、30°C で培養して評価した (スポットアッセイ)。

環境試料からの *linA* および *linB* 機能を有する遺伝子の取得の試み

UT26 株はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *adhX* 遺伝子の高発現突然変異により炭素源非添加無機固体培地での生育が可能となる (Inaba *et al.*, 2020)。本突然変異は比較的高頻度で起こるため、 γ -HCH プレートでの生育を指標に目的株をスクリーニングする際の障害となる。そこで、UT26 株由来の *linA* を欠失した YO5 株、*linB* を欠失した UTDB2 株の *adhX* 破壊株を pAK405 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012) を用いた相同組換えにより作製し、それぞれ YO5DAX 株、UTDB2DAX 株と命名した。さらに、キャプチャリング株の挙動が観察し易いように、YO5DAX 株の *linB* 遺伝子の下流に *dsRed2sj*、UTDB2DAX 株の元株で *linB* が存在した部位に *zsGreen1sj* を挿入し、蛍光タンパク質を構成的に発現する YO5DAXR 株と UTDB2DAXG 株を作製した。

土壌試料として、愛媛県の農業試験場の非汚染土壌に γ -HCH を添加し、2年以上静置した土壌 (H 土壌) と、非汚染土壌 (C 土壌) を用いた。本土壌は当研究室で細菌の土壌中での挙動の解明を目的とした様々な研究に使われており、知見が蓄積されている (Nishiyama *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2012; Nagata *et al.*, 2014; Nagayama *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2015)。YO5DAXR 株を接種した H 土壌、C 土壌をそれぞれ HY, CY, UTDB2DAXG 株を接種した H 土壌、C 土壌をそれぞれ HU, CU とした。

γ -HCH 分解菌のスクリーニングは、 γ -HCH 固体培地に試料を塗布し、本培地上で生育し、周囲にクリアゾーンを形成するコロニーを選抜した。

linA, *linB* をそれぞれ含まない *lin* 遺伝子人工クラスター上流に P_u プロモーターを配した *linA* 欠失プラスミド pSL53 と、*linB* 欠失プラスミド pSL63 を作製した (Fig.2)。これらを *Sphingobium chlorophenolicum* L-1 株と *Sphingomonas sangiunis* IAM12578 株に導入し、L-1 (pSL53) 株、L-1 (pSL63) 株と IAM1578 (pSL53) 株、IAM12578 (pSL63) 株を作製した。これら株に *linA* 発現プラスミド pKSLA あるいは *linB* 発現プラスミド pKSLBH を導入し、各遺伝子相補による γ -HCH 資化能を確認した。

γ -HCH 分解遺伝子 MV の遺伝情報リザーバーとしての機能

UT26 株の培養上清から、超遠心および密度勾配遠心 (10~45% のイオジキサノール) により推定 MV 画分を調製した。MV の検出や定量には脂質二重膜特異的に結合し発色する蛍光色素 (FM4-64 または FM1-43, Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。さらに画分に含まれる粒子状物質の粒径分布を測定すると共に、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。MV 画分中に *lin* 関連遺伝子をコードする DNA 断片が含まれているか調べるために、画分を鋳型とした *linA* および *IS6100* を対象とした PCR を行い、産物の増幅を電気泳動で確認した。さらに、この増幅が MV-associated DNA (MV に吸着または内包された状態の DNA) 由来なのか、それ以外のフリー DNA 由来なのかを調べた。フリー DNA を除去するために MV 画分を DNase 処理し、その際、DNase 処理と未処理のサンプルでの DNA 量の変化を、*linA* 特異的なプライマーを用いて qPCR で分析した。

結果および考察

実験室環境下で γ -HCH で再汚染化した土壌における γ -HCH 分解細菌の量的・質的変動の解析

γ -HCH 汚染歴がある TH 土壌を環境試料とした。凍結保存した TH 土壌を融解し、 γ -HCH 濃度を測定した結果、残留 γ -HCH は検出限界以下であった。10ppm の γ -HCH の年 1 回投与の操作が最後に行われた 2008 年 6 月から 2009 年 12 月までに γ -HCH がほぼ完全に分解されたと考えられる。また、R2A 培地で CFU 法により菌体数を測定したところ、コロニーを形成する細菌細胞数は接種後 1 日目では 7.4×10^6 CFU/g soil, 7 日目では 5.25×10^7 CFU/g soil であった。

γ -HCH 再汚染初濃度を 1000ppm に調整した TH-L 土壌、10000ppm に調整した TH-H 土壌を 0 日目、157 日目、230 日目にサンプリングし、 γ -HCH の濃度を測定した。その結果、汚染 0 日目の γ -HCH 濃度測定値は TH-L で

1,313 ppm, TH-H で 9,994 ppm で、ほぼ理論値通りであった。TH-L の γ -HCH 濃度は 157 日目に 18 ppm, 230 日目に 3 ppm まで減少した一方、TH-H の γ -HCH 濃度は 230 日目経っても 10,000 ppm レベルを維持し、顕著な減少は観察されなかった。この結果は、本土壌に γ -HCH を分解できる微生物は存在しているが、非常に高濃度で汚染した場合には、 γ -HCH の分解が抑制される可能性を示唆する。なお、TH-C の γ -HCH 濃度は検出限界以下であった。

TH 土壌及び再汚染開始から 157 日目の TH-L, TH-H, TH-C 土壌からメタゲノム DNA を回収し、ショットガンシーケンスによって γ -HCH 代謝に特異的な γ -HCH から β -ケトアジピン酸までの反応を触媒する酵素遺伝子 *linA* ~ *linF* 及び *IS6100* の存在量を解析した。各土壌試料のサンプルでは、全て 1 億リード以上、合計 15 Gb 以上のデータが取得できた。Diamond を用いた blastx 解析を行った結果、TH-C 由来のメタゲノム DNA からは *lin* 遺伝子及び *IS6100* は検出できず、TH 由来のメタゲノム DNA で *linA* を 1 read, *IS6100* を 2 reads 検出した。これに対して、 γ -HCH を添加した土壌 TH-L, TH-H 由来のメタゲノム DNA からは多くのこれら遺伝子の reads を検出できた。各遺伝子のアミノ酸残基数および合計リード数で標準化した遺伝子の存在割合を比較した結果、157 日目の TH-L と TH-H で、TH-C より明らかに *lin* 遺伝子と *IS6100* の存在割合が高く、また、TH-L と比べ、 γ -HCH が高濃度添加された TH-H の方がこれら遺伝子の存在割合が高かった (Fig.3)。

γ -HCH の再添加で γ -HCH 分解細菌の数も増加したと示唆される。顕著な γ -HCH 分解が観察されなかった TH-H でもこれら遺伝子は TH-L より増加しており、今後大規模な γ -HCH の分解が起こる可能性も考えられる。また、TH-H では *linA* 及び *IS6100* の存在量が顕著に上昇していた。 γ -HCH 代謝経路の初発分解遺伝子である *linA* と、 γ -HCH 分解代謝遺伝子の水平伝達に重要な役割を果たすと考えられている *IS6100* が顕著に増加していることは、TH-H 土壌において単に既存の分解細菌株が増殖したのではなく、 γ -HCH に対して直接的に作用する分解酵素遺伝子の増幅と水平伝播が γ -HCH 濃度依存的に活発に進行していることを示唆する。

土壌細菌叢の系統組成を解明するため、各土壌試料由来のメタゲノムデータに対して Metaxa2 による解析を行った。まず、class レベルでは、TH-C, TH1, TH2 の間に大きな違いはなかったが、TH-L と TH-H では *Alphaproteobacteria* 綱や *Actinobacteria* 綱が多く、*Acidobacteria* 綱が少なかった (Fig.4a)。

さらに、family レベルでは、TH-L と TH-H において *Sphingomonadaceae* 科の存在割合が TH-C, TH と比較して顕著に高かった (Fig.4b)。また、*Sphingomonadaceae* 科の genus 組成では、TH-C, TH では *Sphingobium* 属の割合が非常に低いレベルであったが、TH-L と TH-H では *Sphingobium* 属の割合が高かった (Fig.4c)。TH-C では TH と class および family レベルではほとんど変化がなかったことから、25℃、暗室での長期のインキュベーションでもほとんど菌叢は変化しないと考えられる。一方、



Fig. 3 Gene abundance of *lin* genes and *IS6100* in the γ -HCH re-polluted soils, based on diamond blastx analysis of the shotgun metagenomic sequencing data.

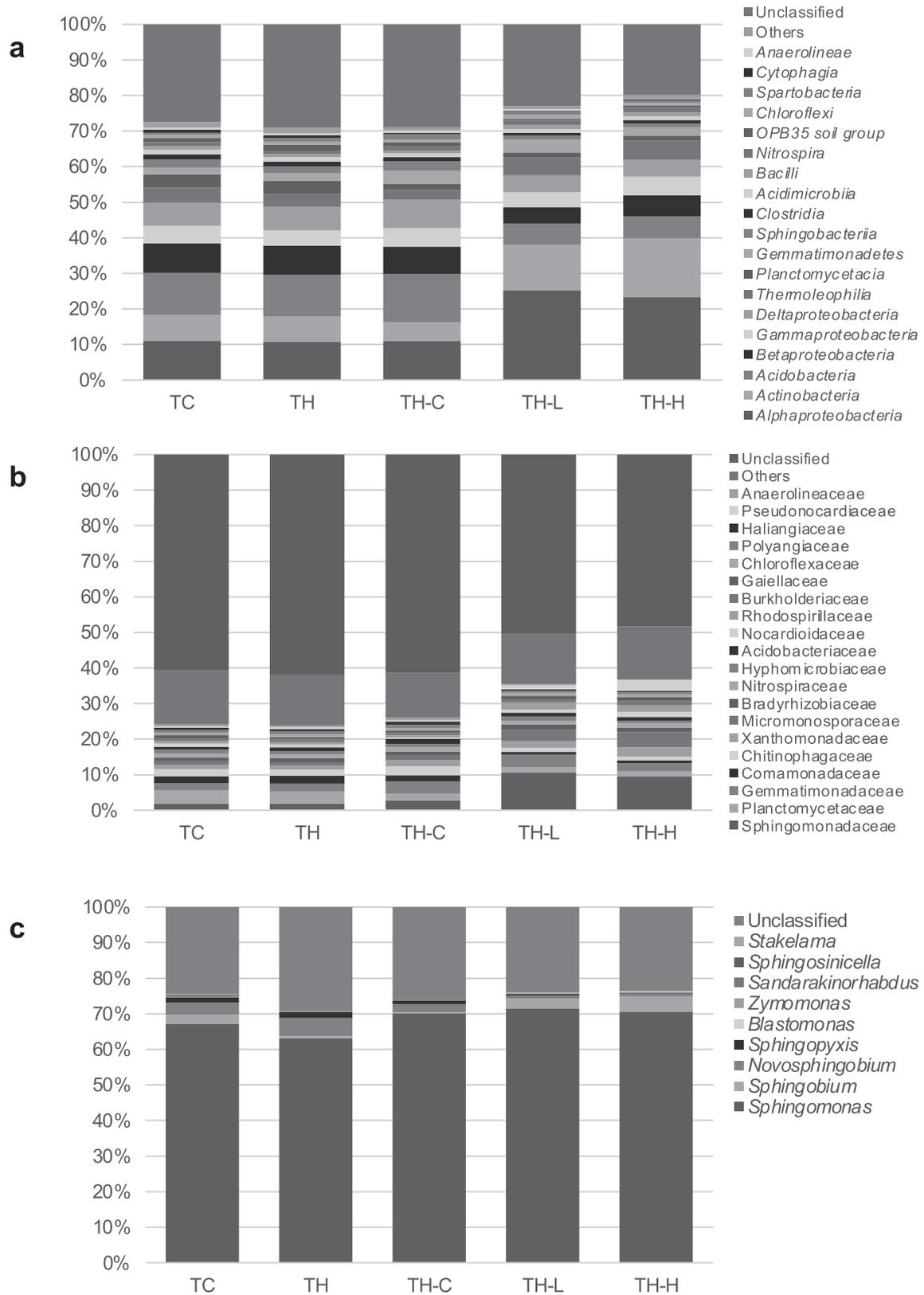


Fig. 4 Taxonomic composition at class (a), family level (b) and genera composition within the family Sphingomonadaceae (c) in the γ -HCH re-polluted soils, based on Metaxa2 analysis of the shotgun metagenomic sequencing data.

TH-LとTH-HではこれまでHCH分解細菌が多数報告されている *Alphaproteobacteria* 綱 *Sphingomonadaceae* 科の割合の増加が観察され、特に汚染に伴って *Sphingobium* 属の割合が増加したことから、 γ -HCH汚染に対して主に *Sphingobium* 属が応答していると推察される。

γ -HCH再汚染化後222日目及び239日目のTH-L、TH-H土壌から、 γ -HCH寒天培地上で γ -HCH分解活性の指標であるクリアゾーン形成を伴って生育する株を複数単離した。これら単離株の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、UT26株のものと99%以上のidentityを示した。さらに、これら単離株のうちの代表として、TA15株のゲノム配列決定を決定した (Kato *et al.*, 2022)。

TA15株とUT26株のゲノムについて、TA15株は16S rRNA遺伝子の塩基配列がUT26株のものと100%同一で、5つの環状レプリコンを有していた (Kato *et al.*, 2022)。GenomeMatcher (Ohtsubo *et al.*, 2008) を用い

て比較した結果 (Kato *et al.*, 2022)、TA15株の5つのレプリコンは一部に重複・挿入・欠失が確認されたが、UT26株の第1染色体、第2染色体、pCHQ1、pUT1、pUT2と極めて高い相同性を示した。*lin*遺伝子群とIS6100に着目して比較した結果、TA15株は、UT26株とほぼ同一の γ -HCH代謝酵素遺伝子 *linA* から *linJ* を有していた。しかし、UT26株では *linB* が1コピーであるのに対して、TA15株は2コピー有していた。また、UT26株では *lin* 遺伝子群がゲノム上に散在しているのに対して、TA15株では *linA* と *linC* の位置が近く、さらに、下流代謝系の遺伝子クラスター *linRED* がプラスミドではなく、第1染色体上の *linA*, *linC* 近傍領域に存在していた (Fig.5)。

TA15株の γ -HCHの分解能について定量的な評価を行った (Kato *et al.*, 2022)。低濃度(10ppm) γ -HCH培地において γ -HCHの分解速度を測定した結果、UT26株

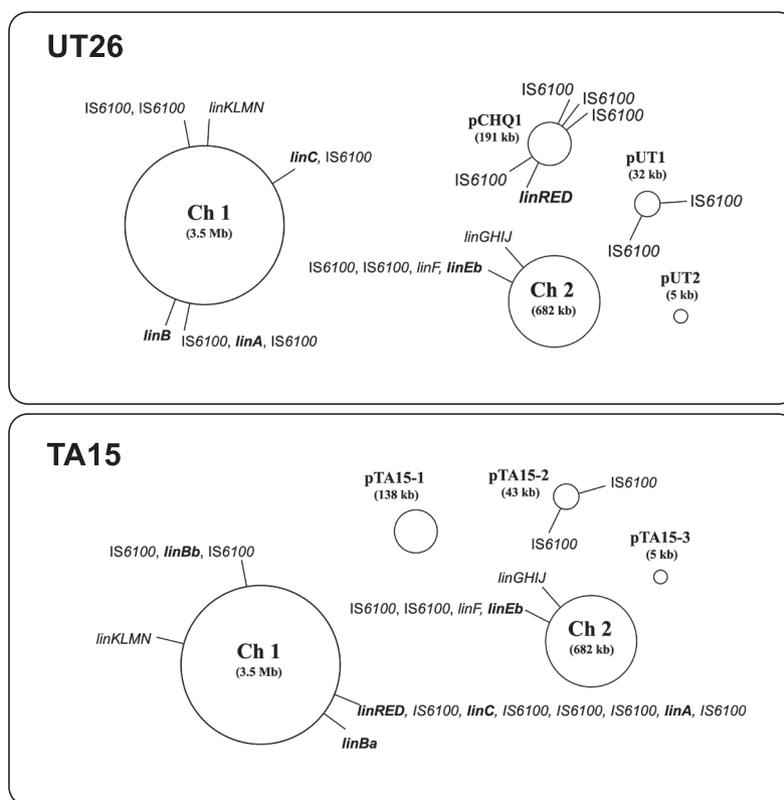


Fig. 5 Localization of *lin* genes and IS6100 in genomes of UT26 and TA15 (Kato *et al.* 2022). Specific *lin* genes (*linA*, *linB*, *linC*, and *linRED*) for the specific pathway for γ -HCH degradation are shown in bold. The distance between genes in the same replicon reflects the actual scale, but the size between replicons does not reflect the actual scale. Plasmid types of pTA15-1, pTA15-2, and pTA15-3 are those of pCHQ1, pUT1, and pUT2, respectively (Nagata *et al.* 2019).

が分解開始30分の時点で γ -HCHを90%以上分解し、60分で γ -HCHをほぼ完全分解した一方で、TA15株は30分で約50%の γ -HCHしか分解せず、残りの γ -HCHを完全分解するには約180分以上かかった (Fig.6a).

すなわち、TA15株の γ -HCH分解速度はUT26株より遅かった。しかし、高濃度(50ppm)の γ -HCH培地において、 γ -HCH代謝過程でLinA活性だけで生じるdead-end産物の1,2,4-TCBと、LinA活性とLinB活性で生じるdead-end産物の2,5-DCPの産出量を検討したところ、TA15株ではUT26株よりいずれのdead-end産物の蓄積量も少なかった (Fig.6b)。

以上、TH土壌の γ -HCHによる再汚染により、 γ -HCHに対する土壌細菌叢及び γ -HCH分解関連遺伝子の変動を観察すると共に、新規な γ -HCH分解細菌TA15株を単離できた。TA15株は、 γ -HCH代謝能における*lin*遺伝子群の構成・存在様式と代謝バランスの観点から、UT26株に比べて「進化的型」である可能性が考えられる。ただし、両者のゲノムの異なる点を詳細に解析した結果、IS6100の転移により「UT26株の構造からTA15株の構造に変化したヶ所」だけでなく、「TA15株の構造からUT26株の構造に変化したヶ所」も存在し、単純に「UT26株からTA15株に変異した」のではなく、両者は共通の先祖型株から派生した株であると考えられる (Kato *et al.*, 2022)。

γ -HCH代謝酵素遺伝子人工クラスターを利用した天然株より優れた資化細菌の育成

γ -HCHを β -ケトアジピン酸にまで変換する過程に必要な*linA*から*linF*の6つの酵素遺伝子を並べた人工*lin*遺伝子クラスターを作製し、導入株における*lin* genesの発現が、(i) pSL43: 高いレベルで構成的に発現、(ii) pSL44: 比較的低レベルで構成的に発現、(iii) pSL42: 極めて低レベルで発現、となることが期待される3種のプラスミドを作製した (Fig.2)。

宿主菌株として、 β -ケトアジピン酸代謝能を有しIS6100を保持しない2種の環境細菌株 (*Sphingobium chlorophenolicum* L-1株, *Sphingomonas sangiunis* IAM12578株)を選び、これらの株にpSL43, pSL44, pSL42を導入した。1/10W γ -HCH培地、及び炭素源を加えない1/10W培地での菌体生育試験の結果をFig.7aに示した。

IAM12578株は、炭素源の添加と*lin*遺伝子を有するプラスミドの導入の有無にかかわらず生育した。ただし、これらIAM12578人工株のうち、高強度プロモーターPuを有するプラスミドpSL43を導入した株のみ明らかに γ -HCH分解活性を示した。一方、L-1株では、pSL43を導入した株で明らかな γ -HCH寒天培地上での生育と γ -HCH分解活性が観察できた。また、pSL44を導入したL-1株でも弱い γ -HCH分解活性が観察された。次に、pSL43を導入したIAM12578株とL-1株の γ -HCH分解活

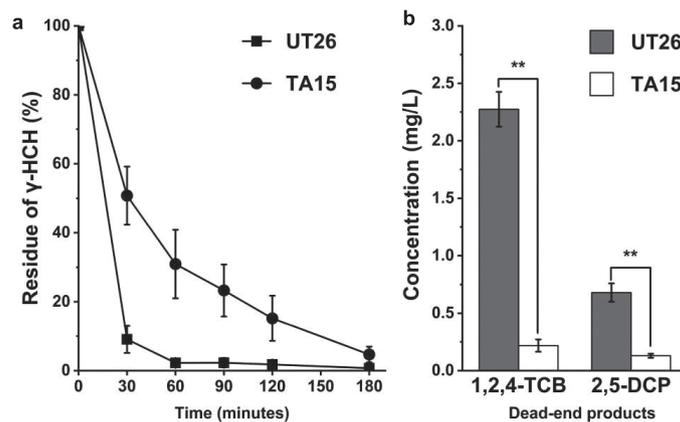


Fig. 6 γ -HCH degradation properties of UT26 and TA15 (Kato *et al.* 2022). (a) For estimating the γ -HCH degradation speed, resting cells of UT26 and TA15 were incubated in 1/10W with 10ppm of γ -HCH, and residual γ -HCH was measured by GC(ECD). (b) To assess the accumulation of the dead-end products clearly, resting cells of UT26 and TA15 were incubated in 1/10W with 50ppm of γ -HCH for 6 hours. At the time point γ -HCH was completely degraded in both the strains, and concentration of 1,2,4-TCB and 2,5-DCP was determined by GC(ECD). The means of three independent experiments and SD are shown by the error bar. The ** denotes statistically significant differences between groups ($P < 0.01$).

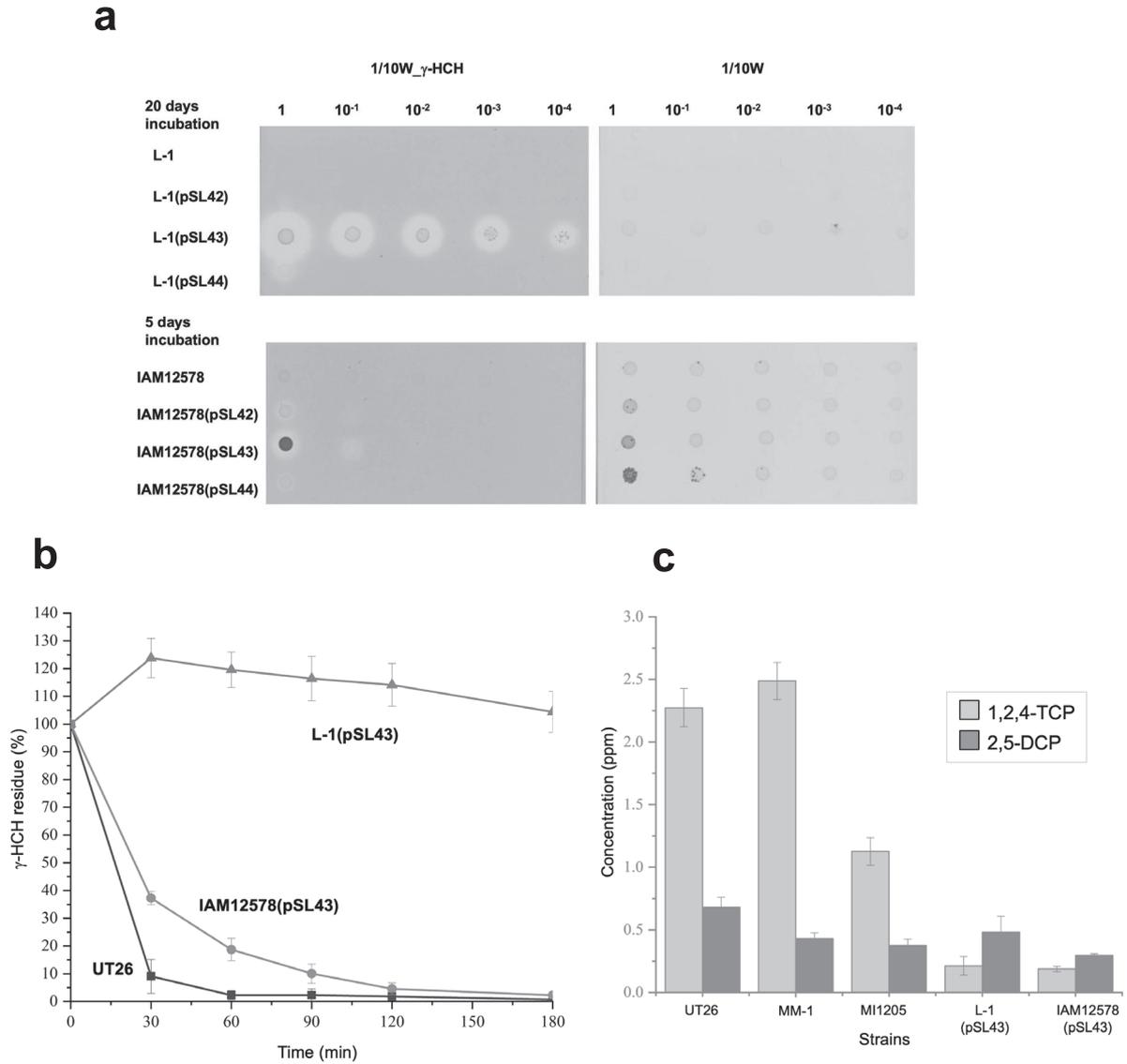


Fig. 7 Properties of artificial HCH-degrading bacteria. (a) Cell suspensions of L-1- and IAM12578-derived strains, whose OD₆₆₀ was adjusted to 1.0, and their dilutions were spotted on 1/10W_γ-HCH and 1/10W medium and incubated for 20 days (L-1 derived strains) and 5 days (IAM12578 strains). (b) Degradation of γ -HCH (10 ppm) in UT26, L-1(pSL43), and IAM12578(pSL43). (c) Accumulation of dead-end products (1,2,4-TCB and 2,5-DCP) in UT26, MM-1, MI1205, L-1(pSL43), and IAM12578(pSL43) during degradation of 50 ppm of γ -HCH.

性をGCにより測定し、UT26株と比較した結果をFig.7bに示した。IAM12578 (pSL43)株は、良好な γ -HCH分解活性を示し、90分後に γ -HCHを95%以上分解した。一方、L-1 (pSL43)株の分解効率は非常に低く、180分後でも γ -HCHを分解しなかった。ただし、IAM12578 (pSL43)株とL-1 (pSL43)株のdead-end産物の蓄積量は検討した γ -HCH分解細菌3株より少なかった (Fig.7c)。以上の結果より、天然株より優れた γ -HCH分解細菌株の構築の実現性を示せた。

環境試料からの *linA* および *linB* 機能を有する遺伝子の取得の試み

UT26株由来の *linA* および *linB* を欠失し、蛍光タンパク質を構成的に発現するYO5DAXR株とUTDB2DAXG株を作製した。これら株を γ -HCHを添加し、2年以上静置した土壌 (H土壌) と、非汚染土壌 (C土壌) に接種した。YO5DAXR株を接種したH土壌、C土壌をそれぞれHY、CY、UTDB2DAXG株を接種したH土壌、C土壌をそれぞれHU、CUとした。接種した際の菌液

の菌体数をCFU法により測定したところ、YO5DAXR株の菌液濃度が 2.5×10^8 CFU/mL、UTDB2DAXG株の菌液濃度が 2.6×10^8 CFU/mLであり、土壌にはYO5DAXR株は 1.313×10^7 CFU/g soil、UTDB2DAXG株は 1.369×10^7 CFU/g soilとなるように接種したことになる。接種して10日後に、蛍光顕微鏡により試料を観察したが、4種類の土壌由来の試料いずれからも蛍光標識された細菌細胞は検出されなかった。すなわち、接種したYO5DAXR株とUTDB2DAXG株が土壌中で迅速に死滅し、これら株が、少なくとも今回の実験系ではキャプチャリング株として適当でないことが示唆された。しかし、全ての試料から γ -HCH固体培地上で生育し、周囲にクリアゾーンを形成するコロニーが観察された。HY、HU試料由来のコロニーのクリアゾーン形成は γ -HCH固体培地に接種後2週間以内で観察できたが、CY、CU試料由来のコロニーのクリアゾーン形成は2週間以上かかった。さらに、4種類の土壌由来の試料いずれにおいても、20日後、30日後、40日後由来の試料からも同様に γ -HCH固体培地でクリアゾーンを形成するコロニーが観察できた。これらからいくつかを選抜し、解析を行ったが、これら株は、(i) UT26由来株ではない、(ii) *linA*あるいは*linB*を保持しない、(iii) 明確な γ -HCH分解活性が観察されない、ことから、それ以上の解析を行わなかった。

linA、*linB*をそれぞれ含まない*lin*遺伝子人工クラスターpSL53とpSL63 (Fig.2)を*Sphingobium chlorophenicum* L-1株と*Sphingomonas sangiunis* IAM12578株に導入し、L-1 (pSL53)株、L-1 (pSL63)株とIAM1578 (pSL53)株、IAM12578 (pSL63)株を作製した。これら株に*linA*発現プラスミドpKSLAあるいは*linB*発現プラスミドpKSLBHを導入したところ、各遺伝子相補株は γ -HCH資化能を示した。そこで、L-1株由来キャプチャリング株を、(i) TH-L及びTH-H土壌に接種、(ii) TH-H集積培養液由来の固体画分と混合、(iii) 天然 γ -HCH分解細菌のUT26株、MM-1株、MI1205株、TKS株と混合し、 γ -HCH資化能を獲得した遺伝子受容菌株をスクリーニングした。TKS株とL-1 (pSL53)株を混合した際に、*linA*遺伝子を取得した可能性の高い株が得られ、本系の有効性が示唆されたが、環境試料との混合実験では、明確な相補株の取得には至らなかった。

γ -HCH分解遺伝子MVの遺伝情報リザーバーとしての機能

UT26株の γ -HCH資化に必須のABCトランスポーターをコードする*linKLMN*遺伝子を破壊したUT26DLKN株では外膜が異常になり、MVを野生株より多量に産出する可能性が示唆されていた。そこで、UT26株とUT26DLKN株からMVの分離を行った。UT26株、

UT26DLKN株の培養上清を超速心分離した際に生じたペレットをMV画分とした (Fig.8a矢印)。

このMV画分とした黄色のペレットは、UT26株とUT26DLKN株の両方で確認できた。MVの抽出に用いた培養液のOD₆₆₀の値は、UT26株ではUT26DLKN株に比して約1.5倍の値であり、少なくとも菌体総量はUT26株の方が多くと考えられるが、培養上清を超速心して生じたペレット (MV画分) の量は明らかにUT26DLKN株の方が多かった (Fig.8a矢印)。すなわち、UT26DLKN株が野生株よりMVを多く産出するというこれまでの予備的知見と一致する結果が得られた。さらに、本MV画分を密度勾配超速心した結果、UT26DLKN株では4バンドが確認できた (Fig.7b)。UT26株由来のサンプルでは、UT26DLKN株のb3とほぼ同位置に存在するバンドのみが目視で確認できたが、UT26DLKN株のb1、b2、b4と同位置の層も回収した。また、各バンドをそれぞれの回収量の1/10倍量ずつ混合したサンプルを調製し、UT26_AII、UT26DLKN_AIIとして以下の解析に用いた。脂質二重膜に特異的に結合する蛍光色素を用いて、各バンドの脂質量を測定した結果、全てのサンプルで蛍光が観測され、脂質二重膜の存在が確認できた。すなわち、MVは脂質二重膜からなるため、得られたサンプルにMVが存在することが示唆された。UT26DLKN株ではUT26株に比べて全てのバンドで高い脂質量を示した。例えば、UT26DLKN_AIIはUT26_AIIの41倍の脂質量を示した。以上の結果、UT26DLKN株は野生株に比べて多くのMVを放出すると結論した。さらに、UT26DLKN_AIIとUT26_AIIの2サンプルについて、粒度分布測定を行った結果、最大ピークは、UT26DLKN株で99nm、UT26株で95nmであり、最頻粒子の粒子径に顕著な差はなかった。ただし、UT26DLKN株ではUT26株に比べて、127nmのピークが高く、MV画分中で該当粒子径の粒子の割合が高いと予想される。粒子濃度は、UT26DLKN株はUT26株の6倍の値を示し、この結果からもUT26DLKN株が野生株より多くのMVを放出することが支持された。UT26株およびUT26DLKN株のb2、b3、AllサンプルのTEMによる観察を試みたが、b2はサンプル調製が困難で観察できなかった。両株のb3、AllサンプルのTEM観察の結果、全てのサンプルでMVと予想される球状あるいは球状に近い形態の粒子が観察された (Fig.8cd)。また、視野内の粒子数はUT26DLKN株由来のサンプルの方が多く、脂質二重膜の相対定量結果と一致する傾向がみられた。

以上、(i) 調製したMV画分の脂質二重膜定量、(ii) 粒径分布、(iii) TEMによる観察結果から、UT26株およびUT26DLKN株が粒径100~200nm程度のMVを産

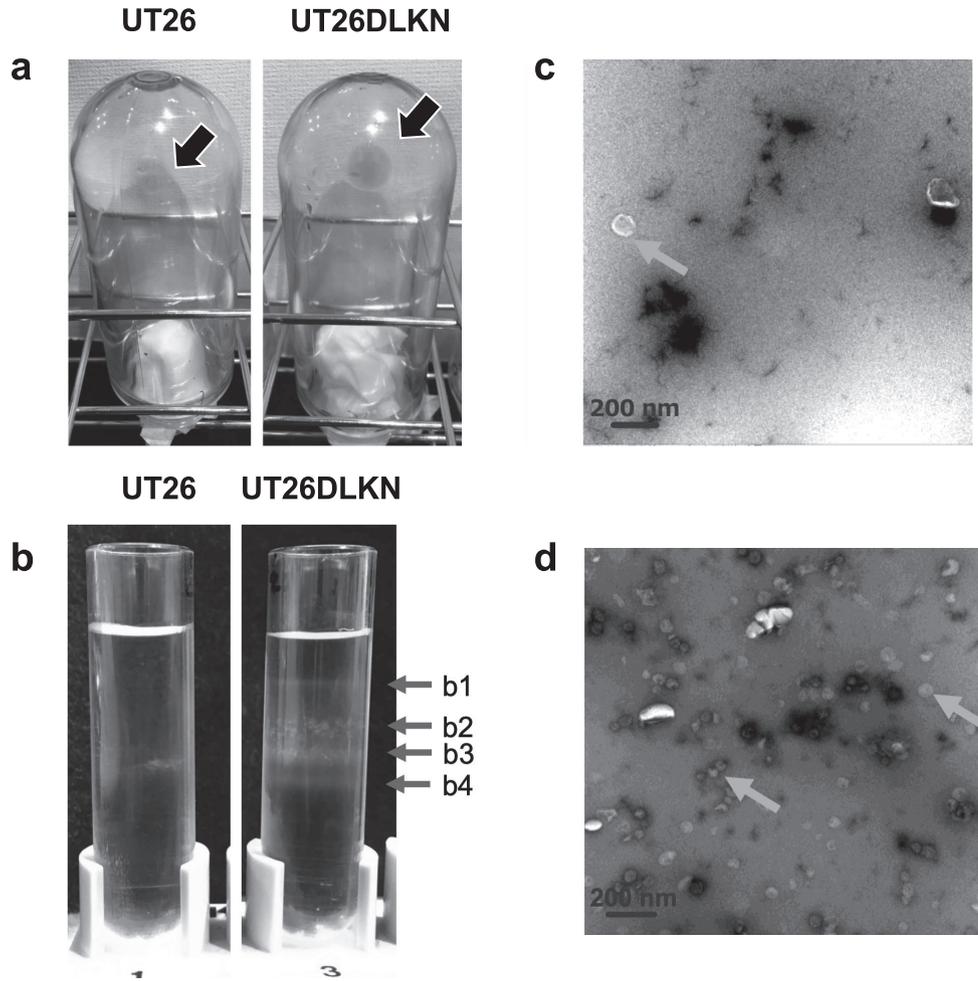


Fig. 8 Purification of membrane vesicles (MV) from UT26 and UT26DLKN. (a) Precipitation of pellets (indicated with arrows) after ultracentrifugation of supernatant of the culture of UT26 (left) and UT26DLKN (right). The pellets including MV were fractionated (indicated with arrows) by density gradient centrifugation (b). MV fractions of UT26 (c) and UT26DLKN (d) were analyzed by TEM.

出すると結論した。これまでにスフィンゴモナッド細菌群のMV産生については、多環芳香族化合物分解菌の *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 株や *Novosphingobium* sp. PP1Y 株で報告されている (De Lise *et al.*, 2019; Yun *et al.*, 2017) が、*Sphingobium* 属あるいは γ -HCH 分解能を有する細菌のMV産生は、本研究で初めて明示した。

UT26 株の γ -HCH 資化に必須の ABC トランスポーターをコードする *linKLMN* を欠損させた UT26DLKN 株では、野生株よりも多量の MV を産生した。 *linKLMN* は、外膜成分を輸送し、細胞膜の integrity (構築と安定性) に関与することが示唆されている (Endo *et al.*, 2007; 各論 3 参照)。 *linKLMN* を破壊した株では、菌体培養上清中にスフィンゴ糖脂質や外膜タンパク質、黄色

色素が多量に漏出する (Endo *et al.*, 2007; Endo *et al.*, unpublished data)。本研究で得られた結果は、これら化合物が MV を介して漏出するという仮説を強く支持するものである。Roier らは、*Haemophilus influenzae* および *Vibrio cholerae* で、リン脂質トランスポーターとして機能する ABC トランスポーター *VacJ/Yrb* 遺伝子を破壊することで MV 放出量が 2-4 倍程度上昇することを報告している (Roier *et al.*, 2016)。ただし、当該遺伝子破壊により外膜の integrity は変化しておらず、MV 放出量の増加は外膜の integrity に由来するものではないと結論付けている。また、*H. influenzae* の $\Delta vacJ$ 株、 $\Delta yrbE$ 株の外膜のリン脂質量は野生株と同程度であるが、MV のリン脂質量は野生株の約 2 倍であった。この結果から、Roier らは「*vacJ* (または *yrbE*) の欠損によって外膜外

葉にリン脂質が蓄積した結果、外膜の blebbing が誘発されリン脂質に富む MV が形成される」と論じている。UT26 株の場合は、*linKLMN* の破壊で細胞膜の integrity が低下することから、MV 放出量の増加は膜の integrity の低下に大きく依存していると推測される。ただし、Roier らが提示したようなメカニズムに起因している可能性もあり、さらなる解析が必要である。

また、UT26 株における生育段階と MV 放出量の関係性についても検討を行った。UT26 株の LB 培地での各生育段階で回収した MV を定量した結果、MV 量は培養時間の経過と共に増加し続け、培養開始から少なくとも 174 時間までは減少しないことが判明した。

UT26 株由来の MV 画分中に *linA* や IS6100 が含まれるか、PCR によって分析した。その結果、*linA* および IS6100 に由来すると推測される増幅産物が確認できた。しかし、この増幅産物が MV-associated DNA (MV に吸着または内包された状態の DNA) 由来なのか、それ以外のフリー DNA 由来なのかは分からない。そこで、フリー DNA を除去するために、MV 画分を DNase 処理し、*linA* 特異的なプライマーを用いた qPCR で、*linA* 遺伝子の存在量を DNase 未処理のサンプルと比較した (Fig.9)。

また、コントロールとして UT26 株のゲノム DNA (gDNA) も同様に DNase 処理し、解析を行った。その結果、gDNA を DNase 処理した場合、少なくとも 40 サイクルでは増幅は確認できず (Fig.9a)、フリー DNA は本条件の DNase 処理で検出限界以下まで分解できることがわかった。一方、MV 画分を同様に DNase 処理した際には、増幅産物が確認された (Fig.9b)。未処理条件と比較して Cq 値が増加しており、DNA がある程度分解されたと考えられるが、60 分間 DNase 処理した際の Cq 値と 1, 2, 5, 10, 30 分間処理をした際の値がほぼ同じだったことから、DNase 処理は十分であると判断した (Fig.9b)。すなわち、フリー DNA が DNase によって完全に分解される条件でも、MV 画分には *linA* を含む DNA が存在し続けることが示された。また、各処理時間の DNase 非添加条件の DNA 量を 100 とすると、DNase 添加条件の DNA の残存量は 0.06-0.08% 程度と見積もられた。

以上、本研究において、MV に吸着もしくは内包された MV-associated DNA には「DNase がアクセスできない状態の DNA」が存在することを示した。本研究は、UT26 株の MV の「遺伝情報の reservoir」としての可能性を検討することを目的としており、DNase がアクセスできない MV-associated DNA から *linA* 遺伝子が検出できたことは、極めて重要な知見である。UT26 株の MV 量は培養時間の経過と共に増加し続けることから、

これに伴い培養液中の「DNase がアクセスできない状態の DNA」の量も MV-associated DNA という形で増え続ける可能性がある。現段階ではそのような DNA が MV の表面に吸着しているのか、MV に内包されているのかは不明であるが、MV 内部に存在する DNA は DNase による分解から保護されることが報告されており (Bitto *et al.*, 2017)、本研究で観察された当該 DNA も MV に内包されている可能性が高い。染色体由来の DNA を内包する MV は、cell lysis を介して生成する (Toyofuku *et al.*, 2019)。また、DNA を内包しない MV は、多くの場合は外膜が blebbing することで生じる OMV である。UT26 株の MV 画分では、全 DNA のうち 0.06-0.08% が分解から保護されると推定されていることから、多くの MV は DNA を内包していないと推察され、UT26 株の主たる MV 形成機構は外膜の blebbing によるものかもしれない。*N. pentaromativorans* US6-1 株の MV

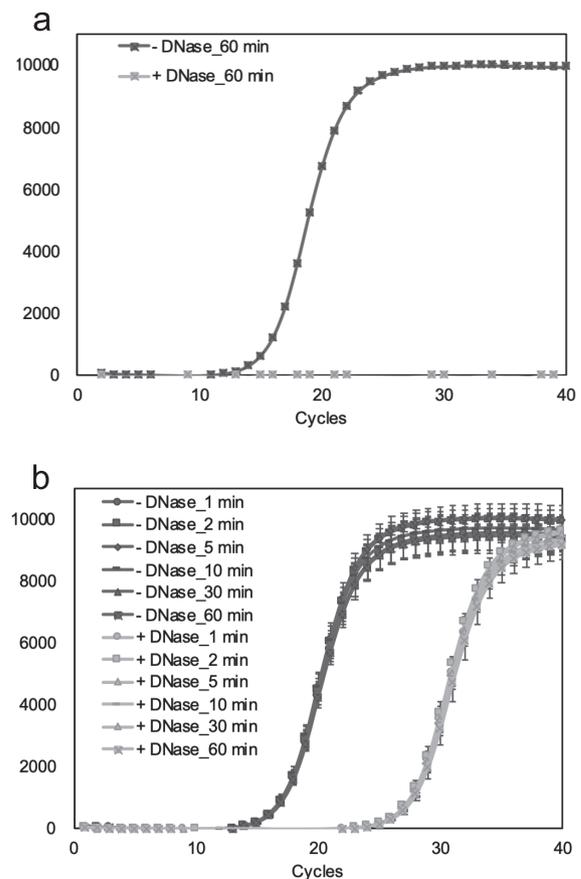


Fig. 9 Membrane vesicle (MV) produced by UT26 has potential as genetic information reservoir. Effect of DNase treatment on abundance of *linA* gene in genomic DNA solution (a) and in membrane vesicle fraction (b) was analyzed by qPCR.

が放出される様子がTEMで観察されており (Yun *et al.*, 2017), 外膜のblebbingによるMV放出が示唆されている。また, MVのDNase処理後に残存するDNA量は, *Shewanella vesiculosa* M7株では85% (Pérez-Cruz *et al.*, 2013), *Salmonella typhimurium* SL1344株では約13%, *Porphyromonas gingivalis* W50株では約15%であった (Bitto *et al.*, 2017で報告されている値を元に概算)。DNAの定量方法やDNase処理の条件が異なるため, 単純な比較はできないが, UT26株ではDNaseから保護されるDNAの割合は, これらと比べて低いようである。

要 約

本研究では, 細菌が人工化合物の分解等で利用する特殊性の高い遺伝子の起源と, 細菌がそれら遺伝子を獲得する機構の解明を目的として, γ -HCH分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26株の土壤環境中でのゲノム進化に関する解析, γ -HCH代謝における鍵反応を触媒する2種類の脱ハロゲン酵素LinAとLinBをコードする遺伝子のキャプチャリング系の構築を実施すると共に, メンブレンベシクル (MV) が遺伝情報リザーバーとしての機能する可能性について検討した。かつてUT26株が単離された土壤を γ -HCHで再汚染化したところ, 菌叢が変化し, メタゲノム中の γ -HCH分解関連遺伝子の割合が増加した。本再汚染化土壤から単離した γ -HCH分解細菌TA15株は, UT26株とゲノムの基本骨格は同一であったが, *lin*遺伝子群の構成と存在様式が異なっていた。さらに, 本株は γ -HCHの代謝バランスの観点から, UT26株に比べて進化型である可能性が示唆された。一方, UT26株ではゲノム中に散在する*linA*から*linF*遺伝子をクラスター化して他のスフィンゴモナッド株に導入することで, 人工的な γ -HCH分解細菌を構築した。さらに, これら人工株や天然株を利用した*linA*と*linB*のキャプチャリング株を構築し, 各種環境試料と混合したが, 遺伝子取得株は得られなかった。UT26株はMVを産生し, γ -HCH資化に必須のABCトランスporter LinKLMN遺伝子破壊株では, 野生株より多量のMVを産出した。さらに, UT26株のMVにはDNaseによる分解を受けにくい*linA*遺伝子が含まれることを示し, MVが遺伝情報リザーバーとして機能する可能性を提示した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表・ポスター発表

- 1) 永田裕二. 2017. 環境汚染物質を食べる細菌から微生物進化を探る～細菌の進化機構の解明と微生物機能開発への応用～日本農芸化学会東北支部シンポジウム「多様な

広がりで魅せる微生物研究」(6月24日, 弘前)

- 2) 永田裕二. 2018. 高度難分解性環境汚染物質分解細菌から微生物進化を探る. 日本農芸化学会2018年度大会(3月15-18日, 名古屋)シンポジウム「微生物の多様性—IFO寄付講座10年の歩み」
- 3) 蘇立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 代謝酵素遺伝子群の人工クラスターを利用した有機塩素系殺虫剤資化細菌の育種. 日本農芸化学会2018年度大会(3月15-18日, 名古屋)
- 4) 永田裕二. 人為起源環境汚染物質分解微生物から進化に迫る. 2018. 東北大学大学院生命科学研究科改組記念講演会(7月4日, 仙台)
- 5) Su, L., Kato, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. 2018. 人工クラスターによる高効率有機塩素系殺虫剤資化菌の構築 Construction of Efficient Organochlorine Pesticide Degraders by Using an Artificial Gene Cluster. 日本微生物生態学会第31回大会(7月11-13日, 沖縄)
- 6) 永田裕二. 2018. 環境浄化で活躍する微生物. Visionary 農芸化学100シンポジウム・「微生物と私たちの健康・暮らし・環境 ～世界に誇る日本の微生物研究～」(12月15日, 仙台)
- 7) 永田裕二. 2019. 細菌の進化機構の理解と環境浄化への応用. 社会にインパクトある研究F-1「生命の奇跡のプロセスに学ぶイノベーション」キックオフシンポジウム(2月22日, 仙台)
- 8) 蘇立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 人工汚染化土壤からの有機塩素系殺虫剤分解酵素遺伝子取得の試み. 日本農芸化学会2019年度大会(3月24-27日, 東京)
- 9) 蘇立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 人工の代謝酵素遺伝子クラスターを利用した高機能有機塩素系殺虫剤資化細菌の育種. 日本微生物生態学会第33回大会(9月10-13日, 甲府)
- 10) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2020. キャピラリーシーケンサーとTraceViewerを用いたDNA解析のススメ. 第14回日本ゲノム微生物学会年会(3月6-8日, 名古屋)
- 11) 蘇立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2020. 有機塩素系殺虫剤分解酵素遺伝子取得のための人工キャプチャリング株の構築. 第14回日本ゲノム微生物学会年会(3月6-8日, 名古屋)
- 12) 蘇立俊, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2020. 人工遺伝子クラスターを利用した有機塩素系殺虫剤分解酵素遺伝子キャプチャリング株の作製. 日本農芸化学会2020年度大会(3月25-28日, 福岡)
- 13) 鈴木達也, 相馬隆光, 加藤広海, 豊福雅典, 野村暢彦, 永田裕二. 2021. 有機塩素系殺虫剤分解能を持つスフィンゴモナッド細菌株のmembrane vesicle形成とvesicleが有するDNA. 日本農芸化学会2021年度大会(3月18-21日, オンライン)
- 14) 勝保奈実, 田中彩美, 加藤広海, 永田裕二. 2021. 土壤環境中での γ -HCH分解細菌の多様性と進化. 微生物生態学会34回大会(10月31日-11月2日, オンライン)
- 15) 加藤広海, 勝保奈実, 永田裕二. 2021. メタゲノムから見た土壤環境の分解細菌の多様性. 微生物生態学会34回大会(10月31日-11月2日, オンライン)
- 16) Kato, H., Suzuki, T., Ishihara, T., Soma, T., Toyofuku, M., Nomura, N. & Nagata, Y. 2021. Membrane vesicle production and vesicle-related DNA of sphingomonad strain capable of

degrading organochlorine pesticide. EMBO Workshop Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (November 23-26, Tsukuba-online, hybrid)

- 17) 勝保奈実, 蘇立俊, 田中彩美, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. 土壌環境中での γ -HCH分解細菌の多様性と進化. 第16回日本ゲノム微生物学会年会 (3月2-4日, オンライン)
- 18) 石原知行, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. 有機塩素系殺虫剤分解細菌が産生するmembrane vesicleに含まれるDNA. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)

原著論文

- 1) Kato H., Su L., Tanaka A., Katsu H., Ohtsubo Y., Otsuka S., Kenoo K., Nagata Y. 2022. Genome evolution related to γ -hexachlorocyclohexane metabolic function in the soil microbial population. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**: 800-809.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Nagata Y., Kato H., Ohtsubo, Y. & Tsuda M. 2019. Mobile genetic elements involved in the evolution of bacteria that degrade recalcitrant xenobiotic compounds, Chapter 9. pp 215-244. In Nishida H and Oshima T (ed), *DNA Traffic in the Environment*. Springer
- 2) Nagata Y., Kato H., Ohtsubo, Y. & Tsuda M. 2019. Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **11**: 630-644.
- 3) Ohtsubo Y., Hirose Y. & Nagata Y. 2022. Algorithms used for in silico finishing of bacterial genomes based on short-read assemblage implemented in GenoFinisher, AceFileViewer, and ShortReadManager. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**: 693-703.

謝 辞

本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また, 本研究の遂行にご協力いただいた東北大学大学院生命科学科の学生諸氏に感謝の意を表します。また, 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (永田裕二 19H02865), 挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877) の支援にも感謝致します。

文 献

Agnelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M. T., Pietramellara, G. & Nannipieri, P. (2007). Purification and isotopic signatures (delta C-13, delta N-15, Delta C-14) of soil extracellular DNA. *Biol Fertil Soil* **44**: 353-361.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.

Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J. & Nilsson, R. H. (2015). metaxa2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Mol Eco Res* **15**: 1403-1414.

Bitto, N. J., Chapman, R., Pidot, S., *et al.* (2017). Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep* **7**.

Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Meth* **12**: 59-60.

De Lise, F., Mensitieri, F., Rusciano, G., *et al.* (2019). *Novosphingobium* sp. PP1Y as a novel source of outer membrane vesicles. *J Microbiol* **57**: 498-508.

Endo, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2007). Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for utilization of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. *J Bacteriol* **189**: 3712-3720.

Fong, K. P. Y., Goh, C. B. H. & Tan, H. M. (2000). The genes for benzene catabolism in *Pseudomonas putida* ML2 are flanked by two copies of the insertion element IS1489, forming a class-I-type catabolic transposon, Tn5542. *Plasmid* **43**: 103-110.

Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A. & Castro-Escarpull, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* **18**: 425-432.

Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989). Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric Biol Chem* **53**: 2015-2017.

Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology* **166**: 531-545.

Kaczmarczyk, A., Vorholt, J. A. & Francez-Charlot, A. (2012). Markerless gene deletion system for sphingomonads. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3774-3777.

Kaczmarczyk, A., Vorholt, J. A. & Francez-Charlot, A. (2013). Cumate-inducible gene expression system for sphingomonads and other *Alphaproteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 6795-6802.

Kato, H., Mori, H., Maruyama, F., *et al.* (2015). Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res* **22**: 413-424.

Kato, H., Su, L., Tanaka, A., Katsu, H., Ohtsubo, Y., Otsuka, S., Senoo, K. & Nagata, Y. (2022). Genome evolution related to gamma-hexachlorocyclohexane metabolic function in the soil microbial population. *Biosci Biotechnol Biochem* **86**: 800-809.

Kawahara, K., Matsuura, M. & Danbara, H. (1990). Chemical structure and biological activity of lipooligosaccharide isolated from *Sphingomonas paucimobilis*, a gram-negative bacterium lacking usual lipopolysaccharide. *Jpn J Med Sci Biol* **43**: 250.

Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.

Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., *et al.* (2010). Biochemistry of

- microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 58-80.
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., *et al.* (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol Biochem* **39**: 2977-2991.
- McGowan, C., Fulthorpe, R., Wright, A. & Tiedje, J. M. (1998). Evidence for interspecies gene transfer in the evolution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degraders. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4089-4092.
- Miyauchi, K., Lee, H. S., Fukuda, M., Takagi, M. & Nagata, Y. (2002). Cloning and characterization of linR, involved in regulation of the downstream pathway for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1803-1807.
- Miyazaki, R., Sato, Y., Ito, M., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2006). Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid, pLB1, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6923-6933.
- Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993a). Purification and characterization of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1582-1583.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993b). Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* **175**: 6403-6410.
- Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansorgova, A. & Takagi, M. (1997). Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3707-3710.
- Nagata, Y., Futamura, A., Miyauchi, K. & Takagi, M. (1999). Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J Bacteriol* **181**: 5409-5413.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 741-752.
- Nagata, Y., Natsui, S., Endo, R., *et al.* (2011). Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme Microb Technol* **49**: 499-508.
- Nagata, Y., Senbongi, J., Ishibashi, Y., Sudo, R., Miyakoshi, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2014). Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **160**: 883-891.
- Nagata, Y., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2015). Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 9865-9881.
- Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ Microbiol Rep* **11**: 630-644.
- Nagayama, H., Sugawara, T., Endo, R., Ono, A., Kato, H., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2015). Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 4453-4470.
- Nagler, M., Insam, H., Pietramellara, G. & Ascher-Jenull, J. (2018). Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 6343-6356.
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* **6**: 37-53.
- Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2010). Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genes induced in soil environment by *in vivo* expression technology. *Environ Microbiol* **12**: 2539-2558.
- Nishiyama, E., Ohtsubo, Y., Yamamoto, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2012). Pivotal role of anthranilate dioxygenase genes in the adaptation of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 in soil. *FEMS Microbiol Lett* **330**: 46-55.
- Ohtsubo, Y., Ikeda-Ohtsubo, W., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2008). GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC Bioinformatics* **9**: 376.
- Okai, M., Kubota, K., Fukuda, M., Nagata, Y., Nagata, K. & Tanokura, M. (2010). Crystal structure of gamma-hexachlorocyclohexane Dehydrochlorinase LinA from *Sphingobium japonicum* UT26. *J Mol Biol* **403**: 260-269.
- Perez-Cruz, C., Carrion, O., Delgado, L., Martinez, G., Lopez-Iglesias, C. & Mercade, E. (2013). New type of outer membrane vesicle produced by the gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7(T): implications for DNA content. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1874-1881.
- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., *et al.* (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Com* **7**: 10515.
- Rumbo, C., Fernandez-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F. & Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Anti Ager Chem* **55**: 3084-3090.
- Sangwan, N., Lata, P., Dwivedi, V., *et al.* (2012). Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels. *PLoS One* **7**: e46219.
- Sangwan, N., Verma, H., Kumar, R., Negi, V., Lax, S., Khurana, P., Khurana, J. P., Gilbert, J. A. & Lal, R. (2014). Reconstructing an ancestral genotype of two hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingobium* species using metagenomic sequence data. *ISME J* **8**: 398-408.
- Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Rev Microbiol* **13**: 605-619.
- Senoo, K. & Wada, H. (1989). Isolation and identification of an aerobic gamma-HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci Plant Nutr* **35**: 79-87.
- Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-de-

- grading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 793-811.
- Tabata, M., Ohhata, S., Nikawadori, Y., *et al.* (2016). Comparison of the complete genome sequences of four gamma-hexachloro-cyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res* **23**: 581-599.
- Top, E. M., Maltseva, O. V. & Forney, L. J. (1996). Capture of a catabolic plasmid that encodes only 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alpha-ketoglutaric acid dioxygenase (TfdA) by genetic complementation. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2470-2476.
- Top, E. M., Springael, D. & Boon, N. (2002). Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 199-208.
- Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Rev Microbiol* **17**: 13-24.
- Tsuda, M., Tan, H. M., Nishi, A. & Furukawa, K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. *J Biosci Bioeng* **87**: 401-410.
- Vorkapic, D., Pressler, K. & Schild, S. (2016). Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Curr Genet* **62**: 71-79.
- Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W. & van Beilen, J. B. (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus strains* Q15 and NRRL B-16531. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5933-5942.
- Yun, S. H., Lee, S. Y., Choi, C. W., *et al.* (2017). Proteomic characterization of the outer membrane vesicle of the halophilic marine bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *Journal of Microbiology* **55**: 56-62.

略語一覧

- ABC transporter: ATP-binding cassette transporter
CFU: colony forming unit
2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DCP: dichlorophenol
ECD: electron capture detector
GC: gas chromatography
HCH: hexachlorocyclohexane
HLD: haloalkane dehalogenase
MGE: mobile genetic element
MV: membrane vesicle
POPs: persistent organic pollutants
TCB: trichlorobenzene
TEM: transmission electron microscope

脱ハロゲン酵素の機能進化

佐藤 優花里, 永田 裕二

東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Functional evolution of dehalogenases

Yukari Sato, Yuji Nagata

Laboratory of Microbial Evolution and Function Research,
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980,-8577

To gain insight into functional evolution of dehalogenases, we conducted researches related to two dehalogenases, LinA and LinB, which catalyze key reactions in bacterial γ -HCH-degradation. We found that a unique dehydrochlorinase LinA has the activity to convert not only HCH-related substances but also DDT, a notorious environmental pollutant. On the other hand, we constructed γ -HCH-degrader-derived strains in which the *linB* gene was replaced with other HLDs or HLD homologues, and demonstrated that HLDs other than LinB can also be involved in γ -HCH metabolism. Furthermore, we constructed an experimental evolution system and successfully obtained evolved enzymes with improved functions related to γ -HCH metabolism. In addition, we discovered a novel HLD that exists in fusion with an enzyme with tRNA-specific deaminase activity, which is important for normal growth. This enzyme also has novel substrate specificity as an HLD. In conclusion, we demonstrated the high potential of dehalogenases and their usefulness as materials for functional development.

Key words: dehalogenase, γ -hexachlorocyclohexane, DDT, tRNA-specific deaminase, evolution

緒言

脱ハロゲン酵素は、有機ハロゲン系化合物の分解の鍵となる酵素であり、有機ハロゲン系化合物が環境汚染物質や工業副産物など、主要な有害物質グループのひとつであることから、応用的な観点から極めて重要な酵素である (Fetzner, 1998)。また、様々な人工的に合成された有機ハロゲン化合物が存在することから、それらに直接アタックする脱ハロゲン酵素は、酵素の起源や進化、構造-機能相関関係の研究にも適した研究材料である (Nagata *et al.*, 2016)。実際、様々な反応機構の異なる脱ハロゲン酵素が知られている。一分子に塩素を6個含む有機塩素系殺虫剤 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン (γ -HCH) 細菌の分解代謝系には、脱塩化水素酵素

LinA、加水分解的脱ハロゲン酵素でハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) の一員である LinB、グルタチオン依存的な還元的脱ハロゲン酵素 LinD の3種の脱ハロゲン酵素に加えて、反応の過程で脱ハロゲンを伴う酸素添加酵素 LinE と、基質によっては脱ハロゲンを伴う還元酵素 LinF の2種の広義の脱ハロゲン酵素も加えると、実に5種類の反応機構の異なる脱ハロゲン酵素が関与している (Fig.1) (Nagata *et al.*, 2007)。

このうち、本研究では、類似酵素が知られていないユニークな脱塩化水素酵素 LinA (Imai *et al.*, 1991; Nagata *et al.*, 1993a; Nagata *et al.*, 2016) と、多くの類似酵素が知られており、構造-機能相関の研究に適した HLD の一員である LinB (Nagata *et al.*, 1993b; Nagata *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 2015; Nagata *et al.*, 2016) に注目した。

γ -HCH の初発分解反応を触媒する脱塩化水素酵素 LinA は、コードする遺伝子の起源が不明だけでなく、酵素自体も、類似酵素の報告例のない極めてユニークな酵素である (Nagata *et al.*, 1993a; Nagata *et al.*, 2016)。立体構造モデルから、類似の立体構造を持つタンパク質の存

E-mail: aynaga@ige.tohoku.ac.jp
共同研究者: Jiri Damborsky (Masaryk University).
Zbynek Prokop (Masaryk University).
宮内 啓介 (東北学院大学).

に解かれている、などの理由により、酵素の構造-機能相関の研究に最も適した材料のひとつとなっている (Nagata *et al.*, 2015). 広い基質域を持つ本酵素は、応用面でも注目されている (Nagata *et al.*, 2015). まず、有機塩素系農薬などの様々なハロアルカン系環境汚染物質の分解に応用可能で、本酵素活性を有する細菌細胞を固定化させたバイオリクターが欧州では実用化されている。また、有用物質の化学合成の際に生じる反応副産物の除去や、毒ガス (マスタードガス) の分解への応用も可能である。さらに、脱ハロゲン反応により酸が生じることを利用して、pH メーターと本酵素を組み合わせ、ハロゲン系物質による汚染を感知するためのバイオセンサーとしての利用も検討されている。一方、アルキル中間体を加水分解できない変異酵素を目的のタンパク質と融合させ、長鎖アルカン系の蛍光物質を咬ませることによりそのタンパク質の局在を明らかにする真核細胞用の分子生物学ツールとしても用いられるなど、用途は様々である。このような応用面を考えても、本酵素の反応機構の詳細および構造-機能相関を明らかにすることは重要である。また、HLD ホモログが全ゲノム配列が解読された根粒菌や結核菌およびその類縁菌などに比較的広く分布していることが明らかになり、その生理的意義や酵素進化の観点からも興味を持たれている (Nagata *et al.*, 2015). HLD は一般に基質特異性が広く、また、数アミノ酸残基の違いで反応特性が大きく変わる (Moriuchi *et al.*, 2014) ことから、多くの細菌が、「何者にもなり得る潜在的な機能」として HLD ホモログを有している可能性も考えられる。

実験方法

HLD の実験進化系の構築と進化型 HLD の取得

Sphingobium japonicum UT26 株由来の株の培養には、完全培地として 1/3LB 培地 (Inaba *et al.*, 2020)、無機塩培地として W 培地 (Imai *et al.*, 1989) を使用し、炭素源としてグルコースを 0.2%、 γ -HCH を 750mg/L となるように加えた。大腸菌の培養には LB 培地を用い、適宜抗生物質を添加した。固体培地には、寒天を 1.5% となるように加えた。UT26 由来株は 30°C、大腸菌は 37°C で培養した。菌株を長期保存する場合には、15% のグリセロールを添加し、-80°C で保存した。DNA 操作、PCR、DNA 塩基配列決定、エレクトロポレーション等は常法に従った (Sambrook *et al.*, 1989)。

linB 完全欠失株の作製には pK18mobsacB (Schweizer *et al.*, 1992) を、各種 HLD および HLD ホモログ遺伝子の導入には pAK405 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012) を用い、相同組換えにより行った。 γ -HCH 分解活性の評価には

176mM の γ -HCH を含む W 培地をアッセイ溶液として、分析は検出器として ECD を装備したガスクロマトグラフィ (GC) を用いた。 γ -HCH 資化能は、菌体を湿重量 100、10、1mg/mL となるように調整した菌液を W- γ -HCH 固体培地に 10 μ L ずつスポットし、30°C で 5 日以上培養して評価した (スポットアッセイ)。

UT26 由来株にプラスミドで遺伝子を導入する場合は、広宿主域プラスミド pBBR1-MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) を用いた。遺伝子へのランダム変異の導入は Taq DNA ポリメラーゼを用いた error-prone PCR を行い、Mn⁺ 濃度 (0.2~0.3%) で変異導入率を調整した。ランダムに変異を導入した PCR 増幅産物は、pBBR1-MCS-5 を元に作製した pBBR5TP にクローニングし、*E. coli* DH5 α 株に変異型酵素遺伝子ライブラリーを構築した。本ライブラリーから抽出したプラスミドを UT26 株由来の *linB* 完全欠失株である UT26DB2 株にエレクトロポレーションで導入し、*Sphingobium* 株のライブラリーとした。本ライブラリーを W- γ -HCH 固体培地に塗布し、30°C で培養後、良好に生育するクローンを選択した。

タンパク質の発現には、発現用プラスミド pET22b(+) と *E. coli* BL21StarTM (DE3) 株を用いた。目的酵素の発現誘導を確認後、目的酵素が有する His タグを用いてアフィニティ精製を行った。精製酵素の γ -HCH 代謝における LinB 活性は、精製した LinA の共存下で γ -HCH と反応させ、代謝産物を GC (ECD) で解析して評価した。1,3-ジプロモプロパンに対する HLD 活性は、チオシアン酸第二水銀比色定量法 (Iwasaki *et al.*, 1952) により、遊離ハロゲンイオン濃度を定量することで評価した。

PCB/biphenyl 分解細菌が有する新規 HLD

Acidovorax sp. KKS102 由来株は、1/3LB 培地 (Inaba *et al.*, 2020) を用いて 30°C で培養した。DNA 操作、PCR、DNA 塩基配列決定、エレクトロポレーション等は常法に従った (Sambrook *et al.*, 1989)。大腸菌の培養には LB 培地を用い、適宜抗生物質を添加した。固体培地には、寒天を 1.5% となるように加えた。KKS102 株の *dahX* 破壊株は、*dahX* 遺伝子の内部のほぼ全域をカナマイシン耐性遺伝子で置換した DNA 断片を KKS102 株に導入し、相同組換えを誘発することで作製した。

タンパク質の発現には、pET22b(+) と *E. coli* BL21StarTM (DE3) 株を用い、His タグを利用してアフィニティ精製を行った。1,3-ジプロモプロパンに対する HLD 活性は、チオシアン酸第二水銀比色定量法 (Iwasaki *et al.*, 1952) により、遊離ハロゲンイオン濃度を定量することで評価した。HLD 活性の 1U は 37°C で毎分 1 μ mol のハロゲンイオンを遊離する酵素量と定義した。27 種類の基質に対する基質特異性の検討は、共同研究者の Masaryk 大

学の Zbynek Prokop 教授と Jiri Damborsky 教授により、マイクロ流路を利用したハイスループットの手法 (Buryska *et al.*, 2019) で実施された。

tRNA-specific deaminase 活性は、PCR 増幅・精製した DNA を鋳型として、*in vitro* 転写反応で合成した tRNA^{Arg}_{A₃₄}CG を用いて、反応産物の塩基配列をサンガー法で解読することで評価した。tRNA^{Arg}_{A₃₄}CG の編集レベルは、シーケンスクロマトグラムから測定した A/G 頂高比 (A/G peak height ratio) により見積もり (Jepson & Reenan, 2007), G のみ観察された場合を 100%, A のみ観察された場合を 0% とした。

LinA による DDT の分解

タンパク質の発現には、pET22b(+) と *E. coli* BL21StarTM (DE3) 株を用いた。目的酵素の発現誘導を確認後、目的酵素が有する His タグを用いてアフィニティ精製を行った。

Sphingobium japonicum UT26 株由来の株の培養には、1/3LB 培地 (Inaba *et al.*, 2020) を用い、プラスミドで遺伝子を導入する場合は、広宿主域プラスミド pBBR1-MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) を用いた。

DDT 分解活性は、10mg/L の DDT を含むアッセイ溶液と試料を混合し、代謝産物を GC (ECD) で解析して評価した。

結果と考察

HLD の実験進化系の構築と進化型 HLD の取得

HLD は一般に基質特異性が広く、数アミノ酸残基の違いで反応特性が大きく変わる (Moriuchi *et al.*, 2014; Nagata *et al.*, 2015) から、多くの細菌に見出される HLD ホモログは、特定の機能に特化した酵素ではなく、環境変動に応じて「何者にもなり得る潜在的な機能」として働いている可能性が考えられる。また、 γ -HCH 代謝経路において HLD が利用されるが、既知の γ -HCH 分解菌で利用されている HLD は LinB のみである (Tabata *et al.*, 2016; Nagata *et al.*, 2019)。そこで、本研究では、(i) LinB 以外の HLD も γ -HCH 代謝に関与し得るのではないか、(ii) LinB 以外の HLD が γ -HCH 代謝に適応・進化していく過程を実験室で追跡することが可能なのではないか、という仮説を立て、それらの検証を行った。

UT26 株の *linB* 遺伝子をマーカーレスで完全欠失させた UTDB2 株を作製した。本株の *linB* が存在した部位に LinB 以外の HLD および HLD ホモログ遺伝子を導入した株を作製した。用いた HLD および HLD ホモログ遺伝子の系統関係を Fig.2 に示す。

具体的には、*Sphingobium* sp. MI1205 株由来の LinB_{MI} (Ito *et al.*, 2007)、根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum*

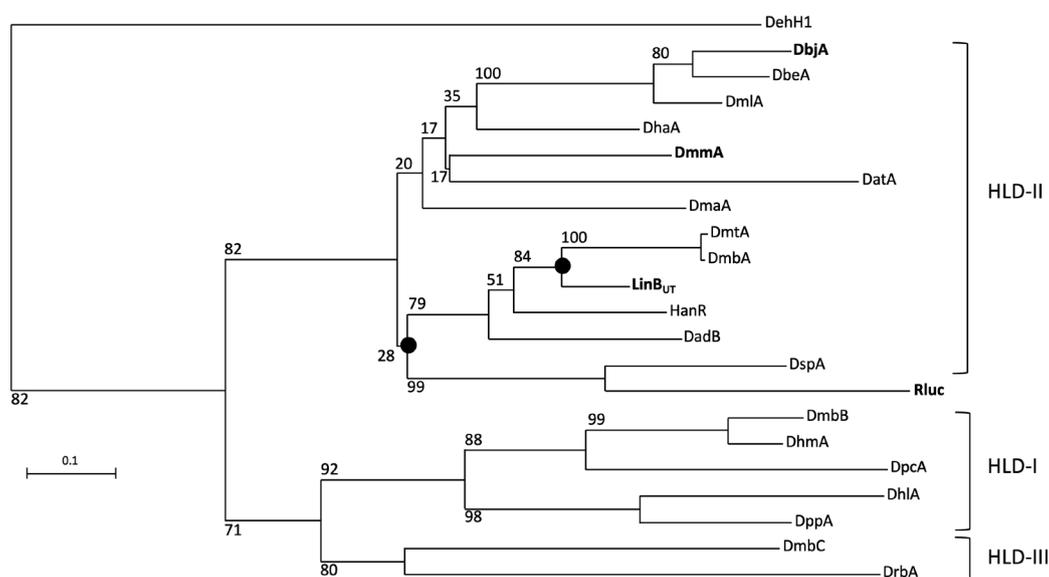


Fig. 2 Phylogenetic tree of HLDs (Nagata *et al.* 2015). A neighbor-joining phylogenetic tree of the conserved sites in 20 biochemically characterized HLDs and Renilla-luciferin 2-monooxygenase (Rluc) was constructed using the program MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) and visualized by Njplot software. Haloacetate dehalogenase (DehH1) from *Moraxella* sp. B was used as an out-of group sequence. Bootstrap values calculated from 1,000 resamplings using neighbor-joining are shown at the respective nodes. The length of lines reflects the relative evolutionary distances among the sequences. Enzymes used in this study are bolded. Phylogenetic positions of ancestral proteins used in this study are shown by black dot.

USDA110 株由来の DbjA (Sato *et al.*, 2005), マリンメタゲノム由来の DmmA (Gehret *et al.*, 2012), 結核菌 *Mycobacterium* 由来の HLD である DmbA (Jesenska *et al.*, 2005) と LinB の推定先祖型酵素 DmbA_anc, ウミシイタケ *Renilla reniformis* 由来の *Renilla-luciferin* 2-monooxygenase である Rluc (Lorenz *et al.*, 1991), および, Rluc と LinB の推定先祖型酵素 Rluc_anc (Chaloupkova *et al.*, 2019) とその作製の過程で1アミノ酸残基の変異 (R7P) が生じた Rluc_ancM をそれぞれコードする遺伝子である. LinB_{MI} は, UT26 株由来の LinB_{UT} と 296 アミノ酸残基中 7 アミノ酸残基異なり (98% identical), β -HCH に対しては LinB_{UT} より顕著に強い活性を示すが, γ -HCH 代謝においては同等の機能を有する (Ito *et al.*, 2007). DbjA は嵩高い基質を好み (Sato *et al.*, 2005), DmmA は既知 HLD で最も広い基質特異性を有する (Gehret *et al.*, 2012) ことから, LinB 活性を有する可能性が期待された. また, DmbA_anc と

Rluc_anc は, 人工的にデザインした推定先祖型酵素である (Chaloupkova *et al.*, 2019) が, 系統的に LinB に近いことから, LinB 活性を有する可能性が高く, 活性を示さなかった場合でも, LinB 型への変化が比較的容易に起こると期待された. なお, Rluc は, アミノ酸配列上は LinB と類縁性が比較的高いが, HLD ではなく, 酸素添加酵素であり, 先祖型酵素 Rluc_anc は両活性を有する (Chaloupkova *et al.*, 2019). 以上, UT26 株の *linB*_{UT} 遺伝子の代わりに, *linB*_{MI}, *dbjA*, *dmmA*, *dmbA_anc*, *rluc*, *rluc_anc*, *rluc_ancM* をそれぞれ有する株を UTBM1, UTBJ1, UTMM1, UTBA1, UTRL1, UTLA1, UTLA2 と命名した.

作製した株について, ポジティブコントロールの UT26 株, ネガティブコントロールの UTDB2 株と共に, γ -HCH 分解活性を GC (ECD) で検討したところ, UT26S 株, UTBM1 株に加えて, UTMM1 株, UTLA1 株, UTLA2 株で, 2,5-DCHQ が検出された (Fig.3A).

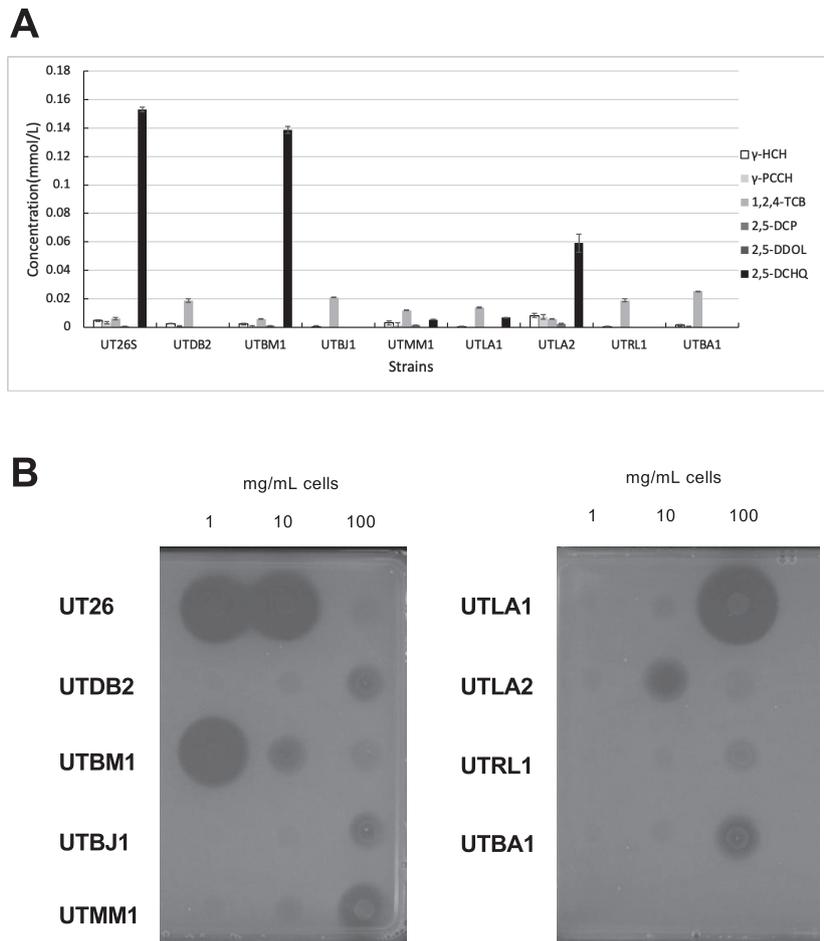


Fig. 3 Characterization of the *linB*-replacement strains. (A) Metabolites of γ -HCH were detected by GC (ECD). (B) γ -HCH utilization activity was estimated by spot assay. Cells were spotted on the *W* _{γ -HCH} medium and incubated for 14 days.

また, UTMM1 株と UTLA2 株では, 2,5-DCP も検出された (Fig.3A). γ -HCH から 2,5-DCP, 2,5-DDOL, 2,5-DCHQ が生じるには LinB 活性が必要であり (Fig.1), DmmA, Rluc_anc, Rluc_ancM は LinB 活性を有することが明らかになった. さらに, これら株の γ -HCH 資化能を 3 種類の濃度 (100, 10, 1mg 湿重量菌体/mL) の菌液を γ -HCH を唯一の炭素源として含む固体培地 (γ -HCH プレート) 上にスポットして培養することで検討した (Fig.3B). 培養 14 日後, UT26, UTBM1 株は菌体濃度 10, 1mg/mL で, γ -HCH 分解の指標であるクリアゾーンを形成し, 明らかに増殖した. 菌体濃度 100mg/mL で増殖しないのは, 菌体濃度が濃く, 高濃度の dead-end 産物を蓄積したためと推測される. これに対して, UTDB2, UTBJ1, UTRL1 株は全ての菌濃度で増殖しなかった. これら株の菌体濃度 100mg/mL で, UT26, UTBM1 株に比べて若干のクリアゾーンが観察されるのは, 菌体濃度は濃い, γ -HCH が分解されないために dead-end 産物も蓄積せず, 接種菌が死滅しないために, LinA の効果で γ -HCH の分解が起こったものと考えられる. また, UTLA2 は, 菌体濃度 10mg/mL で増殖した. さらに, UTMM1, UTLA1, UTBA1 は菌体濃度 100mg/mL で, ネガティブコントロールの UTDB2 株と比べて明らかに大きなクリアゾーンを形成し, 増殖した. 以上の結果は, DmmA, Rluc_anc, Rluc_ancM, DmbA_anc が, LinB_{UT}, LinB_{MI} ほどではないものの, 弱い LinB 活性を有していることを示している. なお, スポットアッセイの結果は代表的な例を示すが, 数回行った実験で, 同じ傾向を示した.

これら *linB* 置換株について, γ -HCH プレートに塗布し, 元の株より良好に生育するクローンを選択する方法

で進化型 HLD を取得する *in vivo* 実験進化系 (Fig.4上) を試みたところ, 元の株より良好にコロニー形成するクローンが得られた.

しかし, 当該クローンの HLD 遺伝子に変異は入っておらず, HLD 遺伝子以外の比較的起こりやすい変異が良好にコロニー形成する要因となっていると考えられたため, 本系でのスクリーニングは中止し, *in vitro* で変異を導入した HLD 遺伝子を UTDB2 株に導入し, γ -HCH プレートで良好に生育するクローンを選択する *in vitro* 実験進化系 (Fig.4下) を試みた. 上記各遺伝子を鋳型とした error-prone PCR でランダムに変異を導入し, それぞれ 1,000 クローン弱からなる HLD 遺伝子変異ライブラリーを大腸菌中に作製した. ランダムに抽出した各 20 程度のクローンの解析により, 全てのライブラリーで半数以上のクローンに変異が入っていることを確認した. 変異導入率は 0.2~0.4% 程度であった. これらライブラリーを UTDB2 株に導入し, γ -HCH プレート上で良好に生育するクローンを選択した. 次に, それらクローンより抽出した HLD 遺伝子を有するプラスミドを UTDB2 株に再導入し, これら株が変異導入前の遺伝子を持つ株より良好に生育することが確認できたものについて, シーケンス解析により変異部位を同定した. Rluc は monooxygenase であり, HLD 活性を示さないが, わずか 3 箇所の変異 (E132D, E151G, E211G) を持つ Rluc-43 が LinB 活性を示す可能性があることは大変興味深い. さらに, 8 つの候補遺伝子 (*linB*_{UT}-52, *linB*_{MI}-45, *linB*_{MI}-63, *rluc*-43, *rluc_anc*-4, *rluc_anc*-8, *dmbA_anc*-3, *dmbA_anc*-5) について, 同様の変異導入とスクリーニングにより第 2 次スクリーニングを実施した. その結果, *rluc_anc*-8 由来の 12 の候補遺伝子を取得した. 次に, 第

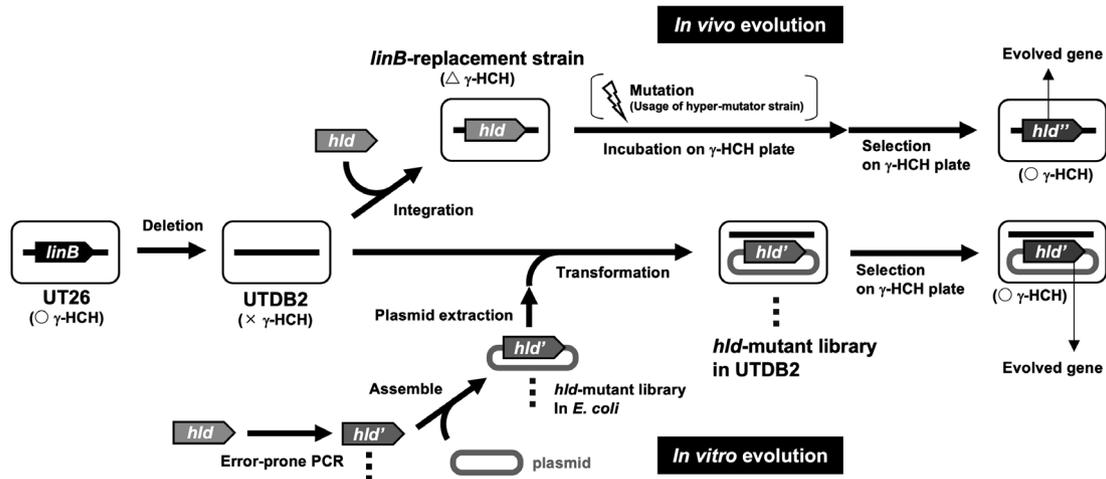


Fig.4 Strategy for experimental evolution of HLD and its related proteins toward γ -HCH utilization.

1次、第2次スクリーニングでそれぞれ得られた8個と、12個、合計20種の酵素を大腸菌で発現して精製し、活性の評価を行った。まず、一般的にHLDの良い基質である1,3-ジプロモプロパンに対する活性をチオシアン酸第二水銀比色定量法で遊離塩素イオン濃度を定量し、評価したところ、進化型酵素は概して先祖型酵素より高いHLD活性を示した。次に、 γ -HCH代謝系におけるLinB活性を評価した。 γ -HCH代謝系におけるLinBの基質は化学的に不安定で試薬として調製できないため (Fig.1)、精製したLinAとの共存下で、 γ -HCHから生じる2,5-DCPおよび2,5-DDOLの量でLinB活性を評価した。Rluc_anc, Rluc_anc-8, Rluc_anc-8-6, Rluc_anc-8-37の当該活性を比較した結果をFig.5に示す。

得られた進化型酵素は、いずれも先祖型のRluc_ancより、2,5-DCP, 2,5-DDOLを蓄積した。さらに、第1次スクリーニングで得られた進化型酵素であるRluc_anc-8

は、2,5-DDOLより2,5-DCPの蓄積量が多いのに対して、第2次スクリーニングで得られた進化型酵素であるRluc_anc-8-6とRluc_anc-8-37は、2,5-DCPより2,5-DDOLの蓄積量の方が多かった。2,5-DCPは細胞に有害なdead-end産物であるのに対して、2,5-DDOLはLinC以下の代謝系を有するUT26株細胞内で炭素源・エネルギー源として資化される (Fig.1) ことを考えると、第2次スクリーニングで、第1次スクリーニングで得られたものより γ -HCH代謝において進化型のHLDが取得できたと考えられる。以上、*in vivo*での生育を指標としたスクリーニングを用いる本実験進化系は良好に機能し、 γ -HCH資化に対するHLDの進化過程の一端を観察することができたと結論した。今後、得られた進化型酵素のより詳細な解析で、LinB型の活性の鍵となるアミノ酸残基の機能解明が期待できる。

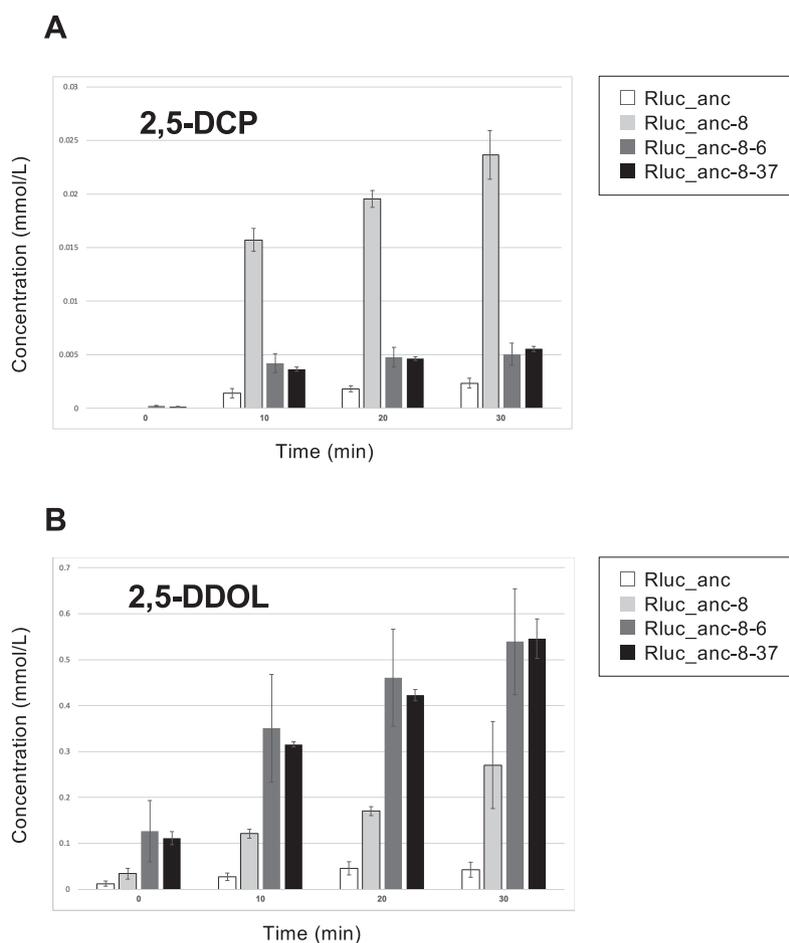


Fig. 5 Characterization of enzymes obtained by the experimental evolution system. The putative evolved enzymes were incubated with LinA and γ -HCH, and metabolites of γ -HCH, 2,5-DCP (A) and 2,5-DDOL (B), were detected by GC(ECD).

PCB/biphenyl 分解細菌が有する新規 HLD

ポリ塩化ビフェニル (PCB) /biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株 (Kimbara *et al.*, 1989) は, *Betaproteobacteria* に属し, 全ゲノム配列も決定されている (Ohtsubo *et al.*, 2012). KKS102 株のゲノム配列に対して, LinB をクエリとして BLAST による相同性検索を行ったところ, アミノ酸レベルで 33% の identity を示すホモログ遺伝子がヒットし, 本遺伝子を *dahX* と命名した. 立体構造と生化学機能が既知のタンパク質から成るデータベースに対して DahX をクエリとして BLAST による相同性検索を行ったところ, 2 種類の領域が存在していた. N 末端側 (CDA 領域) は *Escherichia coli* K12 株の tRNA adenosine deaminase (TadA) (Wolf *et al.*, 2002) と最も高い identity (52%) を示した. TadA (EC 3.5.4.33) は cytidine deaminase-like superfamily に属する deoxytidylate deaminase-like family に分類される. C 末端側 (HLD 領域) は, *Plesiocystis pacifica* SIR-1 株由来の HLD である DppA と最も高い identity (53%) を示した. 本領域は HLD-I subfamily に属する Dh1A とも有意な identity (48%) を示した. すなわち, DahX は N 末端に TadA と有意な相同性を示す領域が融合した新規 HLD であることが示唆された. このような融合タンパク質ホモログは, KKS102 株が属する *Comamonadaceae* に属する細菌群に見出され, 少なくとも当該細菌群では何らかの生理的意義があり, 保存されているものと考えられる.

TadA は大腸菌において, 生育に必須の因子であり (Wolf *et al.*, 2002), KKS102 株の生育にも重要な因子である可能性が考えられた. そこで, KKS102 株の *dahX* をカナマイシン耐性遺伝子で置換し欠失させた株の作製を試みたところ, 当該株が作製できたため, *dahX* は KKS102 株において生育に必須の因子ではないことが明らかになった. しかし, 30°C の 1/3LB 液体培地で 48 時間培養したところ, 野生型に比べ, 明らかに OD₆₆₀ 値の上昇が遅れが生じた (Fig. 6).

さらに, この生育能の低下は DahX 全域および CDA 領域を発現するプラスミドの導入によって回復したことから (Fig. 6), CDA 領域は, KKS102 株の通常の生育に必須ではないものの, 重要な役割を有していると考えられる. なお, HLD 領域のみを導入したものの生育は回復しなかった (Fig. 6) ことから, 本領域は通常の生育には重要ではないと考えられる.

DahX の HLD 活性について検討した. まず, HLD の一般的な基質である 1,3-ジプロモプロパンを基質として, DahX 及び HLD 領域の HLD 活性を測定したところ, 精製直後の DahX 及び HLD 領域は, 1.88 ± 0.28 U/mg of enzyme 及び 3.20 ± 0.20 U/mg of enzyme の比活性を示し

た. これらの値は, 代表的な HLD である Dh1A, DhaA, LinB と同程度だった. さらに, Masaryk 大学の Zbynek Prokop 教授と Jiri Damborsky 教授に協力を得て, DahX 及び HLD 領域の 27 種類の基質に対する基質特異性を他の HLD とより厳密な比較が可能なシステムを用いて検討した. 得られた結果を, 1-プロモブタンの活性値を 1 とした相対活性に換算した結果を Fig. 7A に示す.

DahX と HLD 領域の基質特異性は, 一部の基質を除いて, ほぼ同様の傾向を示した. DahX は 1-プロモブタンや 1-ヨードブタンをはじめとしたプロモ基やヨード基を有する基質に対して高い特異性を示した. また, DbjA など一部の酵素にしか分解できない難分解性の物質として知られている 1,2-ジクロロプロパンに対して比較的強い活性を示した. 一般に, HLD はアミノ酸配列の相同性により, HLD-I~III の 3 つの subfamily に分類することができ (Fig. 2), DahX の HLD 領域は, 最も identity の高い Dh1A と同じ HLD-I に分類される. しかし, 現時点では HLD のアミノ酸配列と基質特異性の相関は明らかになっていない. そこで, Koudelakova らが提案している SSGs (Substrate Specificity Groups) (Koudelakova *et al.*, 2011) において, DahX 及び HLD 領域がどのグループに属するかを明らかにするため, 本実験で得られた基質特異性の情報に基づき, PCA 解析を行った. その結果, DahX と HLD 領域はいずれも SSG-IV に分類された (Fig. 7B). SSG-IV には, 有機プロモ化合物, 有機ヨウ素化合物の分解に優れる HLD が分類されるが, DahX 及び HLD 領域も同様の性質を示す. なお, SSG-I と SSG-II を決定する場合 2-ヨードブタンに対する特異性

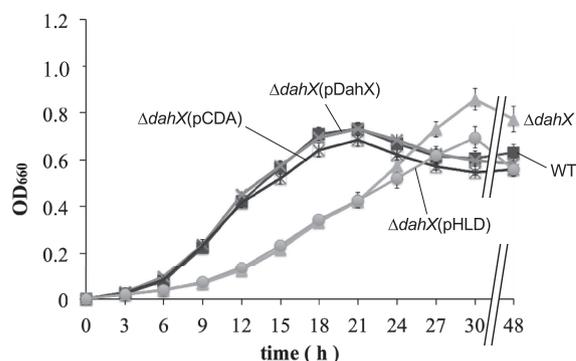


Fig. 6 OD₆₆₀ of cultures of KKS102 (WT) and its derivatives in 1/3LB medium. WT, wild type (■, black); DdahX, *dahX* disruptant (▲, gray); DdahX(pDahX), *dahX* disruptant harboring plasmid carrying *dahX* (×, gray); DdahX(pCDA), *dahX* disruptant harboring plasmid carrying CDA region of *dahX* (×, black); DdahX(pHLD), *dahX* disruptant harboring plasmid carrying HLD region of *dahX* (●, gray).

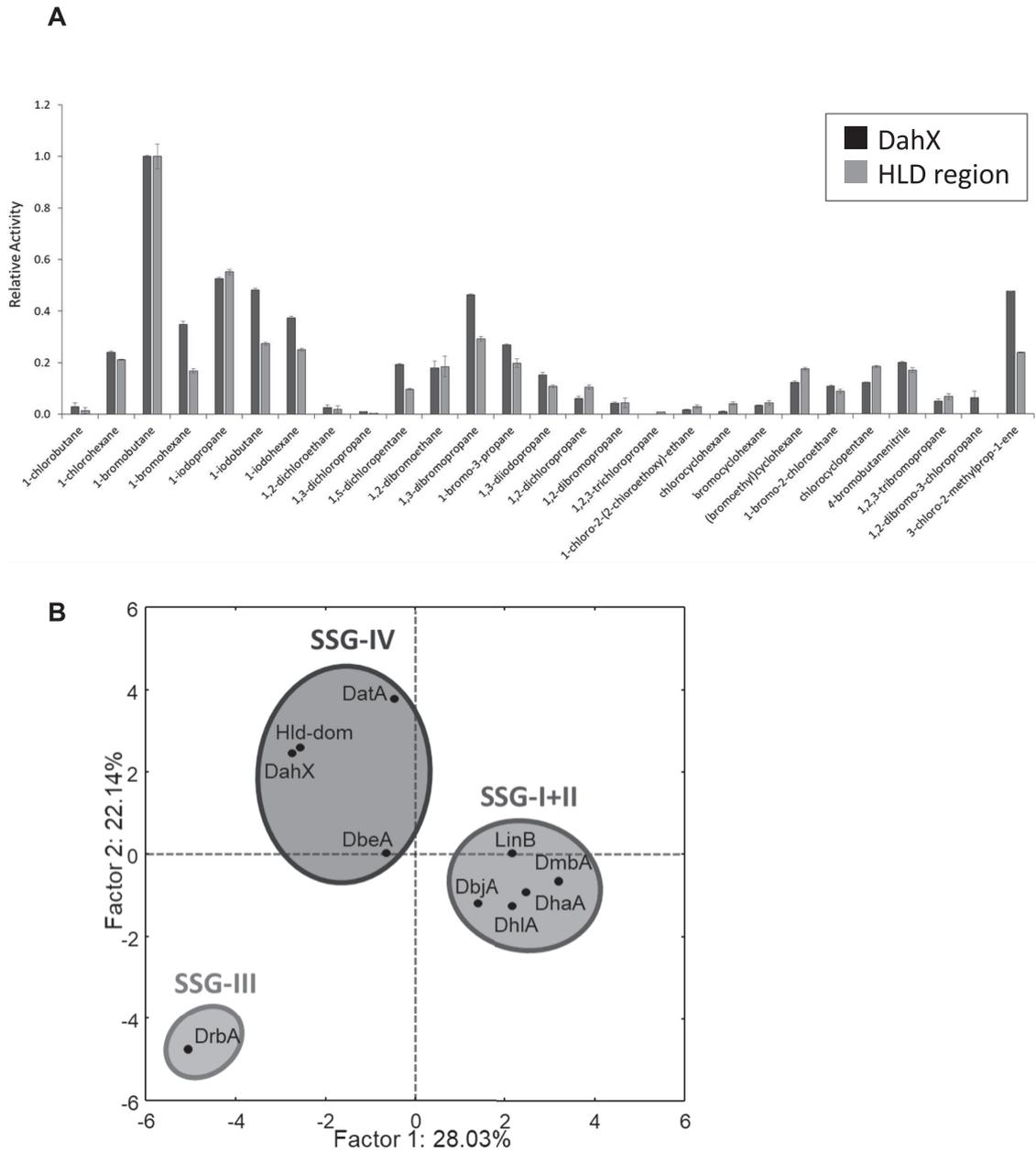


Fig. 7 Substrate specificity of DahX and its HLD region. (A) Relative activities to 1-bromobutane toward 27 substrates are shown. (B) PCA analysis of substrate specificity of HLDs demonstrated that DahX and its HLD region (Hld-dom) are categorized into SSG-IV group.

が決定因子になるが、本実験では本基質に対する活性を測定していないため、SSG-IとSSG-IIを分けることができなかった。いずれにせよ、DahXは配列上近縁のDhlAとは異なるグループに分類され、配列上は近縁でないDatAやDbeAと基質特異性の傾向が類似していた。よって、DahXのHLD領域の立体構造は、DhlAよりも、基質特異性が似ているDatAやDbeAに近い可能性が考

えられる。以上、DahXはHLD活性自体がユニークであることが明らかになった。今後、構造解析を行い、構造-機能相関について詳細な解析を行う必要がある。

大腸菌のTadAは、tRNA^{Arg}_{A34}CGの34位のアデニン(A)を脱アミノ化してイノシン(I)に変換するtRNA編集活性を有する(Wolf *et al.*, 2002)。DahXのCDA領域がTadAと有意な相同性を示すことから、DahXの

tRNA-specific deaminase 活性について検討した。大腸菌で発現・精製した DahX を *in vitro* 合成した tRNA^{Arg}_{A₃₄CG} と混合し、34 位の A が I に変換されるか検討した。RNA の逆転写反応により cDNA が合成されると、I はシトシンと塩基対を形成するため、サンガーシーケンスでは I はグアニン (G) として検出される。したがって、A のピークが編集されると G のピークとして検出される。その結果、DahX の濃度依存的に tRNA 編集活性が検出された (Fig.8)。

次に、CDA 領域のみの DahX (1-168)、TadA 活性に必須のアミノ酸残基に変異を導入した DahX (E57A)、HLD 活性に必須のアミノ酸残基に変異を導入した DahX (D288A) を大腸菌で発現・精製し、同様に tRNA 編集活性を検討した。その結果、DahX (1-168) と DahX (D288A) は、濃度依存的に tRNA 編集活性が検出されたが、DahX (E57A) では tRNA 編集活性が全く検出されなかった (Fig.8)。従って、CDA ドメインが DahX の tRNA 編集活性を担い、必須のアミノ酸残基も TadA と同様であることが明らかになった。さらに、DahX (1-168) と DahX (D288A) は DahX よりも低い活性を示し (Fig.8)、本活性における HLD ドメインの寄与が示され

た。すなわち、HLD と融合タンパク質として存在することが、KKS102 株の生体内においても DahX の tRNA 編集活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

以上、通常の増殖に関与する tRNA-specific deaminase 活性を有する酵素と融合して存在する新奇な HLD を発見した。本酵素 DahX は、HLD としても新奇な基質特異性を有し、HLD と融合すること、および HLD 活性が tRNA-specific deaminase 活性にも影響を及ぼしていると示唆された。

LinA による DDT の分解

1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethane (DDT) は、最も知られた有機塩素系殺虫剤であり、レイチェル・カーソンの「沈黙の春」で、その有害性が広く知られるようになった。DDT の微生物分解については、嫌気的な条件下での還元的な脱塩素反応による分解の報告が多い (Nagata *et al.*, 2016)。好気的な条件下では、PCB/biphenyl 分解と同様の芳香環への酸素添加反応・環開裂反応により分解されると考えられている (Nagata *et al.*, 2016)。また、Glutathione S-transferase (GST) が DDT を 1,1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethylene (DDE) に

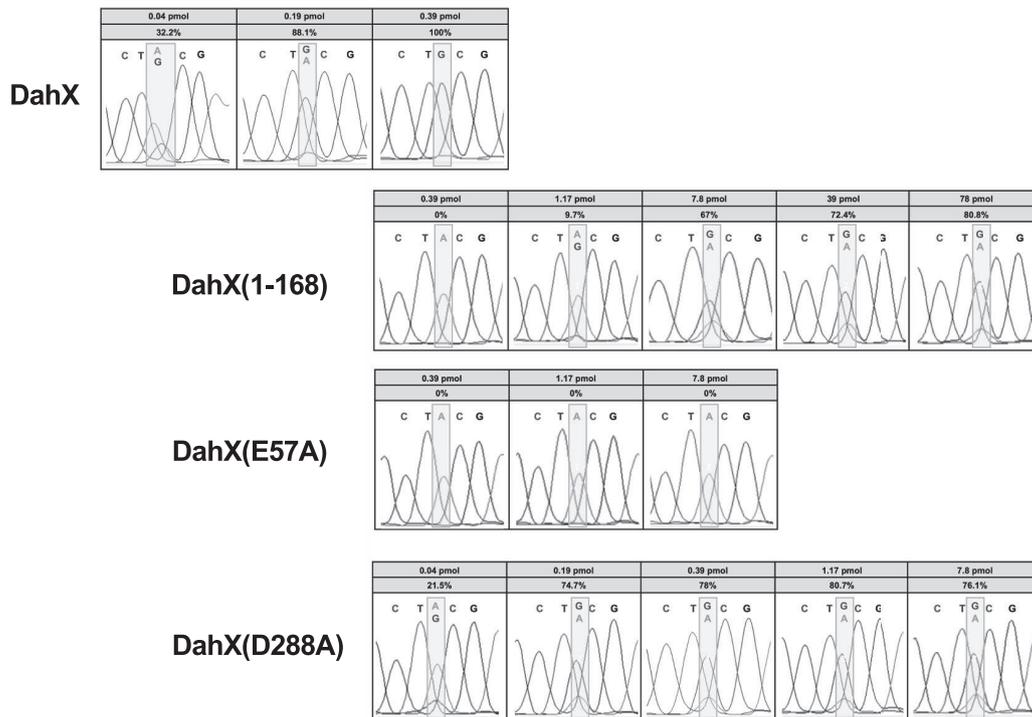


Fig. 8 tRNA-editing activity of DahX and its derivatives. tRNA^{Arg}_{A₃₄CG} was incubated with purified DahX and its derivatives, and the change of A₃₄ to I was detected by Sanger sequencing. Note that I is sequenced as G in this system. Concentration of proteins and ratio of the editing (%) are shown at the top of each wave form data.

変換するという報告もある (Nagata *et al.*, 2016). 本研究では, γ -HCH dehydrochlorinase LinA が DDT を DDE に変換する活性を有する可能性について検討した.

大腸菌で発現・精製した LinA を DDT と反応させ, GC (ECD) で分解活性を検討した. その際, 我々が以前に行った LinA の推定立体構造の正当性を評価する研究 (Nagata *et al.*, 2001) において, 既に多くの LinA 変位型酵素を作製していたため, 野生型の LinA に加えて, 野生型と同等の γ -HCH dehydrochlorinase 活性を有し, 大腸菌で多量に発現する LinA (K20M), 活性中心アミノ酸残基に変異を導入して γ -HCH dehydrochlorinase 活

性を失った LinA (D25N), 野生型酵素と同等の γ -HCH dehydrochlorinase 活性を有し, 立体構造上大きな化合物を基質とする可能性が考えられる LinA (Y50A) についても活性を検討した. その結果, LinA 野生型酵素, LinA (K20M), LinA (Y50A) で DDT のピークの減少と DDE のピークの上昇が観察され, LinA (D25N) ではピークの変化は観察されなかった (Fig.9).

すなわち, LinA に DDT を DDE に変換する活性があること, また, その基本的な反応機構は γ -HCH を基質とする場合と同様であることが示された.

将来的に DDT を完全分解する細菌細胞の育種を見据

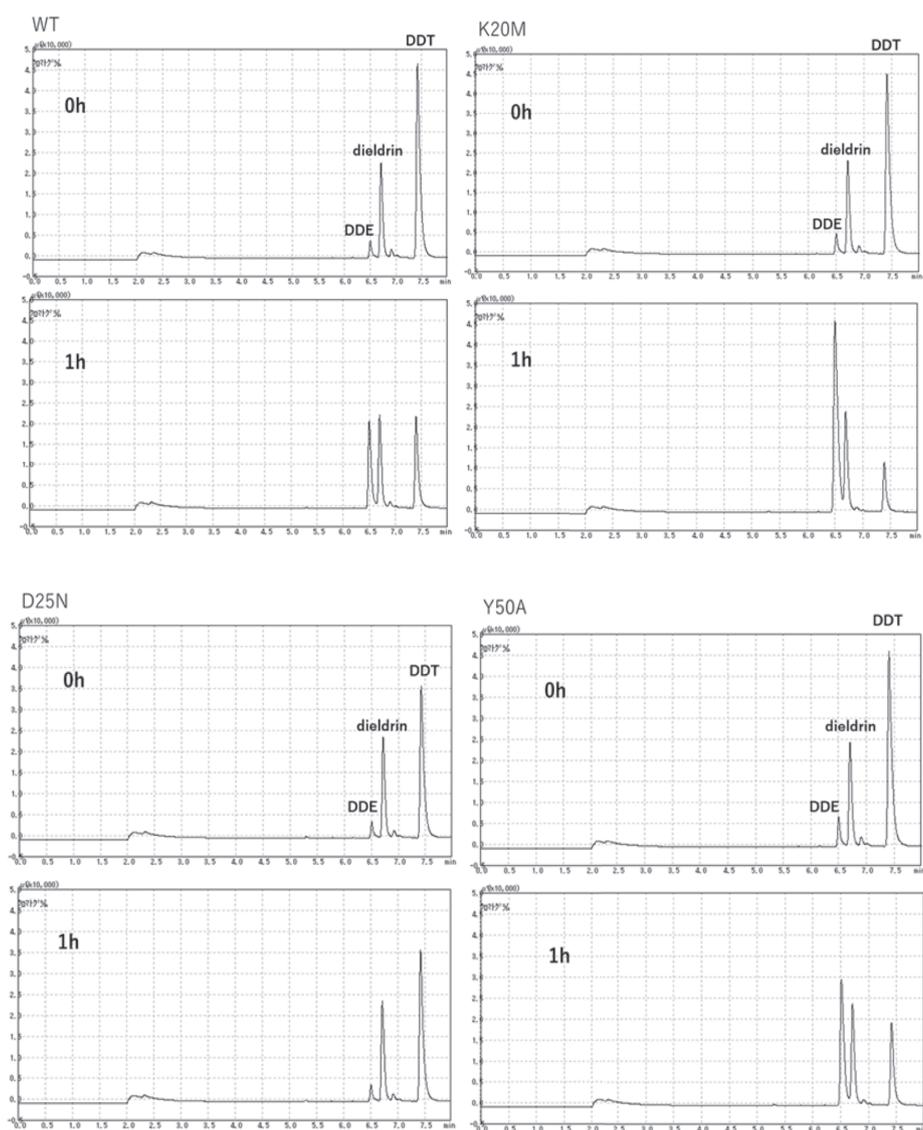


Fig.9 DDT degradation by LinA and its mutants, LinA(K20M), LinA(D25N), and LinA(Y50A). Purified His-tagged enzymes were incubated with DDT for 1 hr and metabolites were analyzed by GC (ECD). Dieldrin was added as internal standard for quantification of the activity.

え, LinAを構成的に発現するUT26株のDDT分解活性について, 休止菌体や粗酵素抽出液等, 様々な条件で検討したが, 明瞭な活性は検出されなかった. 野生株ではLinAの発現量が, 検出可能なレベルのDDT分解活性を示すには不十分である可能性が考えられたため, UT26株の*linA*欠失株であるYO5株(Nagata *et al.*, 1999)に, LinAおよびその変異型酵素遺伝子をクローニングした発現用プラスミドを導入し, LinAの発現をSDS-PAGEで検討した. その結果, 野生型LinAとLinA(K20M)の発現用プラスミドを導入した株で, UT26株より顕著に多量のLinAの発現が確認された(Fig.10A).

そこで, これら株のDDT分解活性をGC(ECD)で検討したところ, 野生型LinAとLinA(K20M)の発現用プラスミドを導入した株でDDTのピークの減少とDDEのピークの上昇が観察された(Fig.10B). 以上, LinAを高発現させることでDDT分解活性を有する細菌細胞の育種に成功し, LinAを利用したDDTの生分解系の構築の可能性を提示することができた.

要 約

本研究では, 脱ハロゲン酵素の機能進化に関する知見を得ることを目的として, 細菌の γ -HCH分解代謝における鍵反応を触媒する2種類の脱ハロゲン酵素LinAとLinBに関する解析を行った. その結果, 酵素としても, コードする遺伝子としてもユニークな脱塩化水素酵素であるLinAが, γ -HCH関連物質だけでなく, 重要な環境汚染物質である人工殺虫剤DDTをDDEに変換する活性も有することを明らかにした. すなわち, 人工化学物質の分解に関わるユニークな脱ハロゲン酵素の新たな潜在能力を提示した. 一方, LinBは, 細菌が広く有し, 基質特異性が広く, 活性特性が変化しやすいという特徴を有するHLDの一員であるが, 既知の γ -HCH分解菌で利用されているHLDはLinBのみである. 本研究では, γ -HCH分解細菌の*linB*遺伝子を他のHLDあるいはHLDホモログ遺伝子に置換した株を作製し, LinB以外のHLDも γ -HCH代謝に関与し得ることを明示した. さらに, 実験進化系を構築し, 実際に, γ -HCH代謝に関する機能が向上した進化型酵素の取得に成功した. また, 通常の増殖に関与するtRNA-specific deaminase活性を有する酵素と融合して存在する新奇なHLDを発見した. 本酵素は, HLDとしても新奇な基質特異性を有し, HLDと融合すること, およびHLD活性がtRNA-specific deaminase活性にも影響を及ぼしているとし唆された. 以上, 本研究において, 脱ハロゲン酵素の潜在能力の高さと機能開発の素材としての有用性を提示することができた.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表・ポスター発表

- 1) 佐藤あや華, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2017. 細菌由来のデアミナーゼ-デハロゲナーゼ融合タンパク質の機能解析. 日本農芸化学会2017年度大会(3月17-20日, 京都)
- 2) 佐藤優花里, 中鉢千尋, 永田裕二. 2017. 二種類の酵素ドメインから構成される融合タンパク質の示差走査蛍光定量解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会ConBio2017(12月6-9日, 神戸)
- 3) 陳楠楠, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. *In vivo* evolution system for haloalkane dehalogenases toward degradation of a man-made pesticide. 第12回日本ゲノム微生物学会年会(3月5-7日, 京都)
- 4) 中鉢千尋, 佐藤優花里, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. デアミナーゼと融合した新規デハロゲナーゼの特徴. 日本農芸化学会2018年度大会(3月15-18日, 名古屋)
- 5) 永田裕二. 2018. HCH脱塩素反応を触媒するハロアルカンデハロゲナーゼの多様性とバイオレメディエーションへの応用. 第36回農薬環境科学研究会(11月8-9日, 甲府)シンポジウム「POPs等の難分解性農薬の微生物分解」
- 6) 陳楠楠, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 人工農薬分解に対するハロアルカンデハロゲナーゼの実験進化系の構築. 第36回農薬環境科学研究会(11月8-9日, 甲府)
- 7) Chen, N., Otsubo, Y., Tsuda, M., & Nagata, Y. 2019. Experimental evolution of haloalkane dehalogenases toward degradation of an organochlorine pesticide. 日本農芸化学会2019年度大会(3月24-27日, 東京)
- 8) 中鉢千尋, 佐藤優花里, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. デアミナーゼ及びハロアルカンデハロゲナーゼドメインから成る新規融合タンパク質の酵素学的研究. 日本農芸化学会2019年度大会(3月24-27日, 東京)
- 9) 鄧文昊, サガリアナボリラクシマ, 陳楠楠, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, シタヴァタムダヤナンド, 永田裕二. 2019. 有機リン系殺虫剤分解細菌 *Sphingopyxis wildii* 株の有機塩素系殺虫剤分解能に関する研究. 日本農芸化学会2019年度大会(3月24-27日, 東京)
- 10) 鄧文昊, Sagar, A.L., 陳楠楠, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, Siddavattam, D. 永田裕二. 2020. 有機リン系殺虫剤分解細菌 *Sphingopyxis wildii* 株由来の2種のハロアルカンデハロゲナーゼの解析. 日本農芸化学会2020年度大会(3月25-28日, 福岡)
- 11) 高橋由紀子, 中鉢千尋, 野々山翔太, 佐藤優花里, 永田裕二. 2020. *Acidovorax* sp. KKS102株が有する融合酵素DahXのtRNA編集活性. 日本農芸化学会2020年度大会(3月25-28日, 福岡)
- 12) Chen, N., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., & Nagata, Y. 2020. Construction of experimental evolution system of haloalkane dehalogenases and characterization of the evolved enzymes. 日本農芸化学会2020年度大会(3月25-28日, 福岡)
- 13) Takahashi, Y., Chubachi, C., Nonoyama, S., Sato, Y. & Nagata, Y. 2020. Bifunctional activity of a fusion enzyme DahX. 2020 World Conference on Protein Science (July 6-10札幌)

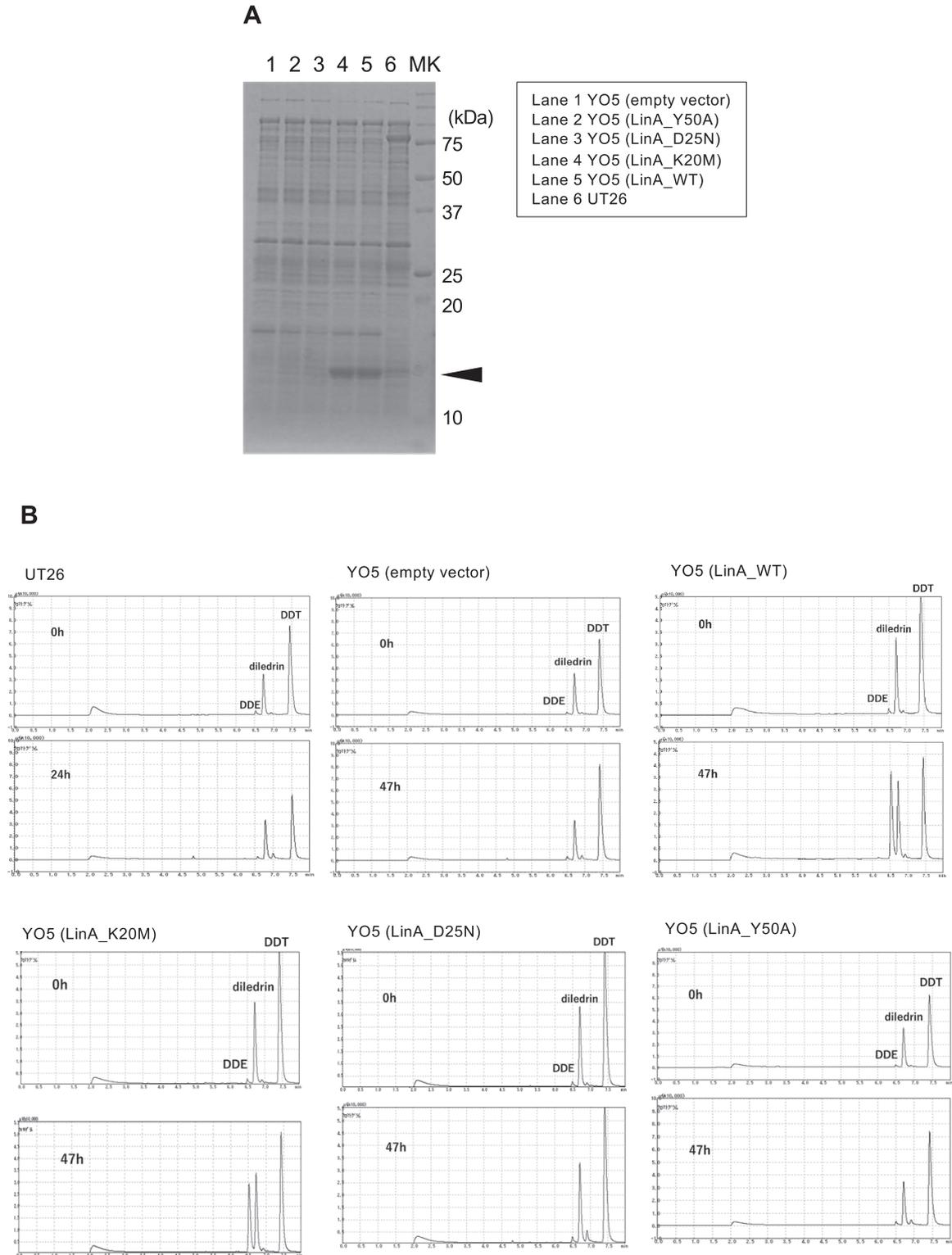


Fig. 10 Construction of genetically engineered strains degrading DDT. (A) SDS-PAGE analysis of total proteins of *Sphingobium japonicum* UT26, YO5 (*linA*-deletion mutant of UT26) harboring empty vector, and YO5-derived strains expressing *LinA*_WT, *LinA*_K20M, *LinA*_D25N, and *LinA*_Y50A. Triangle indicates *LinA* and its mutants. (b) Those UT26-derived strains were incubated with DDT for 24 or 47 hr and metabolites were analyzed by GC(ECD). Dieldrin was added as internal standard for quantification of the activity.

- 14) Sato, Y., Ogata, T. & Nagata, Y. 2020. Oligomeric states of MCE transporter components LinM and LinN from *Sphingobium japonicum* UT26. 2020 World Conference on Protein Science (July 6-10札幌)
- 15) 陳楠楠, 大坪嘉行, 永田裕二. 2021. 実験進化系で得られた人工殺虫剤分解に関与する進化型 ハロアルカンデハロゲナーゼ. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, オンライン)
- 16) 高橋由紀子, 佐藤優花里, 中鉢千尋, 野々山翔太, 永田裕二. 2021. ハロアルカンデハロゲナーゼ及びデアミナーゼからなる融合酵素DahXのtRNA編集活性. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, オンライン)
- 17) 伊藤蓮, カフヤユスフ, 宮内啓介, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. gamma-HCH脱塩化水素酵素LinAによるDDTの分解. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)
- 18) 鄧文昊, 高田美信, 大坪嘉行, 渡辺正夫, 永田裕二. 2022. 細菌由来の有機塩素系殺虫剤分解に関わるデハロゲナーゼを発現するシロイヌナズナ植物の作製. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)

原著論文

- 1) Marek M., Chaloupkova R., Prudnikova T., Sato Y., Rezacova P., Nagata Y., Smatanova I.K. & Damborsky J. 2020. Structural and catalytic effects of surface loop-helix transplantation within haloalkane dehalogenase family. *Comp Struct Biotechnol J* **18**: 1352-1362.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Nagata Y., Kato H., Ohtsubo, Y. & Tsuda M. 2019. Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ. Microbiol. Rep.* **11**: 630-644.

謝 辞

本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また, 本研究の遂行にご協力いただいた東北大学大学院生命科学科の野々山翔太博士 (現 東京工業大学) ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。また, 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (永田裕二 19H02865), 挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877; 佐藤優花里 16K14908), ならびに東北大学男女共同参画推進センター (TUMUG) が実施する TUMUG 支援事業 (男女共同参画・女性研究者支援事業) の支援 (佐藤優花里) にも感謝致します。

文 献

Buryska, T., Vasina, M., Gielen, F., *et al.* (2019). Controlled oil/water partitioning of hydrophobic substrates extending the bioanalytical applications of droplet-based microfluidics. *Anal Chem* **91**: 10008-10015.

- Chaloupkova, R., Liskova, V., Toul, M., *et al.* (2019). Light-emitting dehalogenases: reconstruction of multifunctional biocatalysts. *ACS Catalysis* **9**: 4810-4823.
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 633-657.
- Gehret, J. J., Gu, L., Geders, T. W., Brown, W. C., Gerwick, L., Gerwick, W. H., Sherman, D. H. & Smith, J. L. (2012). Structure and activity of DmmA, a marine haloalkane dehalogenase. *Protein Sci* **21**: 239-248.
- Heeb, N. V., Schalles, S., Lehner, S., Schinkel, L., Schilling, I., Lienemann, P., Bogdal, C. & Kohler, H. E. (2019). Biotransformation of short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) with LinA2: A HCH and HBCD converting bacterial dehydrohalogenase. *Chemosphere* **226**: 744-754.
- Imai, R., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1991). Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from gamma-hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol* **173**: 6811-6819.
- Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989). Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas-paucimobilis*. *Agric Biol Chem* **53**: 2015-2017.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology (Reading)* **166**: 531-545.
- Ito, M., Prokop, Z., Klvana, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., Damborsky, J. & Nagata, Y. (2007). Degradation of beta-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from gamma-hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. *Arch Microbiol* **188**: 313-325.
- Iwasaki, I., Utsumi, S. & Ozawa, T. (1952). New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. *Bull. Chem. Soc. Japan* **25**: 226.
- Jepson, J. E. & Reenan, R. A. (2007). Genetic approaches to studying adenosine-to-inosine RNA editing. *Methods Enzymol* **424**: 265-287.
- Jesenska, A., Pavlova, M., Strouhal, M., *et al.* (2005). Cloning, biochemical properties, and distribution of mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6736-6745.
- Kaczmarczyk, A., Vorholt, J. A. & Francez-Charlot, A. (2012). Markerless gene deletion system for sphingomonads. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3774-3777.
- Kimbara, K., Hashimoto, T., Fukuda, M., Koana, T., Takagi, M., Oishi, M. & Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Bacteriol* **171**: 2740-2747.
- Koudelakova, T., Chovancova, E., Brezovsky, J., Monincova, M., Fortova, A., Jarkovsky, J. & Damborsky, J. (2011). Substrate specificity of haloalkane dehalogenases. *Biochem J* **435**: 345-354.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS,

- carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. & Cormier, M. J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4438-4442.
- Moriuchi, R., Tanaka, H., Nikawadori, Y., *et al.* (2014). Stepwise enhancement of catalytic performance of haloalkane dehalogenase LinB towards beta-hexachlorocyclohexane. *AMB Express* **4**: 72.
- Nagata, Y., Hatta, T., Imai, R., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993a). Purification and characterization of g-hexachlorocyclohexane (g-HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1582-1583.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K. & Takagi, M. (1993b). Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* **175**: 6403-6410.
- Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansorgova, A. & Takagi, M. (1997). Purification and characterization of a haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3707-3710.
- Nagata, Y., Futamura, A., Miyauchi, K. & Takagi, M. (1999). Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J Bacteriol* **181**: 5409-5413.
- Nagata, Y., Mori, K., Takagi, M., Murzin, A. G. & Damborsky, J. (2001). Identification of protein fold and catalytic residues of gamma-hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. *Proteins* **45**: 471-477.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 741-752.
- Nagata, Y., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2015). Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenases. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 9865-9881.
- Nagata, Y., Tabata, M., Ohtsubo, Y., and Tsuda, M. (2016) Biodegradation of organochlorine pesticides. *Chapter 512 p 1-30 In Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (ed), Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition ASM Press, Washington, DC.*
- Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ Microbiol Rep* **11**: 630-644.
- Ohtsubo, Y., Maruyama, F., Mitsui, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2012). Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971.
- Okai, M., Kubota, K., Fukuda, M., Nagata, Y., Nagata, K. & Tanokura, M. (2010). Crystal structure of gamma-hexachlorocyclohexane Dehydrochlorinase LinA from *Sphingobium japonicum* UT26. *J Mol Biol* **403**: 260-269.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sato, Y., Monincova, M., Chaloupkova, R., Prokop, Z., Ohtsubo, Y., Minamisawa, K., Tsuda, M., Damborsky, J. & Nagata, Y. (2005). Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4372-4379.
- Schweizer, H. P. (1992). Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable *oriT* and the counter-selectable *Bacillus subtilis* *sacB* marker. *Mol Microbiol* **6**: 1195-1204.
- Tabata, M., Ohhata, S., Nikawadori, Y., *et al.* (2016). Comparison of the complete genome sequences of four gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res* **23**: 581-599.
- Trantirek, L., Hynkova, K., Nagata, Y., Murzin, A., Ansorgova, A., Sklenar, V. & Damborsky, J. (2001). Reaction mechanism and stereochemistry of gamma-hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase LinA. *J Biol Chem* **276**: 7734-7740.
- Wolf, J., Gerber, A. P. & Keller, W. (2002). *tadA*, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *EMBO J* **21**: 3841-3851.

略語一覧

- CDA: cytidine deaminase
DDE: 1,1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethylene
DDT: 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)-ethane
ECD: electron capture detector
GC: gas chromatography
GST: glutathione S-transferase
HCH: hexachlorocyclohexane
HLD: haloalkane dehalogenase
PCA: principal component analysis
PCB: polychlorinated biphenyl
SSGs: substrate specificity groups

細菌の環境適応・進化に関する細胞機能

佐藤 優花里, 永田 裕二

東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座

〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Bacterial cellular functions related to environmental adaptation and evolution

Yukari Sato, Yuji Nagata

Laboratory of Microbial Evolution and Function Research,

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980,-8577

To gain insight into cellular functions related to environmental adaptation and evolution, we analyzed the ABC transporter LinKLMN essential for the γ -HCH utilization in γ -HCH-degrading *Sphingobium japonicum* strain UT26, and its growth phenomenon under oligotrophic conditions. The hypothesis that LinKLMN is involved in the integrity of the cellular membrane through the transport of membrane component(s) was supported by some results. Furthermore, LinM and LinN were suggested to form multimers and interact with each other. In particular, TEM analysis strongly suggested that LinN has an octameric structure. On the other hand, we found that UT26 exhibits CO₂-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO phenotype) by expression of the *adhX* gene encoding alcohol dehydrogenase. Some results suggested that HYGO phenotype is a general function in environmental bacteria. To elucidate its mechanism, we have developed a new qTn-Seq method and conducted some other analyses. At this stage, it was suggested that the HYGO phenotype strain grows under oligotrophic conditions by suppressing CO₂ release through a glyoxylate circuit and using ethanol, which is present at low concentrations in the environment, as the main carbon source.

Key words: sphingomonads, ABC transporter, oligotroph, CO₂ fixation, alcohol dehydrogenase

緒 言

人工合成した有機塩素系殺虫剤 γ -ヘキサクロロシクロヘキサン (γ -HCH) 分解細菌は、生物の環境適応・進化機構を解明する上で優れた研究対象である (Nagata *et al.*, 2019). γ -HCH 分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株を対象とした研究で、本株の分解代謝経路、分解に関わる酵素・遺伝子、ゲノム構造が明らかになり、本株が実際に γ -HCH 分解資化細菌として成立して間もない多くの特徴を有していることが明らかになった (Nagata *et al.*, 2019). その中で重要な点のひとつとして、本株の γ -HCH 分解資化には、直接の代謝酵素遺伝子だけでなく、*linKLMN* がコードする ABC トランスポー

ターも必須である (Endo *et al.*, 2007), という点が挙げられる。*linKLMN* ホモログは、他の γ -HCH 分解細菌株のみならず、 γ -HCH 分解能を持たないスフィンゴモナッド株にも保存されており、本機能は γ -HCH 代謝に特異的な機能ではなく、スフィンゴモナッド細菌群がコア機能として有する γ -HCH 分解に必要な因子と考えられる (Endo *et al.*, 2007). すなわち、適当な遺伝的背景を持つ細菌株が特殊性の高い酵素をコードする *lin* 遺伝子群を獲得し、UT26 株に代表される γ -HCH 分解資化細菌が誕生したと考えられる (Nagata *et al.*, 2019). スフィンゴモナッド細菌群には、 γ -HCH 分解細菌のみならず、他の様々な疎水性の難分解性物質を分解する細菌が存在することから (Stolz, 2009; Stolz, 2014), *linKLMN* 機能は、本細菌群の環境適応・進化の鍵のひとつであると考えられる。

UT26 株の *linKLMN* 遺伝子は、トランスポゾン (Tn) 挿入実験により、 γ -HCH を唯一炭素源として添加した

E-mail: aynaga@ige.tohoku.ac.jp

共同研究者：田中 良和 (東北大学大学院生命科学研究科).

大坪 嘉行 (東北大学大学院生命科学研究科).

無機培地で生育できない変異株の Tn 挿入部位の解析により同定された (Endo *et al.*, 2007). LinKLMN は 4 つのタンパク質により構成される複合体であり, 各タンパク質は次のように特徴づけられている. LinK: 相同タンパク質は ATPase 遺伝子とセットになって ABC トランスポーターのコアを構成していることから, ABC トランスポーターを構成する膜タンパク質であると予想される. LinL: ABC トランスポーターの ATPase コンポーネントと相同性を示し, 一般に保存されるモチーフを有するため, ATPase コンポーネントと予想される. LinM: 脂質結合性が示唆される Mammalian Cell Entry (MCE) ドメイン (Casali and Riley, 2007) を保持している. 大腸菌が有する 3 種の MCE タンパク質 (MlaD, PqiB, LetB) は, それぞれ脂質輸送に関与すると推定される ABC トランスポーターを構成するペリプラズムタンパク質であり, 疎水性物質であるリン脂質など外膜を構成する脂質を親水性のペリプラズム領域で輸送する役割を担うと示唆される (Ekiert *et al.*, 2017). LinN: N 末端にシグナルアンカーペプチドを有する, 機能未知のリポタンパク質と予想される. LinN はペリプラズム側から外膜にアンカーされた, LinM と相互作用する膜タンパク質であると予想される. さらに, UT26 株の *linKLMN* 遺伝子破壊株では, UT26 株より, (i) γ -HCH を迅速に分解し, より多くの dead-end 産物である 2,5-DCP を蓄積する, (ii) 2,5-DCP による生育阻害効果が強くなる, (iii) 疎水性物質の取り込み能が上昇する, (iv) 有機溶媒耐性能が低くなる, (v) 外膜成分を培養液に多く漏出させる, こと (Endo *et al.*, 2007; Endo *et al.*, unpublished data) から, LinKLMN は, 細胞膜成分の輸送を介して細胞外膜の integrity (構築と安定性) に関与する ABC トランスポーターシステムであると推定される.

ABC トランスポーターは, 細菌の外膜形成や薬剤耐性, 多細胞真核生物のホルモン分泌など, 様々な基本的な生体機能に関与しており, 特に大腸菌では Mla タンパク質など, リン脂質輸送を担うとされる ABC トランスポーターの研究が数多くなされている. リン脂質は大腸菌などのグラム陰性細菌において主要な外膜構成物質であり, リン脂質輸送能力を失うと細胞の不安定化や死滅を引き起こすため, グラム陰性菌にとって重要な脂質である. しかし, リン脂質輸送については, LPS や膜タンパク質など他の外膜成分の輸送メカニズムに比べて, ほとんど理解されていない. これはいくつかのシステムがリン脂質輸送を媒介できると示唆されており, ひとつの推定リン脂質トランスポーターを欠失させても表現型として表れにくいなど, 機能的冗長性が新規リン脂質輸送 ABC トランスポーターの発見と特性評価を困難にし

ているからである (Lundstedt *et al.*, 2021). すなわち, リン脂質輸送 ABC トランスポーターは依然としてそのメカニズムに不明な点が多く, 更なる理解が求められている. 本研究で対象とする UT26 株が属するスフィンゴモナッド細菌群においては, *Sphingomonas* sp. A1 が有するアルギン酸トランスポーターである Alg タンパク質 (Hisano *et al.*, 1996) や, *Sphingomonas melonis* TY が有するニコチントランスポーターである NdpT (Wang *et al.*, 2018) など, いくつか ABC トランスポーターの報告がされているが, 脂質輸送 ABC トランスポーターの報告はまだない. 上述のように, LinKLMN は, 脂質輸送を介して細胞膜の構築と安定性に関与する ABC トランスポーターであると示唆されており, LinKLMN の輸送基質・構造・作用機構の解明により, スフィンゴモナッド細菌群の外膜の構成原理の理解に繋がることが期待される. さらに, スフィンゴモナッド細菌群は大腸菌などのグラム陰性細菌と異なり, リポ多糖の代わりにスフィンゴ糖脂質を有する特異な外膜構造をしている (White *et al.*, 1996) ことから, 生物学的にも新たな知見が得られると期待される. そこで, 本研究では, 新規性の高い LinKLMN について, 遺伝学的, 生化学的, および構造学的アプローチにより解析し, 脂質輸送を担う ABC トランスポーター複合体に関する新たな知見を得ることを目的とした.

一方, 生物にとって, 生育や増殖に必要な栄養源が十分でない低栄養環境は身近に存在する「極限環境」であると同時に「日常的な環境」でもある. 従って, 当該環境下での振る舞いは生物にとって極めて重要であり, 様々な低栄養環境適応機構が存在すると考えられる. とりわけ, 増殖に有機炭素源を必要とする従属栄養細菌は栄養源が枯渇しがちである. 一般に細菌は低栄養環境では増殖を停止し, 消極的に耐え忍んでいると考えられており, いわゆる飢餓応答機構が詳細に研究されている (White *et al.*, 1996). しかし, ただ「耐え忍ぶ」だけでは増殖による多様化が起こらず, 新しい代謝能の獲得などの進化も起こり得ない. 従って, 低栄養環境下でも「消極的に」増殖を停止するだけでなく, 「積極的に」増殖するための適応機構も存在するはずである. 実際, 低栄養環境で増殖する細菌 (oligotroph) が環境中に広く存在することは古くから知られている (Kuznetsov *et al.*, 1979). また, 従属栄養細菌が独立栄養細菌が利用する既知の CO₂ 固定経路を有さないにもかかわらず, 低栄養環境下で独立栄養細菌のように振る舞い, CO₂ 依存的に細胞増殖する現象も見出されている (Ohhata *et al.*, 2007). しかし, このような現象は再現性の問題や低栄養環境での培養という技術的な困難もあり, 詳細な機構解明には至っていない. 我々は, γ -HCH 分解資化細菌

Sphingobium japonicum UT26 株の遺伝学的解析の過程で、本細菌株の CO₂ 依存的な低栄養環境適応現象を見出し、その現象の特徴の解析と機構の解明を進めた。

実験方法

γ -HCH 資化に必須な ABC トランスポーター LinKLMN の遺伝学的・構造学的解析

Sphigobium japonicum UT26 株由来の株の培養には、完全培地として 1/3LB 培地 (Inaba *et al.*, 2020)、無機塩培地として W 培地 (Imai *et al.*, 1989) を使用し、炭素源としてグルコースを 0.2%、コハク酸を 0.5%、 γ -HCH を 750mg/L となるように加えた。大腸菌の培養には LB 培地を用い、適宜抗生物質を添加した。固体培地には、寒天を 1.5% となるように加えた。UT26 由来株は 30℃、大腸菌は 37℃ で培養した。菌株を長期保存する場合には、15% のグリセロールを添加し、-80℃ で保存した。DNA 操作、PCR、DNA 塩基配列決定、エレクトロポレーション等は常法に従った (Sambrook *et al.*, 1989)。

UT26 株の *linKLMN* 遺伝子完全欠失株 (UT26DLKN 株) は、pAK405 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012) を用い、相同組換えによりマーカーレスとなるように作製した。相補用のプラスミドの作製には広宿主域ベクター pKS13P (Endo *et al.*, 2007) を用いた。

細胞の細胞膜透過性を調べるための蛍光色素として、FM-4-64 と SYTOX Green を用いた。DNA 染色剤の DAPI をバックグラウンド検出用に用いた。これら染色液と細菌細胞を混合し、蛍光顕微鏡で観察を行った。画像処理には ImageJ を用いた。

LinM の発現には、発現用プラスミド pRSF-1b (Merck)、LinN の発現には発現用プラスミド pOPTH (Ohashi *et al.*, 2016)、発現用の大腸菌株として *E. coli* BL21Star™ (DE3) 株を用いた。目的酵素の発現誘導を確認後、目的酵素が有する HN タグおよび His タグを用いてアフィニティ精製を行った。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーにより多量体構造に応じた分画を行った。

大腸菌で発現・精製した HN-LinM をクロロホルム-メタノールで抽出し、抽出物を薄層クロマトグラフィーで展開し、リン脂質の検出試薬である Dittmer-Lester 試薬で青色に発色するか検討した。また、大腸菌で発現・精製した HN-LinM および His-LinN をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、EM ステイナーとリンタングステン酸により染色して透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した (田中良和教授の研究室で実施)。His-LinN 試料から得られた TEM 画像中の粒子をピックアップし、単粒子解析を行ない、二次元平均化モデルを得た。さらに

それらを組み合わせて三次元平均化を行い立体構造モデル図を得た。

超低栄養環境での従属栄養細菌の細胞増殖現象

Sphigobium japonicum UT26 株由来の株の培養には、完全培地として 1/3LB 培地 (Inaba *et al.*, 2020)、無機塩培地として W 培地 (Imai *et al.*, 1989)、あるいは 1/10W 培地 (Inaba *et al.*, 2020) を使用し、炭素源を添加する場合にはグルコースを 0.2% 加えた。大腸菌の培養には LB 培地を用い、適宜抗生物質を添加した。完全培地の固体培地には、寒天を 1.5% となるように加えた。無機培地の固体培地には高純度の精製寒天 1.5%、あるいはゲランガム 0.4% を用いた。UT26 由来株は 30℃、大腸菌は 37℃ で培養した。菌株を長期保存する場合には、15% のグリセロールを添加し、-80℃ で保存した。DNA 操作、PCR、DNA 塩基配列決定、エレクトロポレーション等は常法に従った (Sambrook *et al.*, 1989)。adhX 遺伝子への部位指定変異導入は確立した手法を用いた (Ito *et al.*, 2007)。

固体培地上での生育評価はスポットアッセイにて行った。CO₂ 依存性を評価する場合には、プラスチックバッグ中に CO₂ 吸着剤であるソーダ石灰を共存させ、密閉して生育を観察した。CO₂ の取り込みは、NaH¹⁴CO₃ と H₂SO₄ を混合して発生させた ¹⁴CO₂ の取り込み量で評価した。

UT26 株のプラスボゾン pTnMod-OKm (Dennis *et al.*, 1998) を用いた Tn 変異株ライブラリーの構築と解析は、既報に従った (Endo *et al.*, 2005; Endo *et al.*, 2007)。

UT26 株の各種遺伝子完全欠失株は、pAK405 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012) を用いて相同組換えによりマーカーレスとなるように作製した。adhX 高発現用プラスミドは広宿主域ベクター pKS13P (Endo *et al.*, 2007)、あるいは pBBR1-MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) を用いて作製した。他の遺伝子相補用のプラスミドは、pKS13P を用いて作製した。Hypermutator 株は、変異型 *dnaQ* 遺伝子を用いた不均衡変異導入法 (Itakura *et al.*, 2008) により作製した。

タンパク質の発現には、pET22b(+) と *E. coli* BL21Star™ (DE3) 株を用い、His タグを利用してアフィニティ精製を行った。アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 活性は、NAD⁺ と基質を添加した際の NADH の生成量を分光光度測定で定量することで評価した。

qTn-Seq 法に用いる Tn カセットを HYGO 表現型株に *in vivo* で転移させ、約 11,000 クローンからなる qTn-Seq 用 Tn 変異株ライブラリーを作製した。本ライブラリーを 1/3LB、1/10W-グルコース、1/10W 寒天培地で培養した。培養後の菌体を掻き取り、DNA 抽出・精製を行なっ

た. 精製 DNA を T4 DNA ポリメラーゼとエキソヌクレアーゼ III で処理し, DNA 断片の末端を修復後, M-MLV 逆転写酵素により, DNA の 5' 末端に G 塩基を付加すると共に, 固有識別タグを含むアダプター配列を付加した. 最後に, PCR でイルミナ社の NGS でシーケンスを行うために必要な配列を付加し, NGS 解析を行なった. 得られたリードデータを固有識別タグにより標準化した後に, UT26 株ゲノムへのマッピングを行った.

結果と考察

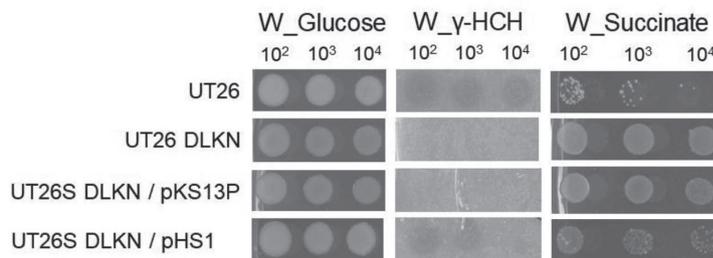
γ -HCH 資化に必須な ABC トランスポーター LinKLMN の遺伝学的・構造学的解析

UT26 株の LinKLMN に関する以前の研究では, 薬剤耐性遺伝子で当該遺伝子を破壊した株が用いられていた (Endo *et al.*, 2007). しかし, 詳細な機能解析を行うた

めには, 当該領域のみをマーカーレスで完全欠失した株を用いることが望ましい. また, 以前に作製された *linKLMN* 相補用プラスミドでは, *linK* の開始コドンが最新のアノテーション配列の開始コドンよりも 60 アミノ酸残基分も後方の ATG で設計されており, *linK* が完全に相補されていない可能性があることが判明した. そこで本研究では, 新たに *linKLMN* のマーカーレス完全欠失株 (UT26DLKN 株) と, *linK* の開始コドンを最新のものとした *linKLMN* 相補用プラスミドを作製し, 解析に用いた.

UT26DLKN 株は, 野生株と比べて, 通常の栄養培地 (1/3LB 培地) およびグルコースを炭素源とした無機培地 (W_Glu 培地) での生育には顕著な違いが観察されなかったが, W_ γ -HCH 培地では生育せず, コハク酸を炭素源とした W_Suc 培地では生育が良くなった (Fig.1A).

A



B

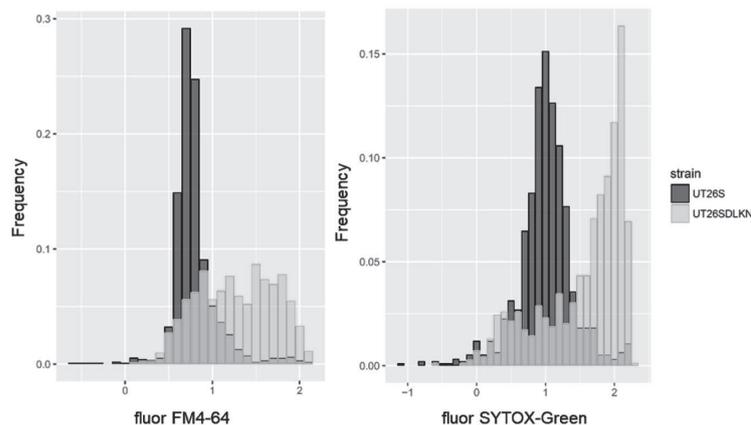


Fig. 1 Phenotypes of *linKLMN*-deletion mutant (UT26DLKN) of *Sphingobium japonicum* UT26. (A) Growth on W medium with glucose, γ -HCH, and succinate. pHS1 is a plasmid for complementation of *linKLMN* genes that was constructed from broad-host-range vector pKS13P. (B) Staining of UT26 and UT26DLKN cells with FM4-68 and SYTOX-Green.

なお、相補株では野生株と同様の表現型を示した。また、UT26DLKN株は野生株より細胞染色剤の取り込み能が上昇した (Fig.1B)。一方、大腸菌で発現・精製したLinM抽出物を薄層クロマトグラフィーで解析したところ、リン脂質の検出試薬であるDittmer-Lester試薬で青色に発色し、大腸菌で発現したLinMにリン脂質が結合していると示唆された。また、UT26DLKN株は、野生株に比べて多量のmembrane vesicle (MV)を産生した (各論1参照)。以上、LinKLMNは、細胞膜成分の輸送を介して細胞外膜のintegrityに関与するという仮説を支持する結果が得られた。

LinKLMNの構成因子のうち、LinKとLinLは、他のABCトランスポーターの当該因子との相同性が比較的高く、ABCトランスポーター共通の基本機能を担うと考えられる。これに対して、LinMとLinNは、解析の進んでいるリン脂質トランスポーターとの相同性が低く、LinKLMN特有の機能を規定する因子であると考えられる。そこで、LinMとLinNがどのような構造体として機能しているかを解明するために、これらの生化学的・構造学的解析を行った。N末端の膜結合配列を除いてHNタグを付与したLinM、N末端のシグナルアンカーペプチド配列を除いてHisタグを付与したLinNをそれ

ぞれ、または、同じ大腸菌細胞で発現させ、アフィニティ精製を行った。精製後の各タンパク質についてゲルろ過クロマトグラフィー解析を行った結果、HN-LinM、His-LinN共に多量体を形成し、かつHN-LinMとHis-LinNが複合体を形成する可能性が示唆された。さらに、精製後のHN-LinMとHis-LinN、および両者を共発現・精製した試料について、ネガティブ染色によるTEM観察を行った結果、His-LinNについて、His-LinN多量体と推定される粒径約15nmの均一な粒子が観察された (Fig.2A)。

得られたTEM画像を用いて単粒子解析を行った結果、二次元平均化モデルを得、さらにそれらを組み合わせて三次元平均化を行い立体構造モデル図を得た (Fig.2B)。本モデルは表面の6ヶ所に孔を有する正六面体構造であり、AlphaFoldによるHis-LinN構造予測と組み合わせた結果、His-LinNの8量体x6面=48量体と示唆された。His-LinNはシグナルアンカー配列を除去しており、当該配列を介して外膜と接触していた疎水性面同士が水溶液中で結合して本モデルのような粒子が形成されたのではないかと考えられる。実際、8量体x2=16量体と推測される粒子も観察されており、多面体構造は実験で生じた人工物である可能性が高い。しかし、LinNが生体内でも8量体構造を形成し、内部のチャンネルを輸送基質が通過する可能性が強く示唆された。今後、クライオ電顕でより詳細な解析を実施する予定であるが、今回得られた結果は、少なくともLinKLMN予想モデル図 (Fig.3)と矛盾しない。

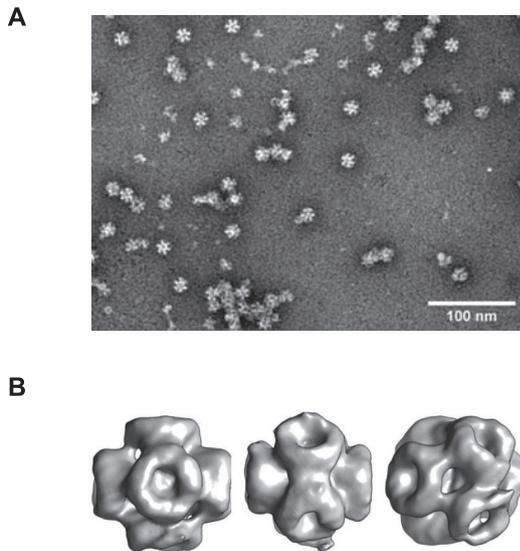


Fig.2 Multimer structure of LinN, a component of LinKLMN ABC transporter system. Purified His-LinN expressed in *E. coli* was analyzed by TEM (A), and 3D structure model of His-LinN was constructed by using single molecules observed by TEM analysis (B).

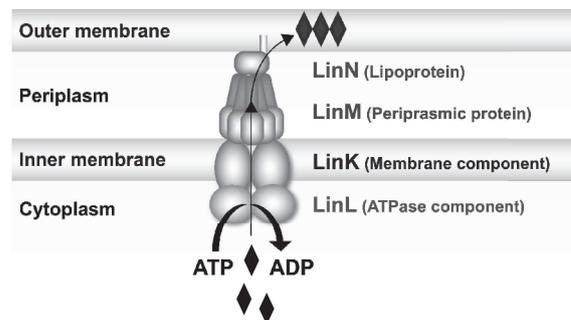


Fig.3 Proposed model of LinKLMN ABC transporter system in UT26. LinM and LinN form multimeric complexes, and the LinKLMN system transports unknown outer membrane component(s) (black diamonds) such as lipid in an ATP-dependent manner.

超低栄養環境での従属栄養細菌の細胞増殖現象

UT26 株は *Alphaproteobacteria* に属する従属栄養細菌であり、生育に有機炭素源を必要とし、炭素源を添加しない無機塩培地では生育しないため、 γ -HCH の資化能についても γ -HCH を唯一の炭素源として添加した無機塩培地 (γ -HCH 培地) で評価できる。すなわち、本株の Tn 変異株ライブラリーを作製し、グルコースを添加した無機塩培地では生育し、 γ -HCH 培地では生育しないクローンを選択すれば、 γ -HCH 資化に必須な遺伝子に Tn が挿入されたクローンが選択できる。本手法を用いて、 γ -HCH 代謝系の下流遺伝子や (Endo *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2007), 上述の γ -HCH 資化に必須な ABC トランスポーター遺伝子 *linKLMN* (Endo *et al.*, 2007) を同定した。このようなスクリーニングの過程で、 γ -HCH 培地で活発に増殖し、野生株より大きなクリアゾーンを形成するクローンを見出した。クリアゾーンは γ -HCH の分解により生じるため、当初、本クローンは γ -HCH 代謝能が増強した株と考えられたが、炭素源非添加の無機塩培地で培養したところ、野生株は全く生育しないのに対して、本クローンはコロニーが可視化できるほど活発に増殖し (Fig.4), γ -HCH 代謝能自体には変化がなかった。

すなわち、 γ -HCH を炭素源としなくても増殖できるため、結果的に培地中の γ -HCH をより多く分解したと考えられた。本現象を high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO) と命名し、解析を行った。

Tn 挿入変異株ライブラリー由来の HYGO 株の Tn 挿入部位を決定したところ、遺伝子間領域への Tn の挿入

であった。そこで、HYGO 株クローンの Tn 挿入部位を野生型株に導入し、当該変異を再現したところ、やはり HYGO 表現型を示したことから、本表現型は遺伝子破壊による効果ではなく、Tn 挿入部位に近接する亜鉛依存的アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) と有意な相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 (*adhX* と命名) が Tn 由来のプロモーターで構成的に発現したことが HYGO 表現型を引き起こしたと推定された (Inaba *et al.*, 2020)。実際、野生型株に *adhX* を構成的に発現するプラスミドを導入しても HYGO 表現型が観察された。さらに、後述するように、*adhX* を高発現する自然突然変異株も低頻度ながら出現し、野生株を用いた解析では、内在する *adhX* 遺伝子高発現の自然突然変異が実験結果に影響を与える場合が生じたため、*adhX* を完全欠失した UT26DAX 株を作製し、以降の解析に用いた。*adhX* は生育に必須ではなく、UT26DAX 株は通常の培養条件では特別な表現型は示さなかった。なお、UT26DAX 株由来の hypermutator 株 (後述) では、HYGO 表現型株は出現せず、本表現型における *adhX* の必須性を支持する (Inaba *et al.*, 2020)。UT26DAX 株で *adhX* を高発現させた株も HYGO 表現型を示し (Fig.4), *adhX* の発現が本表現型を引き起こす直接の要因であると結論した。さらに、CO₂ 吸着剤であるソーダ石灰を用いた解析から、HYGO 表現型には大気濃度レベルの CO₂ が必要であり (Fig.4), また、HYGO 表現型での細胞増殖の際に ¹⁴CO₂ の取込が観察されたことから本表現型は CO₂ 依存的であると結論した (Inaba *et al.*, 2020)。

HYGO 表現型株は液体培養では明らかな濁度上昇が

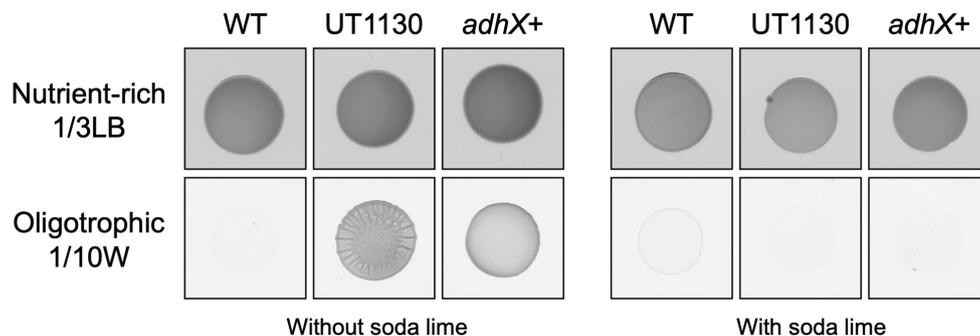


Fig. 4 The CO₂-dependent HYGO phenotype was induced by the expression of the *adhX* gene in UT26 (Inaba *et al.*, 2020). UT26 (WT), Tn-induced HYGO mutant (UT1130), and UT26DAX(pKS13P-*adhX*) (*adhX*+) cells were incubated on 1/3 LB (nutrition-rich) and 1/10 W (oligotrophic) medium for 3 days at 30 °C under CO₂-limited (with soda lime) and non-limited (without soda lime) conditions.

みられず、固体培地の支持体を資化している可能性も考えられた。しかし、精製寒天以外に、より純度の高いアガロースやゲランガムを支持体として用いても同様の現象が観察されること、また、支持体を資化する場合に観察される菌体増殖に伴う固体培地の陥没現象もみられないことから、その可能性は低いと思われた。実際、colony forming unit (cfu) を測定することで、液体培地でも HYGO 表現型が観察された (Fig.5)。

さらに、液体培地で継代培養を行っても HYGO 表現型が観察されることから、栄養培地で増殖した際の細胞内の蓄積物が OG 表現型に必要である可能性も否定された (Fig.6)。

以上、HYGO 表現型では大気中の CO₂ などの成分を主な炭素源として増殖している可能性が高いと考えられた。

大腸菌で発現・精製した *adhX* 産物の AdhX は、メタノールやエタノールなどのアルコールに対して ADH 活性を示した (Inaba *et al.*, 2020)。また、ADH 活性に重要なアミノ酸残基に変異を導入し、ADH 活性を失った AdhX (C42A) および AdhX (T44A) を発現する UT26DAX 株は HYGO 表現型を示さず、弱い ADH 活性を持つ AdhX (H43R) を発現する UT26DAX 株は弱い HYGO 表現型を示した (Inaba *et al.*, 2020)。すなわち、AdhX の ADH 活性の強さと HYGO 表現型には相関関係があり、AdhX の ADH 活性が HYGO 表現型に必要であると考え

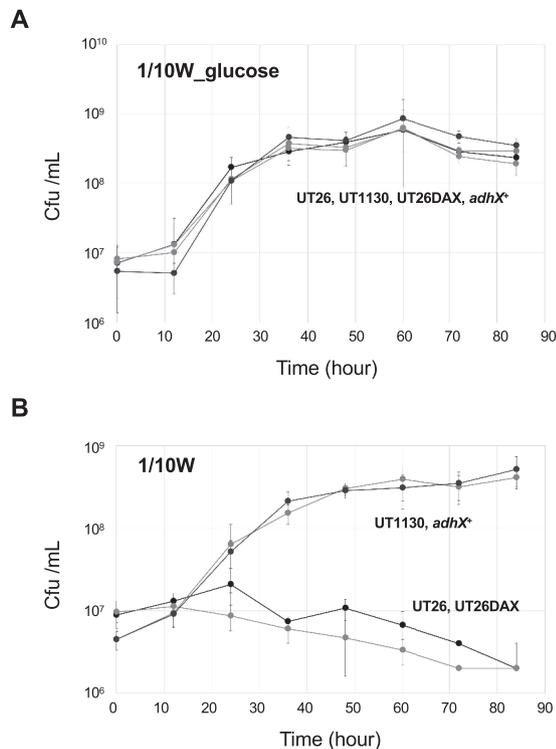


Fig.5 Growth of HYGO strains in liquid medium (Inaba *et al.*, 2020). UT26 (WT), UT1130, UT26DAX and UT26DAX(pKS13P-*adhX*) (*adhX*⁺) cells precultured on 1/3 LB agar plate were incubated in 1/10 W with glucose (A) and without the addition of any organic carbon sources (B), and the number of colony-forming units (c.f.u.) was counted. The means of three independent experiments and sd are shown.

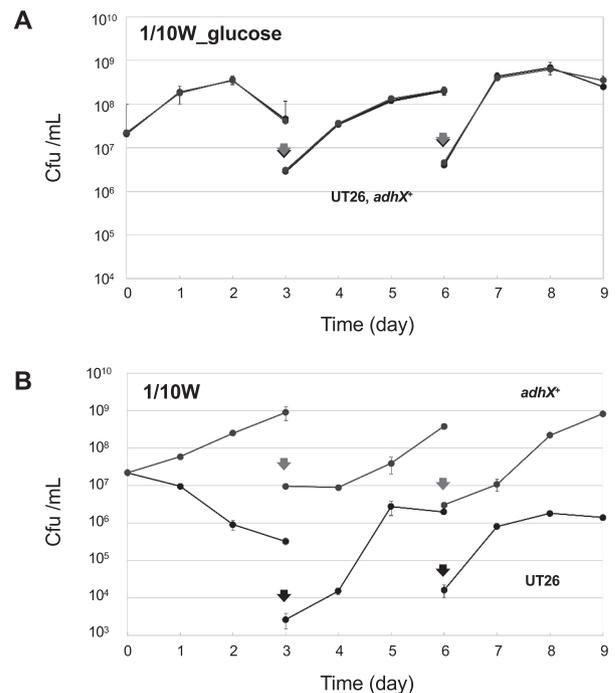


Fig.6 Serial transfer culture of the HYGO strain in liquid medium (Inaba *et al.*, 2020). UT26 (WT) and UT26DAX(pBBR_Pu-*adhX*) (*adhX*⁺) cells precultured on 1/3 LB agar plate were incubated in 1/10 W with glucose (A) and without the addition of any organic carbon sources (B), and the number of colony-forming units (c.f.u.) was counted. The means of three independent experiments and sd are shown. One per cent (v/v) of the culture was transferred to the same fresh medium at the time points shown by the arrows.

られる。

UT26 株は独立栄養細菌の CO₂ 固定機構の鍵酵素遺伝子ホモログは有しておらず、HYGO 表現型において新規の CO₂ 固定経路が機能している可能性も考えられる。そこで、HYGO 表現型に関与する遺伝子の網羅的同定を行った。NGS を用いて Tn 変異株ライブラリー中の Tn カセットの挿入位置を一括して同定可能な Tn-Seq 法が広く用いられている。しかし、従来の Tn-Seq 法は、シーケンスライブラリー調製の際に PCR 増幅を行うために、2本の同じリードが元々2つの鋳型 DNA に由来するのか、ひとつの鋳型 DNA に由来するのか区別がつかない、という定量的な欠点がある。そこで、PCR 増幅の前に固有識別タグを連結する quantitative Tn-Seq (qTn-Seq) 法を開発した。本手法では、同じ固有識別タグを持つリー

ドは元々同じ DNA 分子に由来すると考えてリードデータを処理することで、より定量的な解析が可能である。なお、本手法の開発にあたり、DNA 分子に固有識別タグを効率的に付与するために、核酸関連酵素の特徴を明らかにした (Ohtsubo *et al.*, 2017a; Ohtsubo *et al.*, 2017b; Ohtsubo *et al.*, 2018; Ohtsubo *et al.*, 2019)。約 11,000 クローンからなる HYGO 表現型株の Tn 変異株ライブラリーを作製し、1/3LB (栄養培地)、1/10W (無機培地) + グルコース、1/10W で培養し、それぞれの条件下で増殖した細胞集団の Tn カセット挿入部位を NGS 解析した。リードデータを元に固有識別タグによる標準化とゲノムへのマッピングを行った。その特徴的な一部を Fig.7 に示す。

1/10W 培養細胞特異的にリード数が減少している遺

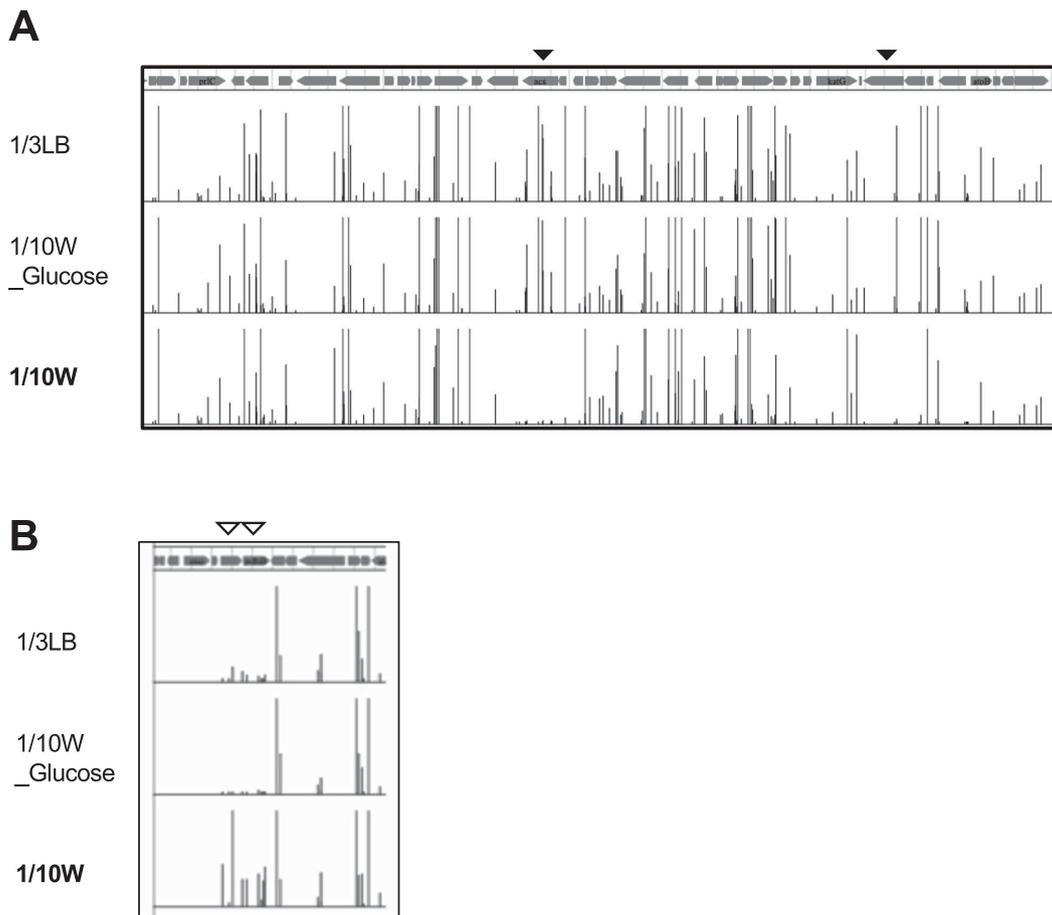


Fig. 7 Examples of qTn-Seq analysis. Abundance of Tn-insertion mutants among cells cultured on 1/3LB, 1/10W_Glucose, and 1/10W were visualized and compared. Genes indicated by black (A) and white triangles (B) are proposed genes important and harmful for HYGO phenotype, respectively.

Table 1 Genes identified by qTn-Seq as ones involved in the HYGO phenotype

Locus Tag	gene	product
Chromosome 1		
SJA_C1-17770	<i>ppdk</i>	pyruvate, phosphate dikinase
SJA_C1-21600	<i>aceB</i>	malate synthase G
SJA_C1-27790	<i>gcvPB</i>	glycine dehydrogenase (aminomethyl-transferring)
SJA_C1-27800	<i>gcvPA</i>	glycine dehydrogenase (aminomethyl-transferring)
SJA_C1-28310	<i>aceA</i>	isocitrate lyase
SJA_C1-28320		XRE family transcriptional regulator
SJA_C1-31210		XRE family transcriptional regulator
SJA_C1-33580	<i>ppc</i>	phosphoenolpyruvate carboxylase
SJA_C1-33720		acetyl-coenzyme A synthetase
SJA_C1-34420		TonB-dependent receptor
Chromosome 2		
SJA_C2-01170		TonB-dependent receptor
SJA_C2-01390		urea carboxylase
SJA_C2-01660	<i>pntB</i>	NAD(P) transhydrogenase subunit beta
SJA_C2-01670	<i>pntA</i>	pyridine nucleotide transhydrogenase subunit alpha
SJA_C2-04280		class II aldolase
SJA_C2-05630	<i>acs</i>	acetyl-coenzyme A synthetase
SJA_C2-05640		pseudoazurin
SJA_C2-05740		DNA-binding response regulator
SJA_C2-05750		GCN5 family N-acetyltransferase
SJA_C2-05790		hybrid sensor histidine kinase/response regulator
SJA_C2-05800		hypothetical protein
SJA_C2-05820	<i>aldH</i>	aldehyde dehydrogenase family protein

伝子がHYGO表現型に関与する遺伝子の候補となる。同定された候補遺伝子のリストをTable 1に示す。

このうち、*aceA*, *aceB*, *ppdk* 遺伝子は、HYGO表現型株の当該遺伝子破壊株・相補株を作製し、スポットアッセイによりHYGO表現型におけるそれら遺伝子の必須性を確認した(Nonoyama *et al.*, unpublished data). *aceA* と *aceB* はグリオキシル酸回路を構成する因子であり(Fig.8), HYGO表現型へのグリオキシル酸回路の関与が明らかになった。

なお、*aceA* と *aceB* は、RNA-Seq解析においても、1/10W培地での増殖細胞で特異的に発現していた(Nonoyama *et al.*, unpublished data). また、*ppdk* 遺伝子がHYGO表現型に必須であり、かつ*pdhAB* 遺伝子の破壊がHYGO表現型で有利である(破壊株の割合がHYGO条件下で増加する)こともqTn-Seq解析から明らかになっており(Fig.7B), ピルビン酸はアセチルCoAではなく、ホスホエノールピルビン酸に流れるこ

とが重要であることが判明した。一方、*AdhX*がアルコールデヒドロゲナーゼであることから、アルコール類・アセトアルデヒド・酢酸資化能とHYGO表現型との関係性を検討した。その結果、野生株では資化できないエタノールが、HYGO表現型株の生育を著しく促進し、アセトアルデヒドと酢酸による生育は*adhX*高発現に依存しなかった(Fig.9)。

さらに、同様の実験を*aceA*, *aceB*, *ppdk* 破壊株・相補株でも実施したところ、エタノールによる生育促進とこれら遺伝子とに明らかな関係性が観察された(Nonoyama *et al.*, unpublished data). 以上の結果をまとめると、HYGO株は低栄養環境下でグリオキシル酸回路でCO₂の放出を抑えつつ、環境中に低濃度で存在するエタノールを主な基質として利用していると考えられる。CO₂を固定ステップとしては、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(Ppc)などのアナプレロティック反応での固定に加えて、ピルビン酸デカルボキ

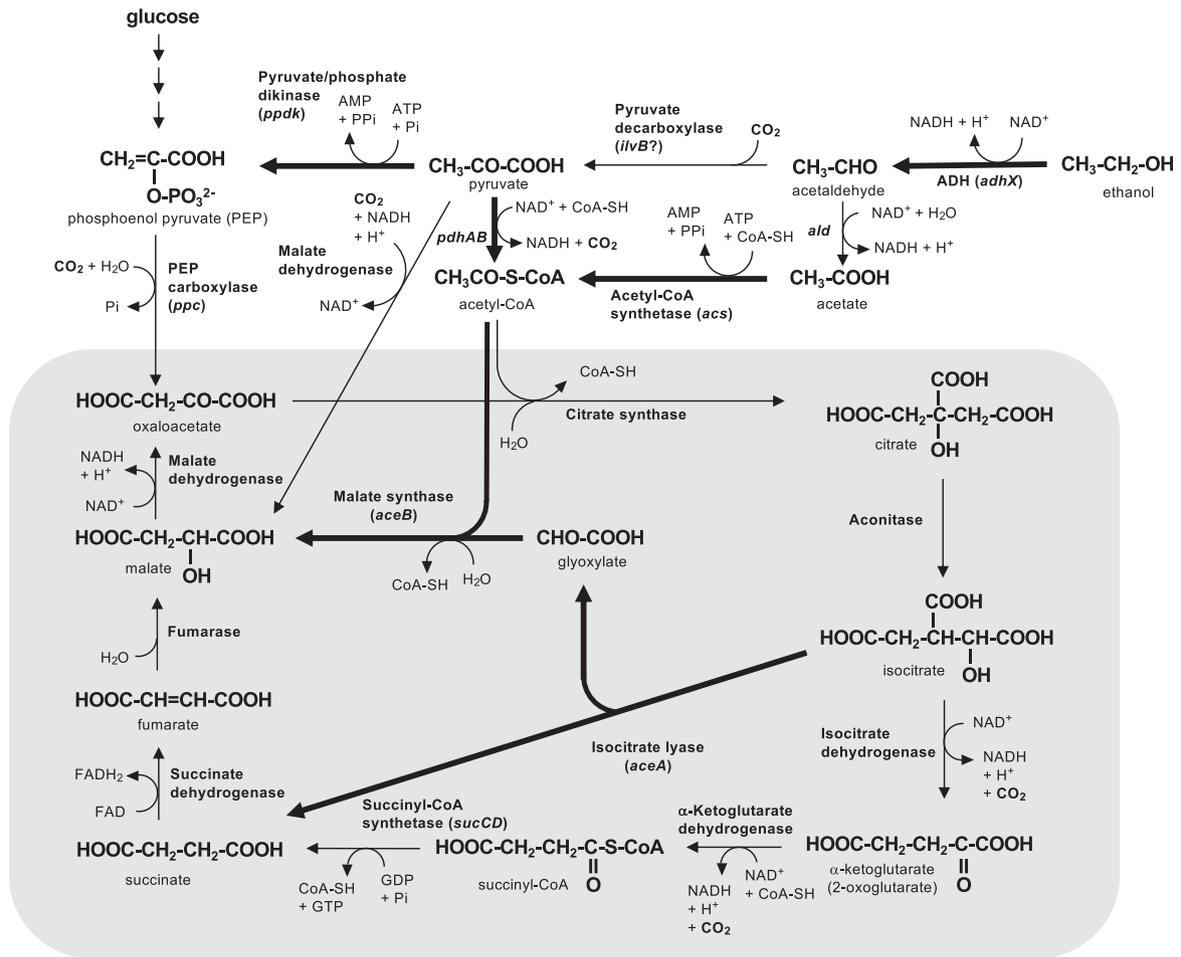


Fig. 8 Metabolic map related to the HYGO phenotype.

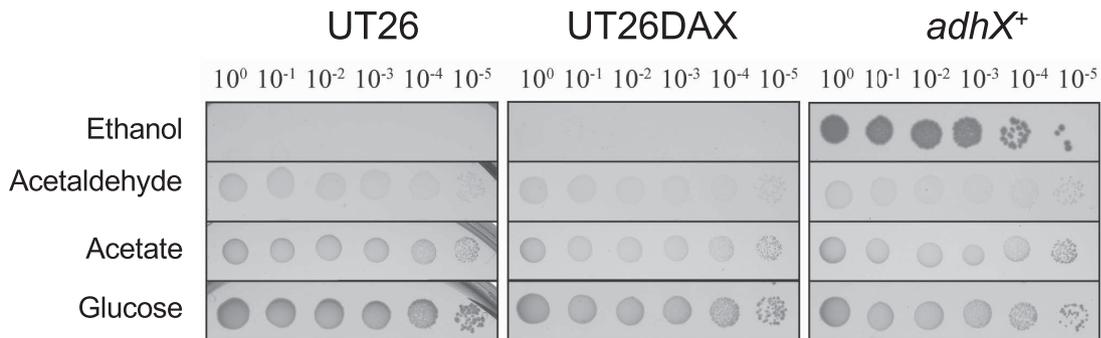


Fig. 9 The HYGO phenotype is related to ethanol utilization. UT26, UT26DAX, and UT26DAX(pBBR_Pu_ *adhX*) (*adhX*⁺) cells were incubated on 1/10 W medium with ethanol, acetaldehyde, acetate, and glucose.

シラーゼ (IlvB) の逆反応や、グリシンデヒドロゲナーゼ (GcvP) などが考えられるが (Fig.8), より詳細な解析が必要である。また、これら代謝酵素に加えて、TonB-dependent receptor like protein (TBDR) をコードする遺伝子がHYGO表現型に重要な遺伝子として同定されたことも興味深い。さらに、制御因子をコードする遺伝子も同定されており、これらについても、今後解析する必要がある。

HYGO表現型は、Tn変異を導入した人工株で最初に観察された現象であり、そもそも細菌にとって生理的に意味のある現象なのかは不明であった。しかし、不均衡変異導入法 (Itakura *et al.*, 2008) を適用したUT26株由来の hypermutator 株を有機炭素源非添加無機固体培地で培養すると、*adhX*を高発現してHYGO表現型を示す突然変異株が比較的高頻度で出現した (Inaba *et al.*, 2020)。さらに、hypermutator 株でなくても低頻度ながらHYGO表現型株は得られ、これら株のリシーケンシングの結果、二成分制御因子の関与が強く示唆された (Inaba *et al.*, unpublished data)。また、レポーター遺伝子を用いた解析で、*adhX*の高発現突然変異は転写抑制因子の脱抑制変異である可能性が強く示唆されている (Inaba *et al.*, unpublished data)。これらの結果から、*adhX*高発現突然変異は比較的起こりやすい変異であり、かつ通常は制御因子の制御下にあると考えられる。すなわち、HYGO表現型は低栄養環境適応機構として生理的に意義のある現象であることが強く示唆される。実際、UT26DAX株の土壤中での生残性が野生型株より劣るという予備的知見も得られており (Kato *et al.*, unpublished data)、何らかの条件下で*adhX*が高発現することが重要な環境適応戦略なのかもしれない。一方、様々なidentityのレベルの*adhX*遺伝子ホモログが生物界に広く存在し、*adhX*と99%以上のidentityを示すほぼ同一の遺伝子も環境に常在するスフィンゴモナッド細菌群の他株に見出される (Inaba *et al.*, 2020)。すなわち、ほぼ同一の*adhX*が16S rRNA遺伝子の系統関係を超えて存在し、かつ、それらの多くがプラスミド上に存在することから、近縁種間での水平伝播が強く示唆される。なお、UT26株では*adhX*遺伝子は染色体上に存在するが、内在性のTnに挟まれた領域に存在するため、同様に水平伝播が示唆される。さらに、UT26株の*adhX*を高発現させることでHYGO表現型を示す他株が存在する (Inaba *et al.*, 2020) ことから、本現象は本細菌群が比較的最近獲得し、環境中で伝播しつつある低栄養環境適応機構なのかもしれない。ただし、類縁性の低い *Betaproteobacteria* 株でもUT26株の*adhX*を高発現させることでOG表現型を示す株が存在すること (Inaba *et al.*, 2020)、他株由来の比較的identityの低い*adhX*ホモ

ログをUT26DAX株で発現させてもOG表現型を示すこと (Sakai *et al.*, unpublished data) などから、基本的な機構自体は、スフィンゴモナッド細菌群だけでなく、多くの環境細菌が利用する普遍性の高いものである可能性も考えられる。

以上、HYGO表現型におけるCO₂固定経路は新規かつ普遍的なものである可能性があり、詳細な機構が解明されれば、多くの環境細菌が有する常温・常圧環境でのCO₂固定機構として生態学的意義が大きいだけでなく、CO₂削減問題への展開も期待できる。また、発酵産業において、有用微生物を培養し物質生産するための培地の費用は抑えるに越したことはない。従属栄養細菌が低栄養環境で生残し、積極的に増殖する機構が解明されれば、こうした有用細菌の培養において、栄養源の添加量を抑えた効率的な培養法が開発できるかもしれない。一方、浄水や工業パイプライン、医療器具など、低栄養と思われる環境でも有害細菌が増殖し、問題となるケースが多い。HYGO表現型の機構は、こうした有害細菌の低栄養環境での増殖機構とも関連している可能性が考えられ、有害細菌の増殖抑制による汚染防止技術への展開も期待できる。さらに、環境バイオテクノロジーの観点からは、分解菌を汚染環境に接種するバイオオーグメンテーションへの直接的応用が期待できる。実際、HYGO表現型株は、そもそも γ -HCH高効率分解株として単離されたものであり、先述のように*adhX*がUT26株の土壤中での生残に重要であるという予備的知見も得られている。バイオオーグメンテーションでは、分解菌が汚染環境に定着せず、十分な分解能を発揮しないことがしばしば問題となっており (Ramos *et al.*, 2011)、そうした問題解決の切り札となるかもしれない。

要 約

本研究では、細菌の環境適応・進化に関する細胞機能に関する知見を得ることを目的として、 γ -HCH分解資化細菌 *Sphingobium japonicum* UT26株の分解代謝酵素以外の γ -HCH資化に必須な因子であるABCトランスポーター LinKLMNと、本株の低栄養環境での増殖現象について解析を行った。その結果、LinKLMNは、細胞膜成分の輸送を介して細胞外膜のintegrityに関与するという仮説が支持された。さらに、LinKLMN特有の機能を規定する因子と考えられるLinMとLinNが、それぞれ多量体を形成し、互いに相互作用する可能性を示唆する結果が得られた。特にLinNについては、8量体構造であることがTEM解析により強く示唆された。一方、UT26株がアルコールデヒドロゲナーゼをコードする*adhX*遺伝子の高発現で炭素源非添加の無機培地でCO₂

依存的に細胞増殖する現象 (HYGO 表現型) を見出した。本現象は、広く環境細菌が有する機能である可能性が示唆された。独自に開発した qTn-Seq 法などにより機構解明を進めたところ、HYGO 表現型株は、低栄養環境下でグリオキシル酸回路で CO₂ の放出を抑えつつ、環境中に低濃度で存在するエタノールを主な基質として利用して増殖している可能性が示唆された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表・ポスター発表

- 1) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. 逆転写酵素の強い tailing 活性と解析ソフト TraceViewer. 第11回日本ゲノム微生物学会年会 (3月2-4日, 藤沢)
- 2) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. マウス白血病ウイルス由来逆転写酵素の N-tailing 活性と解析ツール TraceViewer. 日本農芸化学会2017年度大会 (3月17-20日, 京都)
- 3) 稲葉慎之介, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2017. 環境常在細菌に見出された新規低栄養環境適応機構に関する研究. 日本農芸化学会2017年度大会 (3月17-20日, 京都)
- 4) Inaba, S., Kato, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. 2017. Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces the oligotrophic growth with carbon dioxide fixation. The 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017) (July 6-13, Valencia, Spain)
- 5) Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. Strong N-tailing activity and specific enhancers of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase toward blunt DNA ends. 15th International Union of Microbiological Societies (IUMS2017) (July 17-21, Singapore)
- 6) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. 定量的 TnSeq 解析法の構築と PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株の全必須遺伝子の同定. 第2回環境微生物系学会合同大会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 7) 稲葉慎之介, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2017. 極貧栄養環境での生育能を獲得した好気性従属栄養細菌突然変異株の解析. 第2回環境微生物系学会合同大会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 8) 大坪嘉行, 佐々木春菜, 永田裕二, 津田雅孝. 2018. 逆転写酵素を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析手法の確立. 第12回日本ゲノム微生物学会年会 (3月5-7日, 京都)
- 9) 稲葉慎之介, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 好気性従属栄養細菌における極貧栄養環境適応変異株の解析. 第12回日本ゲノム微生物学会年会 (3月5-7日, 京都)
- 10) 稲葉慎之介, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 好気性従属栄養細菌株由来の極貧栄養環境での生育能を獲得した突然変異株の解析. 日本農芸化学会2018年度大会 (3月15-18日, 名古屋)
- 11) 佐藤緋奈子, 中鉢千尋, 佐藤優花里, 矢野大和, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 細菌の有機塩素系殺虫剤資化に必須な ABC トラnsポーターホモログの機能解析. 日本農芸化学会2018年度大会 (3月15-18日, 名古屋)
- 12) 大坪嘉行, 佐々木春菜, 永田裕二, 津田雅孝. 2018. 逆転写酵素の tailing 活性と新規 TSLR 反応を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析. 日本農芸化学会2018年度大会 (3月15-18日, 名古屋)
- 13) Inaba S., Kato, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. 2018. 従属栄養性土壌細菌の超貧栄養環境に対する適応機構 Adaptive mechanism of heterotrophic soil bacteria toward ultra-oligotrophic conditions. 日本微生物生態学会第31回大会 (7月11-13日, 沖縄)
- 14) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2019. 超音波処理剪断 DNA の 3' 末端の高効率修復. 第13回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 東京)
- 15) 稲葉慎之介, 酒井洋範, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 従属栄養細菌の栄養源制限下における適応増殖メカニズム. 第13回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 東京)
- 16) 酒井洋範, 稲葉慎之介, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. アルコールデヒドロゲナーゼ *AdhX* 遺伝子依存的貧栄養環境適応機構の普遍性. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 17) 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2019. qTnSeq 法の開発と PCB 分解細菌への適用. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 18) 尾形拓哉, 中鉢千尋, 佐藤優花里, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 有機塩素系殺虫剤の微生物分解に関わる MCE superfamily タンパク質 LinM はホモオリゴマー複合体を形成する. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 19) 尾形拓哉, 佐藤優花里, 永田裕二. 2019. *Sphingobium japonicum* UT26 株の有機塩素系殺虫剤分解に関わる ABC トラnsポーターの解析. 日本生化学会東北支部第85回例会 (6月8-9日)
- 20) 酒井洋範, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 環境細菌における *adhX* 遺伝子が関与する貧栄養環境適応機構の普遍性. 日本微生物生態学会第33回大会 (9月10-13日, 甲府)
- 21) 逸見裕太郎, 永田裕二, 津田雅孝, 大坪嘉行. 2020. qTnSeq 法を利用した PCB/ビフェニル分解菌の分解制限要因の同定と排除. 第14回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 名古屋)
- 22) 鈴木達也, 相馬隆光, 加藤広海, 豊福雅典, 野村暢彦, 永田裕二. 2020. 有機塩素系殺虫剤分解能を持つフィンゴモナッド細菌株の membrane vesicle 形成. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 23) 酒井洋範, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2020. 培養条件検討から *adhX* 遺伝子依存的貧栄養環境生育機構に迫る. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 24) 大坪嘉行, 酒井啓一郎, 永田裕二, 津田雅孝. 2020. 超音波で断片化した DNA の 3' 端と効率の修復. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 25) 逸見裕太郎, 永田裕二, 大坪嘉行. 2021. 新規 qTnSeq 法の開発: PCB/ビフェニル分解菌への適用と 2 つの指標値の導入. 第15回日本ゲノム微生物学会年会 (3月5-6日, オンライン)
- 26) 永田裕二. 2021. 従属栄養細菌の極貧栄養環境での CO₂ 依存的な増殖現象. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, オンライン) シンポジウム「細菌の低栄養環境

に対する増殖を伴う適応機構」

- 27) 野々山翔太, 柳熙盟, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二.
2022. qTn-Seq法を用いた*Sphingobium japonicum* UT26株
の超低栄養環境での増殖に関わる遺伝子の同定. 日本農
芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)

原著論文

- Ohtsubo Y., Nagata Y. & Tsuda M. 2017. Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 41769.
- Ohtsubo Y., Nagata Y. & Tsuda M. 2017. Compounds that enhance the tailing activity of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Scientific Reports* **7**: 6520.
- Ohtsubo Y., Sasaki H., Nagata Y. & Tsuda M. 2018. Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA Research* **25**: 477-487.
- Ohtsubo Y., Sasaki H., Nagata Y. & Tsuda M. 2019. Properties and efficient scrap-and-build repairing of mechanically sheared 3' DNA ends. *Communications Biology* **2**: 409.
- Inaba S., Sakai H., Kato H., Horiuchi T., Yano H., Ohtsubo Y., Tsuda M. & Nagata Y. 2020. Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology* **166**: 531-545.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 永田裕二 従属栄養細菌のCO₂依存的な極貧栄養環境適応. 2020. バイオサイエンスとインダストリー **78**: 498-500.
- 永田裕二, 加藤広海, 大坪嘉行 従属栄養細菌の極貧影響環境でのCO₂依存的な増殖現象. 2022. 環境バイオテクノロジー学会誌 **22**: in press.

謝 辞

本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また, 本研究の遂行にご協力いただいた東北大学大学院生命科学科の野々山翔太博士 (現 東京工業大学), ちとせ研究所の堀内貴之氏, 釘宮理恵氏, ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。また, 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B) (永田裕二 19H02865), 挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877; 佐藤優花里 16K14908), ならびに東北大学男女共同参画推進センター (TUMUG) が実施する TUMUG 支援事業 (男女共同参画・女性研究者支援事業) の支援 (佐藤優花里) にも感謝致します。

文 献

Casali, N. & Riley, L. W. (2007). A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales mce* operons. *BMC Genomics* **8**: 60.

- Dennis, J. J. & Zylstra, G. J. (1998). Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2710-2715.
- Ekiert, D. C., Bhabha, G., Isom, G. L., Greenan, G., Ovchinnikov, S., Henderson, I. R., Cox, J. S. & Vale, R. D. (2017). Architectures of lipid transport systems for the bacterial outer membrane. *Cell* **169**: 273-285 e217.
- Endo, R., Kamakura, M., Miyuchi, K., Fukuda, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2005). Identification and characterization of genes involved in the downstream degradation pathway of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J Bacteriol* **187**: 847-853.
- Endo, R., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2007). Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for utilization of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26. *J Bacteriol* **189**: 3712-3720.
- Hisano, T., Kimura, N., Hashimoto, W. & Murata, K. (1996). Pit structure on bacterial cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 979-982.
- Imai, R., Nagata, Y., Senoo, K., Wada, H., Fukuda, M., Takagi, M. & Yano, K. (1989). Dehydrochlorination of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-BHC) by gamma-BHC-assimilating *Pseudomonas-paucimobilis*. *Agri Biol Chem* **53**: 2015-2017.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology (Reading)* **166**: 531-545.
- Itakura, M., Tabata, K., Eda, S., Mitsui, H., Murakami, K., Yasuda, J. & Minamisawa, K. (2008). Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7258-7264.
- Ito, M., Prokop, Z., Klvana, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., Damborsky, J. & Nagata, Y. (2007). Degradation of beta-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from gamma-hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. *Arch Microbiol* **188**: 313-325.
- Kaczmarczyk, A., Vorholt, J. A. & Francez-Charlot, A. (2012). Markerless gene deletion system for sphingomonads. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3774-3777.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kuznetsov, S. I., Dubinina, G. A. & Lapteva, N. A. (1979). Biology of oligotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**: 377-387.
- Lundstedt, E., Kahne, D. & Ruiz, N. (2021). Assembly and maintenance of lipids at the bacterial outer membrane. *Chem Rev* **121**: 5098-5123.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 741-752.
- Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y. & Tsuda, M. (2019). Lessons

- from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. *Environ Microbiol Rep* **11**: 630-644.
- Ohashi, Y., Soler, N., Garcia Ortegón, M., *et al.* (2016). Characterization of Atg38 and NRBF2, a fifth subunit of the autophagic Vps34/PIK3C3 complex. *Autophagy* **12**: 2129-2144.
- Ohhata, N., Yoshida, N., Egami, H., Katsuragi, T., Tani, Y. & Takagi, H. (2007). An extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, isolated from crude oil. *J Bacteriol* **189**: 6824-6831.
- Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2017a). Compounds that enhance the tailing activity of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Sci Rep* **7**: 6520.
- Ohtsubo, Y., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2017b). Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Sci Rep* **7**: 41769.
- Ohtsubo, Y., Sakai, K., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2019). Properties and efficient scrap-and-build repairing of mechanically sheared 3' DNA ends. *Commun Biol* **2**: 409.
- Ohtsubo, Y., Sasaki, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. (2018). Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase. *DNA Res* **25**: 477-487.
- Ramos, J. L., Marques, S., van Dillewijn, P., *et al.* (2011). Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation. *Trends Biotechnol* **29**: 641-647.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Stolz, A. (2009). Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**: 793-811.
- Stolz, A. (2014). Degradative plasmids from sphingomonads. *FEMS Microbiol Lett* **350**: 9-19.
- Wang, H., Zhu, P., Zhang, Y., Sun, K. & Lu, Z. (2018). *ndpT* encodes a new protein involved in nicotine catabolism by *Sphingomonas melonis* TY. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 10171-10181.
- White, D. C., Sutton, S. D. & Ringelberg, D. B. (1996). The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 301-306.

略語一覧

- ABC transporter: ATP-binding cassette transporter
 ADH: alcohol dehydrogenase
 HCH: hexachlorocyclohexane
 HYGO: high-yield growth under oligotrophic conditions
 LPS: lipopolysaccharide
 MCE: mammalian cell entry
 TBDR: TonB-dependent receptor
 TEM: transmission electron microscope
 Tn: transposon

細菌集団の形成と進化

矢野 大和, 加藤 広海, 永田 裕二

東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発寄付講座
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1

Formation and evolution of bacterial populations

Hirokazu Yano, Hiromi Kato, Yuji Nagata

Laboratory of Microbial Evolution and Function Research,
Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980,-8577

To gain insight into principles of bacterial population formation and evolution and to obtain basic knowledge that will contribute to practical applied technologies such as bioremediation, we investigated bacterial cell populations capable of degrading organochlorine pesticide, γ -HCH. The clonal γ -HCH-degrading bacterial cell population was repeatedly subcultured on spatially structured solid medium, and cell lines with partial chromosomal deletions spontaneously emerged and continued to coexist with ones without such deletions. One of the mechanisms underlying the coexistence of different cell lines was the mutation of the TBDR homologue gene, which results in increased membrane permeability and aggregation of cells. In general, our results suggest that the coexistence of cell lines with partial chromosomal deletions with ones without such deletions is established by the guaranteed niche partitioning of resources or space. On the other hand, in a heterogeneous population of γ -HCH-degrading bacteria, (i) the degrading bacteria did not become the dominant genus even after repeated subculturing in liquid medium with γ -HCH as the sole carbon source, and (ii) the giant colonies showing the long-term γ -HCH degradation activity were formed only when non-degrading bacteria coexisted on solid medium with γ -HCH as the sole carbon source, indicating the importance of non-degrading bacteria in the γ -HCH-degrading bacterial community. Analysis of bacterial strains isolated from this community revealed the phenomenon of directional colony growth (DCG), in which non-degrading bacteria prolong their colonies toward the degrading bacteria. A *Cupriavidus* strain exhibiting DCG was also important for the giant colony formation. The hitchhiking phenomenon, in which non-migratory bacteria use migratory bacteria to expand their habitat, contributed to the expansion of the habitat of γ -HCH-degrading bacteria on solid medium, and was also suggested to be involved in their survival in soil environments, showing the potential of this phenomenon for bioremediation. Furthermore, we found that EPS produced by easily culturable *Burkholderia* selectively promoted the growth of *Verrucomicrobia*, whose cultivation is difficult. This is a new strategy to cultivate non-culturable bacteria by using interaction mechanisms underlying the bacterial population.

Key words: bacterial population, population genetics, bioremediation

緒 言

従来の微生物の研究は、単離培養が基本であり、単独の株の機能解析が中心であった。環境汚染物質分解細菌

の研究においても、単独で当該物質を分解資化できる細菌株が主な研究対象であった。しかし、実際の環境中では単独の株で存在している状況は考え難く、他株との相互作用の中での機能発現について検討する必要がある。また、細菌が新規物質代謝能など、新しい機能を獲得する際にも、単独の株では適応が不十分の機能を他の生物あるいは細胞によって補うケースも考えられる。すなわち、細菌の環境適応・進化を集団としての進化の観点からも考える必要がある。

E-mail: taro.hakko@hakko-u.ac.jp

共同研究者：野村 暢彦（筑波大学 生命環境系）、
山本 達也（筑波大学 生命環境系）、
津田 雅孝（東北大学 大学院生命科学研究科）、
大塚 重人（東京大学 農学生命科学研究科）。

化学物質の微生物分解研究においては、分離培養可能なクローンの同定と、その後の責任遺伝子同定を目的とした研究の報告例が多い。しかし、「毒性のある化学物質を分解しながら持続的に増殖する細胞集団」を構築しようとする場合、現在までに蓄積された科学的知見に基づき、最適化されたゲノムをデザインすることは難しい。生物に普遍的な性質として、遺伝情報を複製して次世代に継承する際、エラー（変異）を導入する性質がある。それが時間経過に伴う生物種の集団の性質の変化（＝進化）の根源となっている。人工環境で微生物培養をする場合、微生物集団の性質がどのように変化するのか、またその過程で集団中にどのような相互作用が生じやすいのか知っておく必要がある。現在、実験設備を比較的選ばない微生物実験進化研究が全盛を誇っており、細菌やウイルスの適応力の高さと、それらが最初から保有している遺伝子の機能的可塑性に注目が集まっている（Lenski, 2017）。実験進化を使用すれば、「化学物質を分解しながら持続的に増殖する細胞集団」の構築方法について手がかりを得ることができるかもしれない。しかし、意外なことに、これまで難分解性化学物質分解微生物や *Alphaproteobacteria* 網細菌を利用した実験進化研究は報告がない。我々は、 γ -HCH を唯一の炭素源として利用できる *Sphingobium japonicum* UT26 株の 1 クローンが IS コピー間の相同組換えや、IS の転移により染色体の一部を欠失した変異体を生み出すことを見出している（Nagata *et al.*, 2013）。転移活性のある IS を保有している本細菌を利用し、遺伝的多様性を集団内に維持しやすいといわれている空間構造がある環境を利用すれば、比較的短期間に自然生態系で見られるような細胞間の依存関係が誕生すると期待された。そこで、我々は、本細菌の 1 クローンを出発点とする実験進化を、毒性のある化学物質（すなわち γ -HCH）を含む平板培地、さらにグルコースがある平板培地の 2 種類の条件で行い、細菌集団の多様化のパターンに法則性が見つけられるかどうか検証した。

これまでに、複数細菌叢からなる HCH 集積培養系の研究は数が少ないものの幾つか報告されている。Mohn (2006) らの研究では、スペインの HCH 汚染土壌から得られたサンプルを HCH で集積培養した結果、 γ -HCH 分解菌として *Sphingomonas* 属細菌株が分離され、集積培養系においてこれら *Sphingomonas* 属や *Pseudomonas* 属、*Methylobacterium* 属が優占していることが DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) によって明らかにされた。Elcey と Kunhi (2010) は、HCH 汚染土壌から *Pseudomonas* 属、*Burkholderia* 属、*Vibrio* 属、および *Acinetobacter* 属に帰属された 9 株と糸状菌 *Fusarium* 属の 1 株から構成されるコミュニティを取得

し、これら 10 株は 10ppm の γ -HCH の分解活性を有していること、コミュニティでは 300ppm の γ -HCH を 108 時間で分解できたこと、などを報告している。また、Gebreil と Abraham (2016) は、殺虫剤や除草剤工場付近の土壌を接種源として、 γ -HCH の微結晶上に形成されたバイオフィルムを DGGE 解析し、*Sphingomonas* 属、*Pseudomonas* 属、および *Burkholderia* 属などの細菌株が存在していることを明らかにした。これら HCH のコミュニティにおける既存研究では構成員に関する情報はあるものの、コミュニティ内のどの細菌が分解菌なのか遺伝学的レベルで明確に分かっていないケースも多く、またコミュニティとしての生物学的意義を検証している研究は少ない。将来的に γ -HCH による環境汚染の浄化への応用に結びつけるためには、遺伝学的レベルで HCH 分解コミュニティを解析することで、コミュニティにおける分解菌と非分解菌それぞれの役割を明らかにすることが求められている。我々は、HCH 汚染土壌を接種源として γ -HCH を唯一の炭素源とした無機塩培地で集積培養することで、HCH 分解活性を有する細菌コミュニティ EB2 を取得した。これまでに、EB2 から分離された細菌株の解析やショットガンメタゲノム解析によって、*lin* 遺伝子群を有する *Sphingobium* sp. TKS 株 (Tabata *et al.*, 2016) が EB2 の主要な分解菌と考えられること、EB2 から *Cupriavidus* sp. TKC 株や *Pseudomonas* sp. TKP 株 (Ohtsubo *et al.*, 2014) など HCH 分解活性を示さない細菌株も単離されること、が明らかになった。分解菌 TKS 株を HCH 寒天培地で単独で培養すると、分解活性が弱く小さな褐色のコロニーを形成したが、EB2 を培養すると活性を長期維持する不定形の大きなコロニーを形成した。これらは分解菌と周囲の非分解菌との間に何らかの相互関係があることを示唆するが、どのような関係性が形成され得るかに関する知見はほぼ皆無である。そこで本研究では、HCH 分解細菌コミュニティ EB2 に着目し、その複合微生物系の系統的・機能的安定性や、TKS 株と非分解細菌株との関係性を明らかにすることで、EB2 コミュニティの形成原理を明らかにすることを目的とした。

土壌環境は優占種・希少種を含め数万種以上の細菌種が存在しているが、人類が純粋培養に成功した細菌種は極めて偏った分類群の一部にしか過ぎない (Amann *et al.*, 1995)。微生物機能の解析や有効利用のためには、目的の株を純粋分離できれば大きなアドバンテージとなる。純粋培養できない主因のひとつとして、微生物間の相互作用が十分に理解されていないことがあげられる。すなわち、微生物間の相互作用の原理を理解することで、新しい難培養細菌の純粋分離法を開発することも可能であると考えられる。我々は、土壌細菌叢の再構成過程に関

する多くのデータを持っており、その中で、易培養性の *Burkholderia* の次に難培養性の *Verrucomicrobia* が割合を増やすことに注目した。 *Verrucomicrobia* は土壤環境をはじめ淡水、海洋、地熱、高塩分およびヒトの腸内などさまざまな環境において世界的に分布している一方で、分離培養に成功した例は極めて多様な系統の中のごく一部に限られている。 *Verrucomicrobia* をはじめ、 *Acidobacteria* (Kalam *et al.*, 2020) や PVC グループ (*Planctomycete*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*) (Wagner & Horn, 2006; Wong *et al.*, 2020) などは土壤細菌叢の中で優占しているにも関わらず、分離培養例がほとんどないことから、存在のみが確認されている微生物、いわゆる microbial dark matter として知られている。これら難培養性細菌については、メタゲノムの情報を応用することで微生物のゲノム解析と純粋培養をより促進させることが期待されている (Handelsman, 2004) 本研究では、 *Burkholderia* と *Verrucomicrobia* の間にどのような相互作用が存在するのか、特に *Burkholderia* の細胞外マトリクスの構成要素である細胞外多糖類 (extracellular polysaccharide: EPS) を介した相互作用について検討した。

実験方法

クローナルな γ -HCH 分解細菌集団の実験進化

Sphingobium japonicum U26 株の *linA* 遺伝子下流に緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を挿入した SHY12 株を構築し、これを祖先株とした。染色体断片 (*linA* 領域) を保有している系統から当該領域を欠失した系統が派生した際、蛍光顕微鏡観察により、コロニー内の区画として、それらの細胞集団を検出できる。使用した培地は、1/3LB 液体培地、グルコース最小培地 (グルコース濃度: 93.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 γ -HCH 最小培地 (γ -HCH 濃度: 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) である。さらに、細胞が放出する物質に他の細胞の増殖を促進する効果があるかどうか調べるため、グルコース最小液体培地で特定のクローンを4日間生育させて得た培養液を濾過して得た溶液を、最終濃度40%になるようにグルコース最小培地に加えることで作製したスペント培地を使用した。

平板培地上で祖先株を培養し続けた際、細胞密度が最大で 10^9 (cells/plate) に到達するように炭素源 (グルコースまたは γ -HCH) の濃度を調整した最小培地の平板培地を使用した。各培地につき、祖先集団を5つ用意し、それぞれ独立して、細胞集団の継代培養を行なった。細胞集団を植え継ぐ際に、平板培地上のコロニーを2mLのリン酸緩衝液 (PBS) にプールし、そのうち20 μL を新しい培地に移し、残りをグリセロールと混合してフリーザーアーカイブとして冷凍保存した。 γ -HCH を使

用した実験では1週間おきに、グルコースを使用した実験では2日おきに植え継ぎをし、それを27回繰り返した。

コロニーそのものの観察には Zeiss の正立顕微鏡 LSM880 を用いた。コロニー全体を観察するために物体表面からの反射光 (照射波長: 543nm, 検出波長: 526nm-553nm), 緑色蛍光をもつ細胞を検出するための蛍光観察 (照射波長: 488nm, 検出波長: 491nm-580nm) を行なった。1細胞レベルで細菌の蛍光を検出する際は、平板培地上で生育させたコロニーを PBS に懸濁し、DAPI による核酸の染色を行ったのち細胞懸濁液をスライドガラスに載せカバーガラスで封じた後、Zeiss 倒立顕微鏡 LSM710 を使用して細胞の DAPI および緑色蛍光の検出をした。解析対象サンプルと並行して、祖先株を対照群として培養し集団内の緑色蛍光の分布を調べた。細胞の膜透過性を評価する場合は、顕微鏡観察前に細胞を DAPI と SYTOX-Orange で染色した。画像内の細胞の座標の同定と蛍光シグナルの検出には ImageJ マクロの NucTracer (Syvertsson *et al.*, 2016) を使用した。

同じ進化実験系列の集団から分離された2つの進化型クローン (蛍光タンパク質 ZsGreen1 を保有するものと保有しないもの) のペアが平板または液体培地で共存できるかを調査した。対象となるクローンそれぞれを1/3LB 液体培地で2日間培養した後 PBS で洗浄し、初期濃度が培地あたり 10^7 , かつクローンの比率が9:1または999:1になるようクローンを混合し最小培地に入れた。その後クローンを進化実験と同様の条件で培養し植え継ぎを行った。蛍光タンパク質を発現するクローンとしないクローンの存在比を調べるため、植え継ぎを行う際、細胞集団を PBS に希釈してプレーティングし、コロニーを形成させ、実顕微鏡を利用して蛍光をもつコロニーの同定を行った。

実験進化の過程で集団内に出現した進化型アレルを検出するため、進化型クローンとタックタイムポイントの集団全体のリシーケンシングを行った。ゲノム DNA の調製には Qiagen Genomic Buffer set と Qiagen Genomic tip 100-G を一貫して使用した。NGS ライブラリーの構築には Illumina TruSeq PCR free kit, NGS プラットフォームには NovaSeq 6000 を一貫して使用した。NGS リードのトリミングから進化型アレルの検出までの一連の作業に BreSeq v0.32.1 (Deatherage *et al.*, 2014) を使用した。

SHY125 株が保有していた TonB-dependent receptor (TBDR) 様タンパク質をコードする遺伝子 (locus_tag: SJA_RS16255) の進化型アレルを含む2-kbの領域をスフィンゴモナス属細菌の対立遺伝子置換用ベクター pAK405 (Kaczmarczyk *et al.*, 2012) にクローニングした。

構築したプラスミドをエレクトロポレーション法により祖先株に導入し、プラスミドが染色体に組み込まれたカナマイシン耐性株を得た。さらにストレプトマイシンによるカウンターセクションを経て locus_tag: SJA_RS16255 を進化型アレル (D3) に置換したクローンを複数取得し、それらを SHY170, SHY173, SHY177 と命名した。液体培地で培養した際の凝集性および膜透過性を、これらの組換え体と祖先株、さらに進化株との間で比較した。

祖先株と進化株の平板培地の上での適応度を CFU (Colony forming unit) を指標にした増殖曲線解析によって評価した。あらかじめグルコース最小平板培地に順応させた細胞の冷凍ストックをグルコース最小液体培地に移し 2 日間培養した後、培地あたり 10^7 程度になるように一株につき 13 枚以上の平板培地に塗布した。平板培地上の生細胞数を推定するため、8 時間おきに平板培地を 1 枚取り出し、平板培地上の細胞集団を PBS に懸濁して段階希釈液を作り、それを新しい 1/3LB 培地にスポットして培養した。培養 2 日後に 1/3LB 培地上の CFU を元にグルコース最小培地上の CFU を推定した。平板培地での培養は 96 時間継続し、13 タイムポイントの CFU 測定を行った。これを 3 種類の培地: (A) グルコース最小培地, (B) SHY125 スペント培地, (C) SHY126 スペント培地について行い、各株につき 3 つの複製実験を行った。R の Grofit Package (v 1.1.1) を用いた増殖曲線解析を用いて各株の最大増殖速度を求めた。

ヘテロな細菌集団の構成原理と応用への展開

γ -HCH 分解能を有する細菌集団 EB2 のコミュニティとしての安定性を調べるために、EB2 を γ -HCH を唯一の炭素源とする無機塩液体培地で 5 代にわたり継代培養し、各代の培養集団について分解活性 (機能)、菌叢構造、および γ -HCH 分解関連遺伝子の存在量を調べ、EB2 の系統的・機能的安定性について検討した。50 ppm の γ -HCH を含む無機塩液体培地 10 mL に EB2 を接種して 25°C で振盪培養した。 γ -HCH が分解された時点で培養液 100 mL を新しい培地に接種することで継代を行った。5 つの並列サンプルについて 5 代まで継代を行い、 γ -HCH 分解時点の培養液からメタゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによる菌叢解析を行った。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅し、イルミナ社製 MiSeq によるシーケンスを実施し、得られたリードのクオリティフィルタリング、97% 相同性による OTU (Operational Taxonomical Unit) クラスタリング、RDP classifier (Wang *et al.*, 2007) による各 OTU の系統アサインを行った。EB2 を培養すると γ -HCH 分解活性を長期維持する不定形の大きなコロ

ニーを形成することから、EB2 は固体培地表面上において何らかの相互作用が存在すると予想される。そこで分解菌である TKS 株と非分解菌である TKP 株または TKC 株を R2A 寒天培地で混合培養し、実体顕微鏡下において各コロニーの生長を観察した。

非分解菌による分解菌のコロニー拡大をさらに検討するために、高い swarming (固体培地上で集団で移動する現象) 活性を示す細菌株との混合培養を行った。畑地土壌の懸濁液を寒天培地に接種して培養し、swarming 活性のある細菌株を分離した。分離株と TKS 株を 1/3LB 寒天培地または γ -HCH を添加した 1/3LB 寒天培地上で混合培養し、TKS 株のコロニー拡大範囲を純粋培養と比較した。さらに swarming 活性のある細菌株との混合培養が TKS 株の土壌での生残性に与える影響を評価した。ガンマ線滅菌した畑地土壌に分離株と TKS 株を混合接種し、両株の生残性を CFU (Colony Forming Unit) で測定し、純粋培養の場合と比較した。

Burkholderia には細胞外多糖類 (extracellular polysaccharide: EPS) を産生する株が多く存在する。そこで *B. caribensis* Bcrs1W 株の EPS を添加した無機塩培地を用いて、難培養性細菌株の分離を試みた。EPS を添加した無機塩固体培地に畑地土壌の懸濁液を接種し、長期間培養した。形成された様々なコロニーに対して、単コロニー分離を繰り返して純粋分離株を取得した。16S rRNA 遺伝子配列を解読することで純粋培養した株の系統分類を行った。*Burkholderia* 細菌株が生産する EPS によって集積される土壌細菌の系統学的特徴を明らかにする目的で、土壌から抽出した微生物群集を EPS を唯一の炭素源とする無機塩培地で集積培養し、16S rRNA アンプリコンシーケンスによって細菌叢解析を行った。培養時の細菌叢の増加を濁度によって測定するために、*B. multivorans* ATCC 17616 株が生産する透明度の高い EPS を基質として使用した。集積培養系から経時的に菌液を採取してメタゲノム DNA を抽出し、16S rRNA のアンプリコンシーケンスによる菌叢構造の解析を行った。

結果と考察

クローナルな γ -HCH 分解細菌集団の実験進化

染色体の *linA* 遺伝子座のレポーターとして緑色蛍光タンパク質遺伝子を挿入した株 SHY12 を構築した。*linA* 遺伝子座周辺の保持は、環境条件によっては *Sphingobium japonicum* のクローン集団の適応度に、正、負、または中立に働くと予想される。*linA* 領域を保有していることに基本的に正の選択が働くと想定される γ -HCH 最小培地、および単独培養時に *linA* 遺伝子座周

辺の保持に対し、正、負どちらの選択が働くか不明なグルコース最小培地の2種類の平板培地を用い、各培地につき独立した5つのバッチを準備し、各バッチで生育させた細胞集団の植え継ぎを繰り返した。一回の植え継ぎで、集団は平均して6.6世代経る。

本研究では、平板培地上のコロニー内の蛍光分布を、共焦点顕微鏡を用いて調べることで集団内に染色体の部分欠失を持つ株が出現し、その頻度を増やした時点の検討をつけ、27回目の植え継ぎを終えるまで、合計28タイムポイントの集団のフリーザーアーカイブを作製した。10タイムポイントの細胞集団に対し、1細胞レベルでの蛍光顕微鏡観をおこない、得られた画像の解析により緑色蛍光を持つクローンが占める割合を定量した。その結果、10系列のうち7系列（HCH-B, HCH-D, Glu-A, Glu-B, Glu-C, Glu-D, Glu-E）においては複数のタイムポイントで蛍光を持たない細胞が出現していた（Fig.1）。

系列Glu-E, Glu-DではタイムポイントT27までに蛍光を持たない系統が集団を占拠した。系列Glu-A, Glu-B, Glu-CおよびHCH-Bでは蛍光をもつ細胞と蛍光を持たない細胞の共存が続いていた。他の系列では、顕微鏡観察で蛍光が非常に弱い細胞が見つかることはあったが、追

加で行ったフローサイトメーターを用いたスクリーニングで完全に蛍光を失った細胞が得られることはなかった。

タイムポイントT27の10の進化後集団のゲノムシーケンシングを行ったところ、Glu-A, Glu-B, およびGlu-CにおいてUT26株のTBDR様タンパク質をコードする遺伝子（locus_tag: SJA_RS16255）のコード領域へのフレーム内欠失を含むNGSリードが検出された。このことから、ある平板培地環境では、TBDRが自然選択の標的となりやすいことが示された。さらにGlu-A, Glu-B系列の全てのフリーザーアーカイブのリシーケンシングを行ったところ、TBDR変異は集団内の代表的な変異であり、進化実験の初期で生じた後、中程度の頻度で集団内に維持され続けていることが判明した（Fig.2）。

またTBDRの進化型アレルを保有する株は、祖先株よりも凝集しやすく、膜の透過性が高いという性質を有していた（Fig.2BC）。

緑色蛍光を持たないコロニー区画が生じていた6つの系列から分離した、蛍光を持たない複数の進化型クローンのゲノム解読を行ったところ、それらのクローンは、想定通り、*linA*を含む30kbや56kbの領域の欠失を保有していたが、ゲノムの他の部分においては、大規模な欠失は観察されなかった。また、HCH-B系列から分離

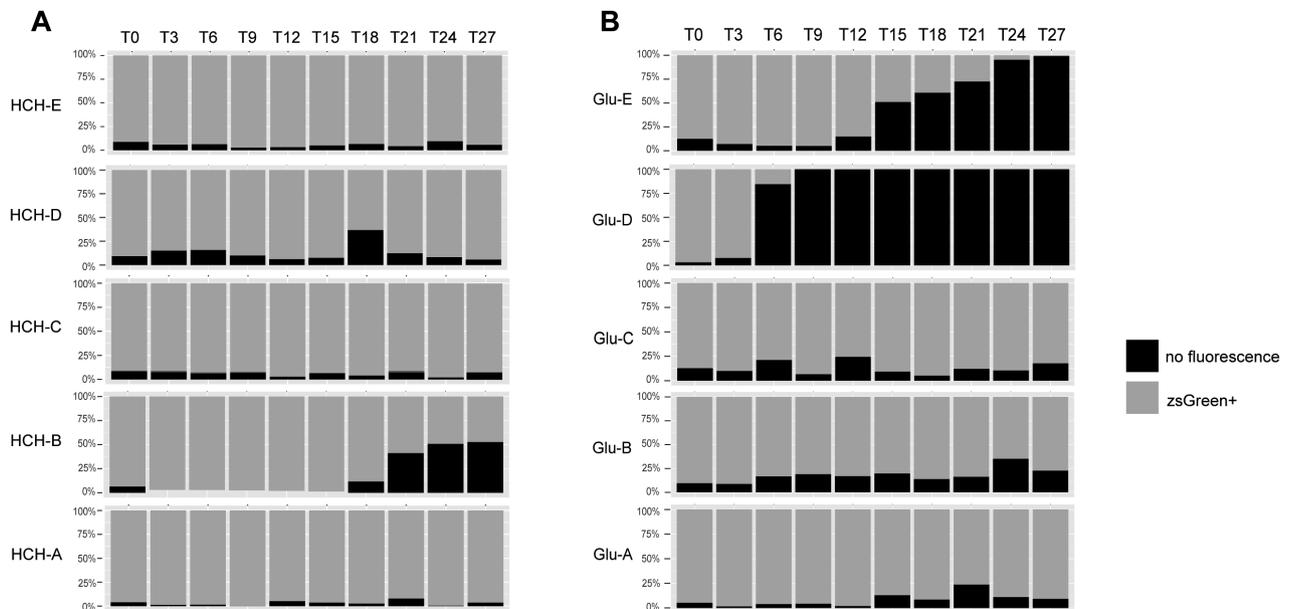


Fig. 1 Coexistence of nonfluorescent and fluorescent cells in evolving populations. (A) Five population lineages evolved on g-HCH minimal agar plates. (B) Five population lineages evolved on glucose minimal agar plates. Up to 5 % cells in each population can be regarded as nonfluorescent cell due to the nature of data analysis.

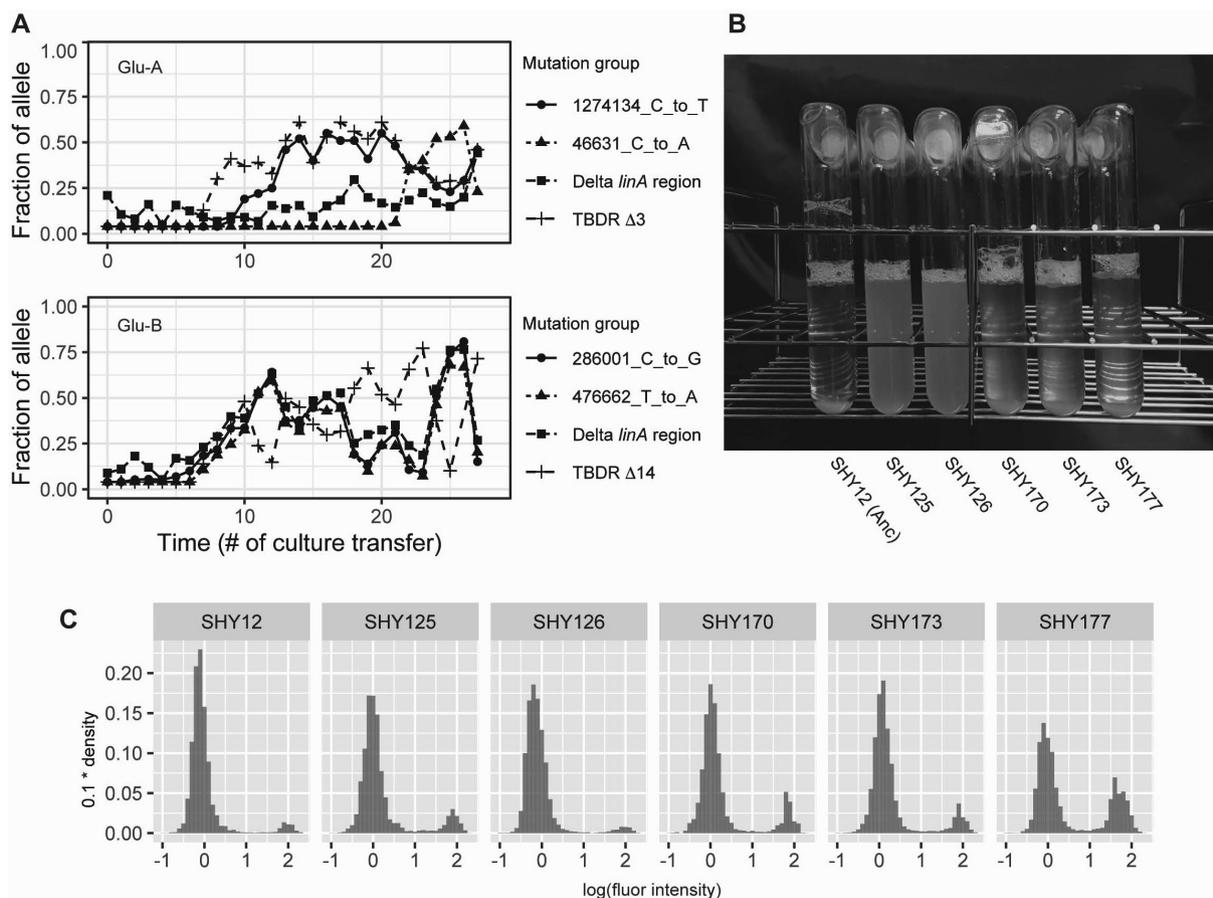


Fig. 2 Parallel evolution of TonB-dependent receptor homolog. (A) Frequency of newly emerged alleles. Evolved DTBR allele exceed 20 % before time point T9 in both Glu-A and Glu-B. Delta *linA* region denotes the value of (1 - median of *linA* coverage)/ median of chromosome 1 coverage. (B) Appearance of liquid cultures of ancestral and evolved clones. SHY12, ancestor; SHY125, evolved clone carrying TBDR Δ3; SHY126, evolved clone carrying chrososomal deletion; SHY170-SHY177, SHY12 recombinants carrying Δ3 allele . (C) Distribution of single-cell level fluorescence intensity. Binwidth is 0.1. Y axis of histograms are shown as density.

された、強い緑色蛍光を発する進化型クローンのNGSデータには *linA* 領域の情報量の増加が観察された。これは細胞集団全体の中には、*linA* 領域が欠失したものだけでなく、重複したものも生じていることを示唆する。また、集団内で誕生した *linA* 領域の欠失をもつ変異体がおそらく偶然ではなく、なんらかの機能の獲得に対する自然選択の結果、比較的短い期間で蛍光顕微鏡観察やゲノム解析で検出が可能な、集団内の10%以上の頻度にまで数を増やすことが、2種類の培地のどちらでも起きることが判明した。TBDRと *linA* 領域以外には、系列間で共通して変異が起きた遺伝子座はなかった。

本研究において、もっとも意外性のあった現象は「*linA*

領域に欠失を持つクローンが、集団がγ-HCH最小培地に適応する過程で出現した」こと、および「染色体の不要な部分を失ったクローンが集団内に出現しても、そのようなクローンが集団内を占拠できない」ことの2点である。このような集団の複雑化と、複雑性の維持が細胞間の依存関係により成立しているのだろうか、それともニッチ分割で説明できるのだろうか。この疑問に答えるために、まず2系統以上が共存していることが明らかになった系列 Glu-A と HCH-B の進化後集団から、蛍光を持つクローンと蛍光を持たないクローンのペアを分離し、それらの共存が再現できるか検証した。Glu-A系列から分離した進化型クローン SHY125 (TBDR 変異あり)

および SHY126 (Glu-A 由来, *linA* 領域欠失) を, 初期比率を変えて混合し, グルコース平板培地で継代培養したところ, 行った 18 回の共培養実験のうちすべてで両者の共存が再現できた (Fig.3A: 初期比率 1:9 の 6 つの複製実験の結果を示した).

両者を資源が拡散する液体培地/振とう条件で継代培養すると, 12 回の実験全てにおいて, SHY125 の排除が観察された (Fig.3B: 初期比率 999:1 の 6 つの複製実験の結果を示した). SHY125 が単独で液体培地で増殖できるかどうか確認すると, 単独で増殖できることが確認された (Fig.3C). 資源や細胞が拡散しにくい平板培地上では SHY125 は SHY126 と共存できるが, 資源や細胞が拡散する液体培地/振とう条件では, SHY125 が SHY126 との競争に負けて存在できなくなっていること

は, 平板培地へ塗抹時の初期配置に関連した SHY125 に対する資源の保証, すなわち空間ニッチの分割が 2 者の共存に必須であることを示唆する. 一方, HCH-B 系列から分離した進化型クローン SHY115 (*linA* 領域あり) と SHY82 (*linA* 領域欠失, *rpoD* 変異あり) を γ -HCH 平板培地で共培養したところ, 12 回の実験中, 2 回でのみ SHY115 と SHY82 の共存が再現できた (Fig.3D: 初期比率 9:1 の 6 つの複製実験の結果を示した). SHY82 は *linA* 遺伝子をもたないため, HCH 平板培地上で数を増やすには, 他者の生産する HCH 代謝産物に依存して増殖するか, 培地や大気中に含まれる微量の炭素源を利用して生育する Oligotrophic Growth (OG) (Gray *et al.*, 2019), または High yield Growth under Oligotrophic condition (HYGO) (Inaba *et al.*, 2020) と呼ばれる表

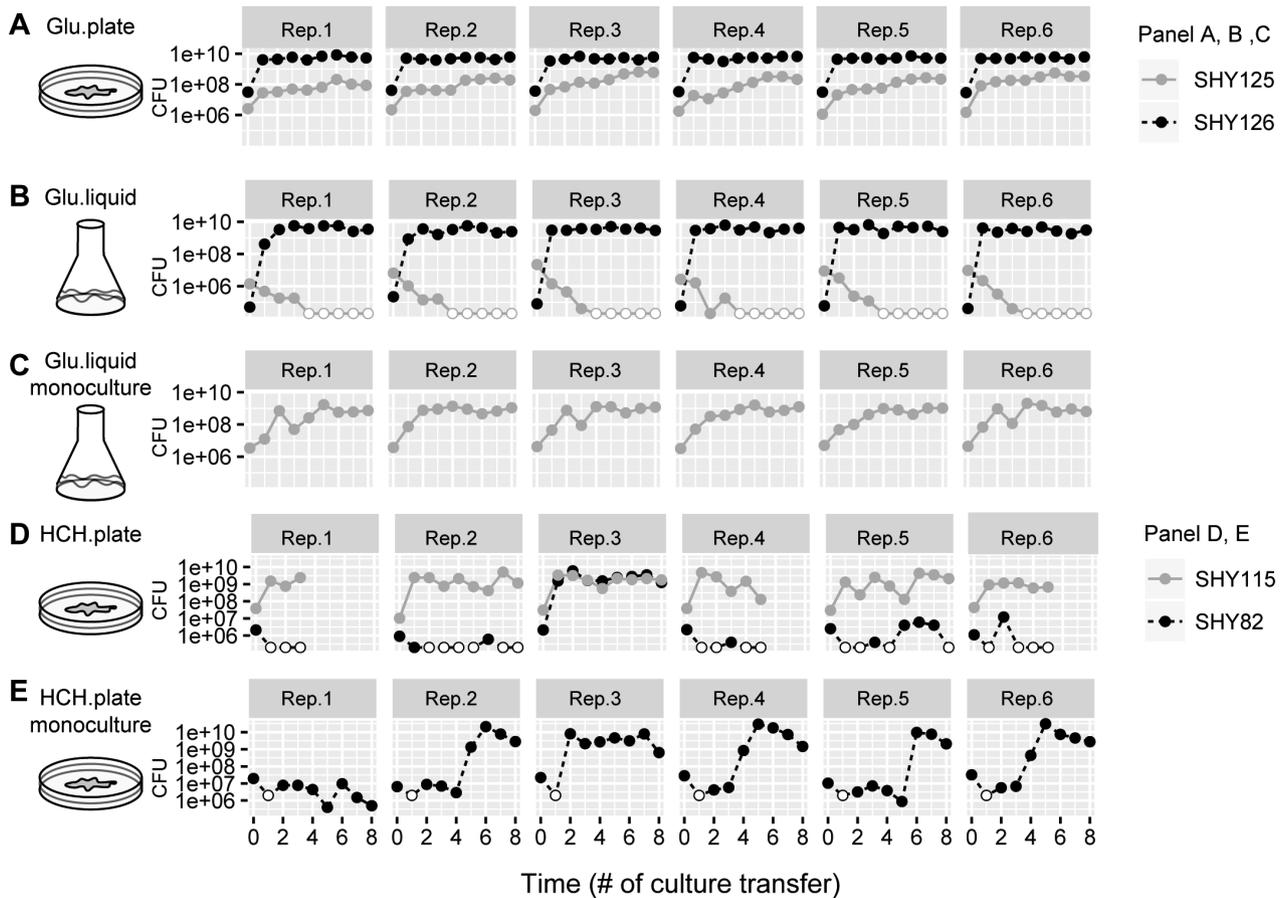


Fig. 3 Coculture experiments of a pair of evolved clones. (A) Coculture of SHY125 and SHY126 on glucose minimal agar plates. (B) Coculture of SHY125 and SHY126 on glucose minimal liquid medium in the presence of agitation. (C) Culture of SHY125 alone in glucose minimal liquid medium. (D) Coculture of SHY115 and SHY82 on HCH minimal agar plates. (E) Culture SHY82 on HCH minimal agar plates. Open circles indicate that CFU was below detection limit. Batch culture transfer performed following the protocol of experimental evolution.

現型を発現し、増殖するかのどちらかの手段を利用していることになる。SHY82を単独でHCH平板培地で継代培養したところ、培養初期では、際立った増殖を示さなかった細胞集団が、ある時点で突然活発に増殖しはじめる現象が6回の実験のうち5回で観察された (Fig. 3E)。この観察パターンは「SHY82がHYGO表現型を潜在的に持っているが、それを全ての細胞で恒常的に発現することができてない」ことを示唆する。SHY82がSHY115に排除されるまでに、HYGO表現型を発現することができれば、炭素源の食い分け (資源分割: resource partitioning) により、Fig. 3Dのパネル Rep 3のように両者の共存が成立すると推測できる。

2つの進化型クローン間の依存関係の有無は、ニッチ分割の成立の有無とは独立した問題である。そこで、比較的表现型が安定しているSHY125とSHY126のペア間に依存関係があるか、スペント培地 (培養液上清) を培地に加えた条件での増殖曲線解析によって検証した。ここで、各クローンの適応度の指標として平板培地での単独培養時の最大増殖速度を利用した。クローン間で依存関係がある場合、資源 (グルコース) が保証されている状況下で、他者が分泌する「何か」が付加的に環境に存在すると相対的な適応度が変化すると期待される。培地に炭素源としてグルコースしか存在しない場合、祖先株

SHY12 (Anc), 進化株 SHY125, SHY126の間で最大増殖速度に有意な差は認められなかった (Fig. 4A)。

グルコースに加えてSHY125スペント培地を添加した培地では、SHY125の最大増殖速度がもっとも高かった (Fig. 4B)。SHY126スペント培地を加えた培地では、3者間で最大増殖速度に有意な差は認められなかった。すなわち、SHY126やSHY12は他のクローンの増殖を促進も阻害もしないが、TBDR変異をもつSHY125は自身のコピーに対してのみ増殖促進効果を持つことが判明した。また、SHY125とSHY126の間には依存関係は認められなかった。SHY125は、直接接せずとも、空間内の自身の密度が高いところでは、他のクローンより適応度が高くなる性質を持つと推定された。さらに、SHY125の定常期培養液を新しい培地に移すと長いラグフェーズや低いCFUが観察される傾向がみられた。

本研究では、自然生態系で見られるような複雑な相互作用をもつ微生物群集の形成が、化学物質の継続的微生物分解にも必須であるという考え方に立脚し、土壌細菌の1クローンが空間構造がある条件で多様化するパターンや集団内で生まれる細胞間相互作用に法則性が見つかるかどうか検証することを目指した実験進化を行った。平板培地のバッチ培養では、植え継ぎの際に、細胞が空間上の離れた場所に配置され、攪拌ありの液体培地条件

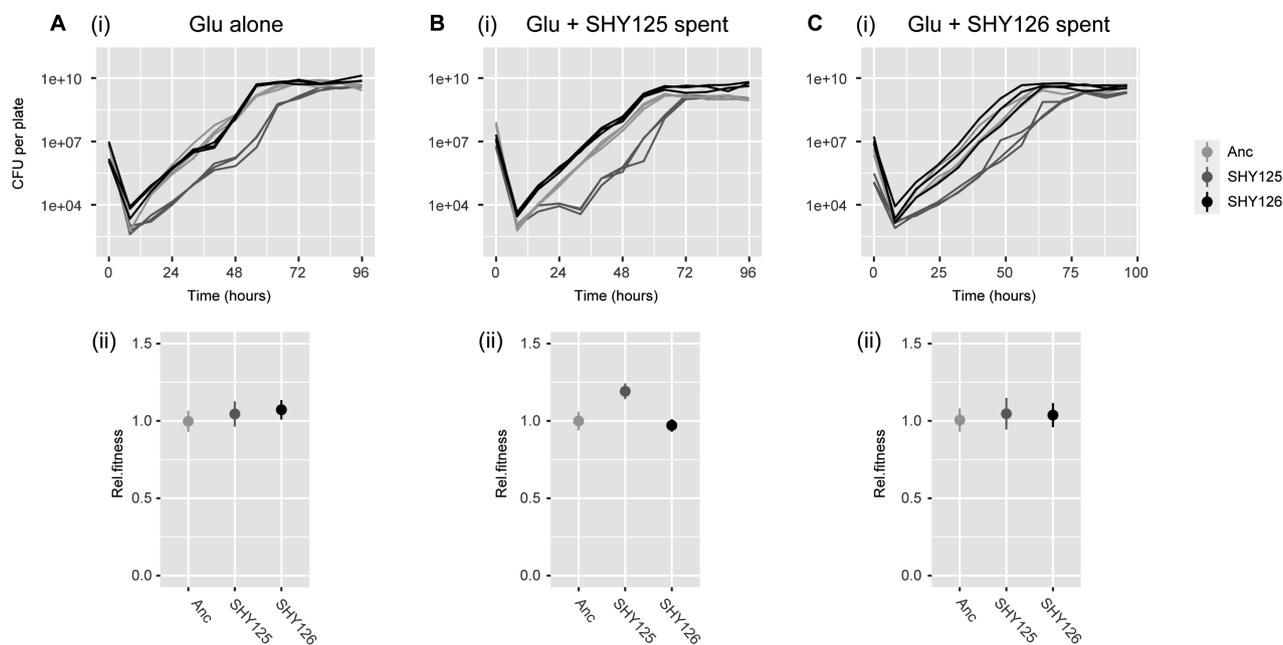


Fig. 4 Growth pattern of ancestral and evolved clones on three types of agar plate. (A) glucose minimal agar plate. (B) glucose minimal agar supplemented with SHY125 spent medium. (C) glucose minimal agar supplemented with SHY126 spent medium. (i) CFU row data. Three separate lines of each color indicate replicate experiments. (ii) Relative maximum growth rate of evolved clones to ancestor.

と比較して、資源と細胞の拡散の速度が遅いため、少なくとも一時的には多くの細胞に資源を保証することができる、空間ニッチ分割（棲み分け）が人為的に作り出された状態になる。そのため、一部の系統が短期間で集団全体を占めるような状況にはなりにくいと推定された。また細胞の密度が空間上で不均一になるため、細胞密度依存の機能が進化する可能性があった。2つの培地条件のうち、どちらでも染色体の一部を失った系統が出現し、欠失をもつ系統と持たない系統が共存しつづける現象が起きていたが、共存のメカニズムは系列 HCH-B と Glu-A では異なっていた。HCH-B では *linA* 領域を失った系統の SHY82 が炭素源として HCH を使用しないかわりに HYGO 表現型を発現して増殖する現象が起きていた。現時点では、集団内部で HYGO 表現型の獲得と *linA* 領域の欠失のどちらが先に起きたのかは明らかになっていない。環境細菌を不均一な環境に置くと、比較的すぐに新しいニッチを見つけ出して多様化するという現象が、*Pseudomonas fluorescens* 1 クローンと静置液体培養を使用した実験進化系での観察に基づいて報告されていたが (Rainey & Travisano, 1998)、今回 HCH-B で観察された細胞の多様化と多様化した細胞の共存も資源分割というニッチ分割の一例として説明できるだろう。

一方で、Glu-A、Glu-B、Glu-C で観察された TBDR の進化に関連する集団の複雑化と複数系統の共存の機構を説明することは比較的難しい。図 4、図 5 の結果を総合して考察すると、平板培地での細胞の初期配置に依存した資源確保と、進化型 TBDR アレルによる同系統増殖促進効果の恩恵を受けて SHY125 は実験進化初期過程に頻度を増やしたと推測されるが、TBDR アレルを持つ系統が集団をすぐに占拠できない理由は、長いラグフェーズや高い死亡率という TBDR 変異に関連する負の性質の獲得があると推察される。今後、空間内の局所的な細胞密度と、複数の増殖パラメータを考慮したシミュレーションにより、進化型 TBDR アレル保有株と他系統の共存のメカニズムについての考察の妥当性を検証する必要がある。

TBDR ホモログは、ポーリンと同様の β バレル型膜タンパク質で、グラム陰性細菌の外膜に埋め込まれている小分子の通り道であるが、ある細菌種では、同種細胞がペリクルバイオフィームをつくるために、細胞外膜表面のポーリンが head-to-head ダイマーを形成して細胞同士を接着させていることが明らかになった (El-Khatib *et al.*, 2018)。そのため、TBDR ホモログは物質の取り込みと同種凝集体の形成という 2 種類の一見関連しない機能を潜在的に有していると考えられる。本研究では、実験進化の過程で、TBDR ホモログ遺伝子にフレーム内欠失が入ることで、細胞がその機能を完全には失わずに、

同種細胞同士が接着する能力を高める現象を観察した。進化型アレルが物質の透過性を高めていることと、細胞が「自身が環境に放出した何か」を感知して増殖速度を高めていることは直接関連しているように見える。Lenski らのグループの大腸菌実験進化 (Blout *et al.*, 2008; Blout *et al.*, 2012) で観察された、グルコース利用系統集団からクエン酸利用系統が出現し、資源分割が発生したケースでは、オペロンの重複によるクエン酸トランスポーターの過剰発現が集団の多様化における重要な出来事になっていた。本研究により、クローナル集団の多様化には、細胞の物質の取り込み能の変化が先行して起こるという知見がさらに増えたことになる。一方、現在のところ、細胞外膜の接着性自体が、進化型クローンの他系統との共存にどう貢献しているのかは不明である。

ヘテロな細菌集団の構成原理と応用への展開

γ -HCH 分解細菌を環境試料から単離する場合、 γ -HCH による集積培養を行い、固体培地上でのシングルコロニーアイソレーションで分解菌を単離する。その際、一見シングルコロニーと思われる細胞集団の中に γ -HCH 分解細菌だけでなく非分解細菌が共存し続けることがあり、純粋分離に種々の培地が必要になるケースがある。このような現象は γ -HCH 分解細菌の場合だけでなく、様々な分解細菌の分離の際にしばしば観察される現象である。 γ -HCH 分解コミュニティ EB2 は、 γ -HCH による集積培養と単コロニー分離を経て取得されたものの、分解細菌 *Sphingobium* sp. TKS 株以外にも γ -HCH 分解活性を持たない *Cupriavidus* sp. TKC 株や *Pseudomonas* sp. TKP 株など数種類の非分解細菌が共存する。そこで、EB2 を γ -HCH を唯一の炭素源とする液体培地で 5 代にわたり継代培養し、EB2 の機能的・構造的安定性について検討した。EB2 による 50 ppm の γ -HCH 分解を経時的にモニタリングした結果、継代 1 代目は 99% 分解するのに 3 日間を要した (Fig. 5A)。

2 代目では、植え継ぎ 1 日後で 90% 以上が分解され、分解速度の上昇が認められ、以降 5 代目までの継代培養において、これら高い分解活性が維持された。16S rRNA アンプリコンシーケンスにより EB2 の細菌叢構造を調べた結果、*Pseudomonas* が 75% で最も多く、*Cupriavidus* と *Sphingobium* がそれぞれ 11% と 8% と続き、これら 3 属でコミュニティの 90% を占めることがわかった (Fig. 5B)。5 つの並列サンプルでは共に *Sphingobium* の割合が 2 代目までに 40% 程度まで上昇したのち、3 から 5 代目にかけて徐々に減少しながらも概ね 25% 前後のレベルを維持した。 γ -HCH の分解速度が 2 代目で上昇したが、これは 1 代目から 2 代目に分解菌が含まれる *Sphingobium* 属の割合が増加し、その後 25% 前後で安定

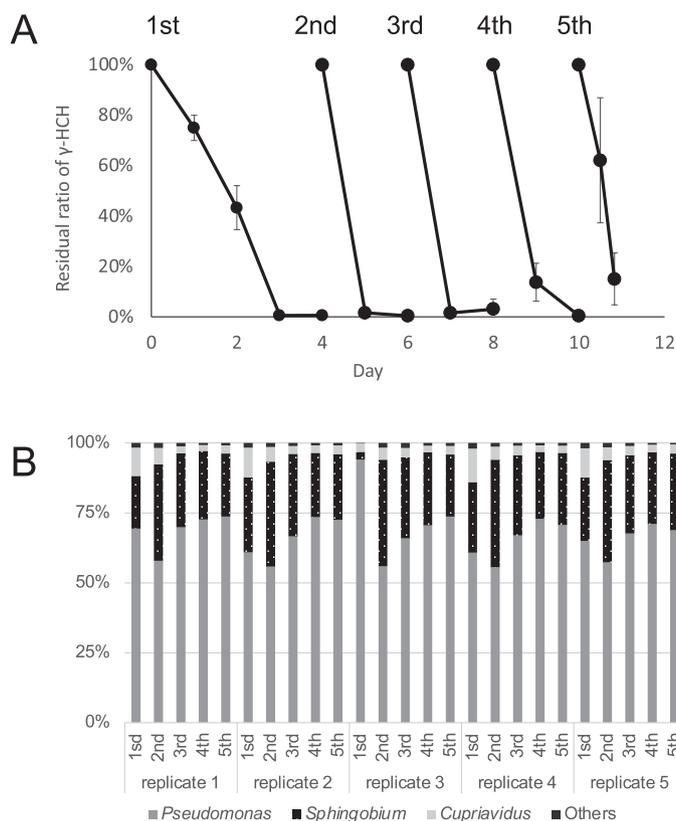


Fig. 5 Functional and structural stability of γ -HCH-degrading EB2 community during five-times subculturing. Time course of γ -HCH degradation (A) and 16S rRNA (V3-V4) amplicon sequencing (B) of the subcultures of EB2 community.

したことから説明できる。興味深いことに、継代を繰り返しても分解菌が含まれる *Sphingobium* 属が菌叢の単独優占種にはならず、他属が70%前後の割合で安定的に共存し続けた。

単離した分解細菌TKS株は、 γ -HCHを唯一の炭素源とした寒天培地上でコロニー形成できるが、小さなコロニーしか形成せず、褐変してすぐに死滅してしまう (Fig. 6A)。

これに対して、コミュニティ状態で γ -HCH寒天培地にまくと、不定型で大きなコロニーを形成することがあり、この巨大コロニーは、長期持続的に γ -HCH分解活性を示す (Fig. 6B)。固体培地上での相互作用を探るため、分解菌と非分解菌を固体培地で混合培養し、実体顕微鏡下において各コロニーの形成状況を比較した結果、R2Aなど低栄養の寒天培地上で近くにTKS株コロニーが存在する場合、TKS株のコロニー辺縁部がTKSコロニーに向かって方向性を持って生長した (Fig. 7)。

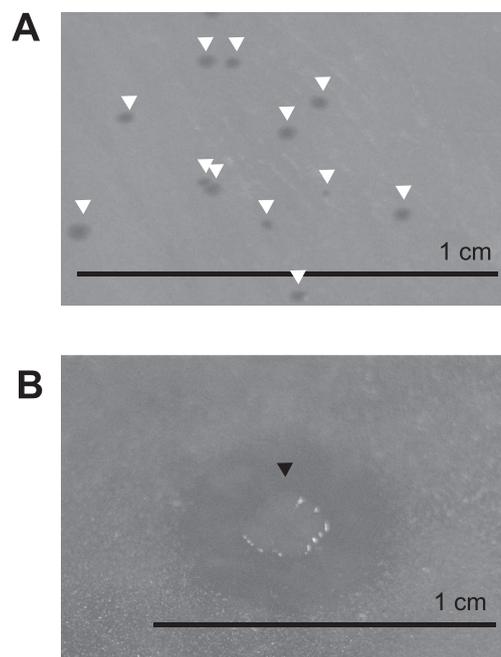


Fig. 6 Colony formation of γ -HCH-degrading *Sphingobium* sp. TKS and EB2 on a minimum agar plate with γ -HCH as a sole carbon source. While small colonies of TKS monoculture (white arrowhead) lost the degrading activity (A), EB2 occasionally forms a large colony (black arrowhead) that maintains the activity for a long period (B).

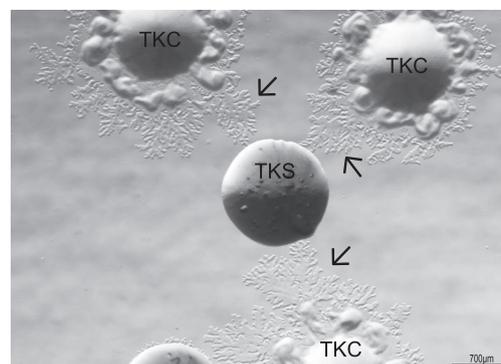


Fig. 7 Directional colony growth (DCG) of *Cupriavidus* sp. TKC towards *Sphingobium* sp. TKS. Peripheral area (indicated by arrows) of TKC colonies grew towards a TKS colony.

本現象は非分解菌と分解菌が積極的にコミュニティを形成する初期ステップとして捉えられることから、本現象を directional colony growth (DCG) 現象と命名し、解析を進めた。TKC 株は系統的に異なる 7 株の sphingomonads 細菌株に対して DCG 活性を示す一方で、*E. coli* や、*Pseudomonas* 属や *Mycobacterium* 属の細菌株に対しては明確な DCG 活性を示さないことから、何らかの選択性が存在すると考えられる。一方、TKC 株が DCG によって TKS 株コロニーに接触した後に、TKS 株の棲息域を増大させる傾向も観察された。TKS 株自体には固体表面での運動性が認められないことから、DCG 活性は移動性に乏しい分解菌の棲息範囲の拡大にも寄与すると考えられる。また、様々な割合で TKC 株と TKS 株を混合して γ -HCH 寒天培地に接種すると、TKC 株が 90% を超える場合に稀に TKS 株のコロニーが拡大し、 γ -HCH 分解範囲も拡大できることがわかった (Fig.8)。

この結果は、TKC 株が EB2 で観察された長期分解活性を維持する巨大コロニーの形成に関与していたことを強く示唆する。

γ -HCH 分解細菌である UT26 株単独では、 γ -HCH 寒天培地上でコロニーが広がらず、狭い領域の γ -HCH しか分解できない (Fig.9A)。

これに対して、土壌から高い swarming 活性のある *Paenibacillus* 細菌株を分離し、UT26 株と共接種すると、UT26 株はプレート上で棲息域を拡げて、より広い範囲の γ -HCH を分解した (Fig.9B)。これまでも、固体表面で移動性のある微生物が別の微生物を輸送する現象、いわゆるヒッチハイク現象が *Paenibacillus* や

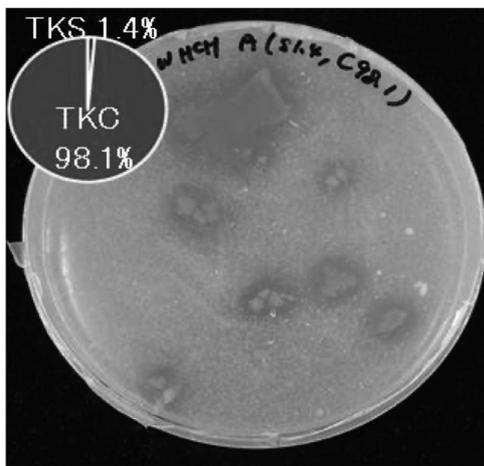


Fig. 8 Large multi-species colony of TKC and TKS The pie chart indicates ratio of TKC and TKS in mixture of an inoculum.

Capnocytophaga 等で報告されている (Finkelshtein *et al.*, 2015; Shrivastava *et al.*, 2018)。また、UT26 株は、滅菌土壌に単独で接種した場合、7 日後の生残性は低いが、*Paenibacillus* 株と共接種することで土壌中での生残性が飛躍的に上昇した (Fig.9C)。この効果が *Paenibacillus* 株の移動性と関係があるかは、より詳細な解析をする必要があるが、このようなヒッチハイク現象のバイオレメディエーションへの応用への可能性を提示

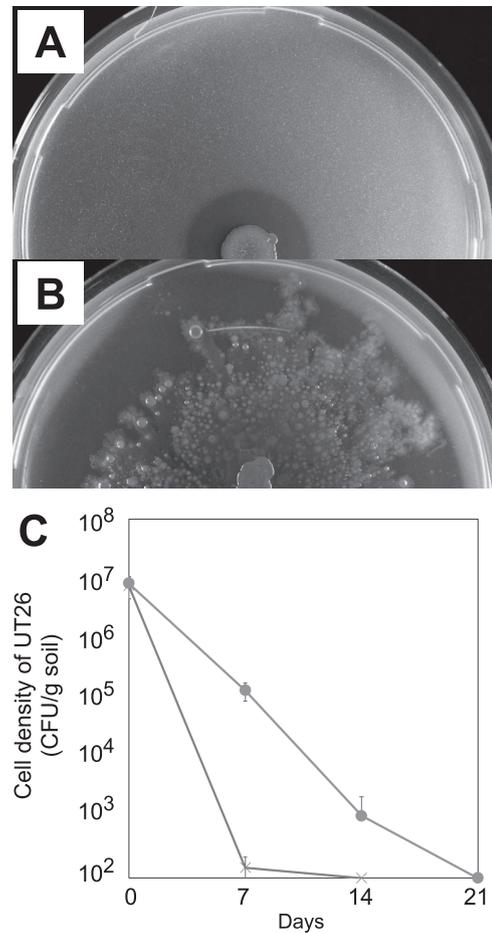


Fig. 9 *Paenibacillus* sp. NKL2 promoted growth of *Sphingobium japonicum* UT26. Colony formation of monoculture of non-swarming UT26 (A) and co-culture of UT26 and a swarming bacterium *Paenibacillus* sp. NKL2 (B) on 1/3LB plate with γ -HCH. Clear zone around the large colony on the plate with cloudy color derived from γ -HCH particles indicates area where UT26 degraded γ -HCH. Effect of co-culturing with NKL2 on survivability of UT26 (monitored by CFU) in soil sterilized by γ -irradiated (C). Monoculture of UT26 (cross) and co-culture of UT26 and NKL2 (circle)

することができた。

我々は、土壤細菌集団を滅菌土壤に移植し、菌叢の時系列変化を追跡する研究を実施し、易培養性の *Burkholderia* の次に難培養性の *Verrucomicrobia* が割合を増やす結果を得た (Fig. 10A)。

土壤細菌 *B. caribensis* の EPS は団粒構造に影響を与えることが報告されているため (Vanhaverbeke *et al.*, 2003), *Burkholderia* が生産する EPS を用いることで難培養性細菌の分離及び培養ができるのではないかと考えた。*Burkholderia* の EPS を添加した培地に土壤の懸濁液を接種して培養したところ、培養 2-3 週間後に様々な形状のコロニーが形成され、シングルコロニーアイソレーションを繰り返すことで 50 株の分離株を取得した。取得株の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、*Actinobacteria* 門細菌株が 14 株、*Firmicutes* 門細菌株が 15 株、*Proteobacteria* 門細菌株が 8 株、そして *Verrucomicrobia* 門細菌株を 13 株取得した。特に *Verrucomicrobia* 門では *Spartobacteria* 綱に分類される株が多く取得され、これら株の 16S rRNA

遺伝子配列は現在登録されている分離株に最大でも 92-93% の相同性しか示さず、新規性が極めて高い分離株の取得に成功した。*Verrucomicrobia* 門 *Spartobacteria* 綱を含む多数の株の取得に成功した。世界規模で実施されている土壤細菌叢のメタゲノム解析によって、*Spartobacteria* 綱には世界中の草原土壤で最も優占する系統である DA101 clade が含まれていることが知られている (Brewer *et al.*, 2017)。土壤メタゲノム解析を効果的に実施するには土壤細菌のリファレンスゲノムの充実が極めて重要になるため、RefSoil などの土壤細菌のゲノムデータベース構築プロジェクトが進行している (Choi *et al.*, 2017)。その中でも *Spartobacteria* 綱は「most wanted OTU」として挙げられている microbial dark matter の代表的な一群である (Choi *et al.*, 2017)。本研究で得られた *Spartobacteria* 細菌 5p 株は既知株と 92% の相同性しか示さない極めて新規性の高い株であることが明らかとなった。今後これら分離株の培養実験から得られるであろう情報は、土壤細菌叢の生態学や遺伝学の発展に資すると期待できる。次に、畑地土壤から抽出した微生物集団を、*B. multivorans* ATCC 17616 株の EPS 画分を炭素源とする無機塩液体培地で振とう培養し、増殖した細菌叢の網羅的系統解析を行った。また対照として、植物由来の多糖類である水溶性デンプンを炭素源とした培養も行なった。濁度による生育曲線では、デンプン添加区に比べて、EPS 画分添加区では生育速度が遅いものの、70 時間前後には菌叢解析に十分な菌体量が得られるまでに生育した。16S rRNA (V3-V4 領域) アンプリコンシーケンスによる菌叢解析の結果 (Fig. 10B)、デンプン添加区では *Bacillus* 属等の *Firmicutes* 門や *Flavobacterium* 属等の *Bacteroidetes* 門および *Proteobacteria* 門が優占していた一方で、EPS 画分添加区では *Acinetobacter* 属等の *Proteobacteria* 門や *Prosthecobacter* 属等の *Verrucomicrobia* 門が優占していた。EPS 画分添加によって 5P 株が含まれる *Spartobacteria* 綱自体の増殖はわずかであったものの、*Verrucomicrobia* 門としては 50% を超える割合にまで増殖し、最も増殖した系統は藻類培養成分によって分離培養された *P. algae* EBT104 株 (Lee *et al.*, 2014) と高い相同性を示した。これまでの *Verrucomicrobia* 門細菌株の研究によって、この分類群のゲノムには多糖類の加水分解酵素遺伝子が多数存在していることが知られており、環境中における潜在的な多糖類分解菌ではないかと予想されている (Martinez-Garcia *et al.*, 2012)。本結果によってバクテリア由来の EPS と *Verrucomicrobia* 門の強い関連性が支持された。以上の結果は、細菌間の相互作用を利用した難培養性細菌の培養技術の開発という位置付けができる。

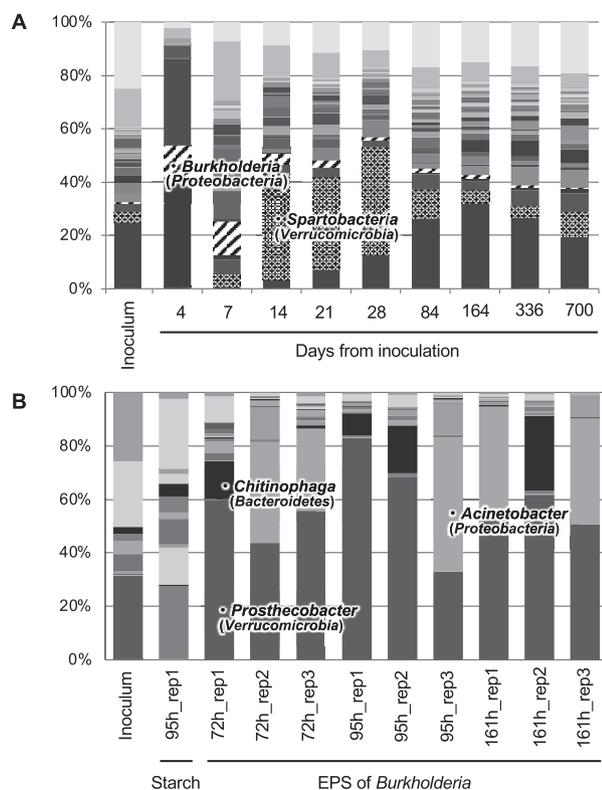


Fig. 10 Microbial community succession in γ -irradiated soil (A) and polysaccharide-enrichment cultures (B). Genus-level taxonomic composition was based on 16S rRNA gene (V3-V4) amplicon sequencing.

要 約

本研究では、細菌集団の形成と進化に関する原理を理解し、バイオレメディエーションなどの実際の応用技術にも資する基礎知見を得るために、有機塩素系殺虫剤 γ -HCH 分解能力を有する細菌細胞集団を対象とした研究を実施した。クローナルな γ -HCH 分解細胞集団を空間構造のある平板培地上で世代交代を繰り返した結果、染色体の部分欠失を持つ系統が自然発生し、その欠失をもたない系統と共存し続ける現象が観察された。異なる系統の共存の機構のひとつとして、TBDR ホモログ遺伝子に変異が起り、膜の透過性の向上と凝集性を獲得することが重要であることが明らかになった。総じて、染色体欠失を保有する株と保有していない株の共存は、資源または空間のニッチ分割が保証されることで成立していることが示唆された。一方、ヘテロな γ -HCH 分解細菌集団において、(i) γ -HCH を唯一の炭素源とした液体培地による継代培養を繰り返しても、分解菌が優占種とならないこと、(ii) γ -HCH を唯一の炭素源とした固体培地上で、非分解細菌の存在により長期持続的な巨大コロニーを形成すること、から非分解細菌の重要性が明らかになった。本コミュニティより単離した細菌株の解析により、非分解細菌が分解細菌にコロニー伸長する directional colony growth (DCG) 現象を見出すと共に、本表現型を示す *Cupriavidus* 株が巨大コロニー形成にも重要であることを明らかにした。また、移動性細菌を利用して非移動性細菌が棲息域を拡大するヒッチハイク現象が、 γ -HCH 分解細菌の固体培地上での棲息域拡大に貢献すると共に、土壌環境での生残性への関与も示唆され、本現象のバイオレメディエーションへの応用への可能性を提示した。さらに、易培養性の *Burkholderia* が生産する EPS が難培養性の *Verrucomicrobia* の増殖を選択的に促進することを見出し、新たな細菌間の相互作用を利用した難培養性細菌の培養手法を提示した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表・ポスター発表

- 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2017. 難分解性有機塩素系殺虫剤の分解細菌コミュニティにおける非分解菌の役割. 日本農芸化学会2017年度大会 (3月17-20日, 京都)
- 加藤広海, 小川なつみ, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2017. 利用する: 汚染物質分解コンソーシアムにおける非分解菌の役割. 第2回環境微生物系学会合同大会2017 (8月29-31日, 仙台) シンポジウム「微生物のサバイバルゲーム」
- 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2017. 難分解性有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティに関する研究. 第2回環境微生物系学会合同大会2017 (8月29-31日, 仙台)
- 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 環境汚染物質の分解細菌コミュニティにおける非分解菌コロニーの分解菌コロニーへの接近現象. 日本農芸化学会2018年度大会 (3月15-18日, 名古屋)
- 加藤広海, 羽賀千見, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 有機塩素系殺虫剤分解細菌コミュニティを構成する細菌間の関係性. 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会 (6月26日, 筑波)
- Kato, H., Mori, H., Kurokawa, K., Tsuda, M. & Nagata, Y. 2018. 土壌細菌叢の形成プロセスにおける再現性 Reproducibility of reconstruction of soil microbial community. 日本微生物生態学会第31回大会 (7月11-13日, 沖縄)
- Kato, H., Haga, C., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. 2018. γ -HCH分解細菌コミュニティから単離した細菌株間の関係性. Relationship between bacterial strains isolated from a γ -HCH-degrading microbial community. 日本微生物生態学会第31回大会 (7月11-13日, 沖縄)
- 羽賀千見, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 有機塩素系農薬の分解細菌コミュニティを構成する細菌間の関係性. 第36回農薬環境科学研究会 (11月8-9日, 甲府)
- 矢野大和, 山本達也, 仁平賢, 野村暢彦, 永田裕二. 2019. 微生物はなぜ群を作るのか? 実験進化を用いたBQHの検証. 第13回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 東京)
- 堀川慧太, 池内倫子, 小川なつみ, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝. 2019. フェナントレン分解細菌 *Mycobacterium* sp. EPa45の生育阻害因子の解析. 第13回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 東京)
- 加藤広海, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 異なる土壌間における微生物集団の移植実験. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 高橋紳八, 加藤広海, 永田裕二, 大塚重人, 大坪嘉行, 津田雅孝. 2019. 難培養性細菌の培養における細胞外多糖の重要性. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 羽賀千見, 加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 細菌間の接近と拡散が有機塩素系殺虫剤の分解コミュニティに与える影響. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 仁平賢, 山本達也, 平野彰大, 野村暢彦, 永田裕二, 矢野大和. 2019. 微生物はなぜ群れを作るのか?: 平板培地実験進化系を用いたBHQの検証. 日本微生物生態学会第33回大会 (9月10-13日, 甲府)
- 東豊浩, 加藤広海, 長田穰, 永田裕二, 近藤倫生. 2019. 土壌細菌叢の液体培養系における遷移の動態解析. 日本微生物生態学会第33回大会 (9月10-13日, 甲府)
- 加藤広海, 津田雅孝, 永田裕二. 2019. 土壌細菌叢の初期形成過程における移動性細菌の役割. 日本微生物生態学会第33回大会 (9月10-13日, 甲府)
- 仁平賢, 山本達也, 平野彰大, 野村暢彦, 永田裕二, 矢野大和. 2020. 農薬分解細菌を用いた平板培地実験進化系の構築. 第14回日本ゲノム微生物学会年会 (3月6-8日, 名古屋)
- Yusuf, K., Kato, H., Tsuda, M., Nagata, Y. 2020. Survivability of a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading

sphingomonad strain in soil. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)

- 19) 平野彰大, 山本達也, 仁平賢, 野村暢彦, 永田裕二, 矢野大和. 2021. 平板培地を用いた実験進化により構築したモデル細菌集団内の多様性維持機構. 第15回日本ゲノム微生物学会年会 (3月5-6日, オンライン)
- 20) 加藤広海, 田中彩美, 永田裕二. 2021. γ -Hexachlorocyclohexane (HCH) 汚染土壌のメタゲノム解析. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, オンライン)
- 21) 岩本和音, Yusuf, K., 加藤広海, 永田裕二. 2021. バクテリアにおけるヒッチハイク現象の環境浄化技術への応用. 環境バイオテクノロジー学会 (9月2-3日, オンライン)
- 22) 佐子川さやか, 羽賀千晃, 加藤広海, 永田裕二. 2021. γ -HCH分解細菌コミュニティの固体培地上での異種複合コロニー形成. 微生物生態学会34回大会 (10月31日-11月2日, オンライン)
- 23) 笹川航, 加藤広海, 大塚重人, 永田裕二. 2021. *Burkholderia*株由来の細胞外多糖類による土壌細菌の選択的培養. 微生物生態学会34回大会 (10月31日-11月2日, オンライン)
- 24) 笹川航, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. *Burkholderia*株由来の細胞外多糖類画分による難培養性 *Verrucomicrobia*門細菌の集積培養. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)
- 25) 岩本和音, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. ヒッチハイク現象の環境汚染物質分解細菌への応用. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)
- 26) 佐子川さやか, 羽賀千晃, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二. 2022. γ -HCH 分解細菌コミュニティ形成における *Cupriavidus*株の重要性. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月15-18日, オンライン)

原著論文

- 1) Ogawa N., Kato, H., Kishida, K., Ichihashi, E., Ishige, T., Yoshikawa, H., Nagata, Y., Ohtsubo, Y., & Tsuda M. 2019. Suppression of substrate inhibition in phenanthrene-degrading *Mycobacterium* by co-cultivation with a non-degrading *Burkholderia* strain. *Microbiology* **165**:625-637.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝, 永田裕二. 2018. 汚染物質分解コンソーシアムにおけるキープレイヤーとオーディエンス. 環境バイオテクノロジー学会誌 **18**: 15-20.

謝 辞

本研究の実施にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に心からお礼申し上げます。また, 本研究の遂行にご協力いただいた東北大学大学院生命科学研究所の野々山翔太博士 (現 東京工業大学), 千葉大学の福世真樹先生, 東北大学の岩崎航先生, 産総研の宮崎亮博士, 大阪大学の細田一史先生, 東北大学の経塚淳子先生, ならびに学生諸氏に感謝の意を表します。また, 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究(B) (永田

裕二 19H02865), 挑戦的萌芽研究 (永田裕二 16K14877) の支援にも感謝致します。

文 献

- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Blount, Z. D., Borland, C. Z. & Lenski, R. E. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Pro Nat Aca Sci USA* **105**: 7899-7906.
- Blount, Z. D., Barrick, J. E., Davidson, C. J. & Lenski, R. E. (2012). Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature* **489**: 513-518.
- Brewer, T. E., Handley, K. M., Carini, P., Gilbert, J. A. & Fierer, N. (2017). Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium 'Candidatus *Udaebacter copiosus*'. *Nature Microbiol* **2**.
- Choi, J., Yang, F., Stepanauskas, R., *et al.* (2017). Strategies to improve reference databases for soil microbiomes. *ISME J* **11**: 829-834.
- Deatherage, D. E. & Barrick, J. E. (2014). Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* **1151**: 165-188.
- El-Khatib, M., Nasrallah, C., Lopes, J., *et al.* (2018). Porin self-association enables cell-to-cell contact in *Providencia stuartii* floating communities. *Pro Nat Aca Sci USA* **115**: E2220-E2228.
- Elcey, C. D. & Kunhi, A. A. M. (2010). Substantially enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by a microbial consortium on acclimation. *J Agric Food Chem* **58**: 1046-1054.
- Finkelshtein, A., Roth, D., Ben Jacob, E. & Ingham, C. J. (2015). Bacterial swarms recruit cargo bacteria to pave the way in toxic environments. *Mbio* **6**.
- Gebreil, A. S. & Abraham, W. R. (2016). Diversity and activity of bacterial biofilm communities growing on hexachlorocyclohexane. *Water Air Soil Pol* **227**.
- Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J. & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Comm* **10**.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 669-+.
- Inaba, S., Sakai, H., Kato, H., Horiuchi, T., Yano, H., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2020). Expression of an alcohol dehydrogenase gene in a heterotrophic bacterium induces carbon dioxide-dependent high-yield growth under oligotrophic conditions. *Microbiology (Reading)* **166**: 531-545.
- Kaczmarczyk, A., Vorholt, J. A. & Francez-Charlot, A. (2012). Markerless gene deletion system for sphingomonads. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3774-3777.
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J. & Suriani, N. L. (2020). Recent understanding of soil *Acidobacteria* and their ecological significance: A Critical Review. *Front Microbiol* **11**.
- Lee, J., Park, B., Woo, S. G., Lee, J. & Park, J. (2014). *Prostheco bacter algae* sp. nov., isolated from activated sludge using algal

- metabolites. *Int J Syst Evo Microbiol* **64**: 663-667.
- Lenski, R. E. (2017). Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *ISME J* **11**: 2181-2194.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D. M., Swan, B. K., *et al.* (2012). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of *Verrucomicrobia*. *Plos One* **7**.
- Mohn, W. W., Mertens, B., Neufeld, J. D., Verstraete, W. & de Lorenzo, V. (2006). Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain. *Environ Microbiol* **8**: 60-68.
- Nagata Y, Tabata M, Ohhata S, & Tsuda M. 2013. Appearance and evolution of γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacteria. In: H N, M T, M F, Y K, editors. Biodegradative bacteria: How bacteria degrade, survive, adapt, and evolve. p. 19-41.
- Ohtsubo, Y., Kishida, K., Sato, T., Tabata, M., Kawasumi, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2014). Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain TKP, isolated from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading mixed culture. *Genome Ann* **2**.
- Rainey, P. B. & Travisano, M. (1998). Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**: 69-72.
- Shrivastava, A., Patel, V. K., Tang, Y. S., Yost, S. C., Dewhirst, F. E. & Berg, H. C. (2018). Cargo transport shapes the spatial organization of a microbial community. *Pro Nat Aca Sci USA* **115**: 8633-8638.
- Syvertsson, S., Vischer, N. O. E., Gao, Y. Q. & Hamoen, L. W. (2016). When phase contrast fails: ChainTracer and NucTracer, two ImageJ methods for semi-automated single cell analysis using membrane or DNA Staining. *Plos One* **11**.
- Tabata, M., Ohhata, S., Kawasumi, T., Nikawadori, Y., Kishida, K., Sato, T., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. & Nagata, Y. (2016). Complete genome sequence of a gamma-hexachlorocyclohexane degrader, *Sphingobium* sp. Strain TKS, isolated from a gamma-hexachlorocyclohexane-degrading microbial community. *Genome Ann* **4**.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A. & Mazeau, K. (2003). Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: Impact on the interaction with soils. *Biopolymers* **69**: 480-497.
- Wagner, M. & Horn, M. (2006). The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Op Biotechnol* **17**: 241-249.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5261-5267.
- Wong, H. L., MacLeod, F. I., White, R. A., Visscher, P. T. & Burns, B. P. (2020). Microbial dark matter filling the niche in hypersaline microbial mats. *Microbiome* **8**.

略語一覧

- CFU: colony forming unit
 DCG: directional colony growth
 DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis
 EPS: extracellular polysaccharide
 HCH: hexachlorocyclohexane
 HYG: high-yield growth under oligotrophic conditions
 NGS: next generation sequencing
 OTU: operational taxonomical unit
 TBDR: TonB-dependent receptor

2020年度一般研究助成の研究報告

助成期間：2020年4月～2022年3月

国内の異なる積雪環境に適応した担子菌ガマノホタケ科 Typhulaceaeの多様性とその環境適応能の評価

星 野 保

【目的】豪雪地帯が国土面積の半数を超える日本において、寒冷地の冬季環境は生物相に大きな影響をおよぼしている。しかし、積雪あるいは土壌凍結に適応した菌類に関する研究は、雪腐病と称される積雪下、越冬性植物に対して病原性を示す種にほぼ限定されている。国内寒冷地の冬季に活動する腐生種に関する種多様性およびその性質に関する情報は極めて断片的である。

本研究では、国内の多雪から少雪・土壌凍結まで多様な冬季環境から、低温環境に適応し、培養可能な担子菌ガマノホタケ科 Typhulaceae の分離・培養した。さらにその生活史から低温環境への適応に必要な生理生態的特徴の解明を目指した。得られた結果を既知種の生理的性質や環境適応能と比較し、どのような性質の獲得・強化することにより、低温環境への進出が可能となったのか考察した。

【方法】青森県を中心に北東北三県・北海道・長野県にて担子菌 Typhulaceae の採集・分離培養をおこない、得られた分離菌株の ITS を遺伝子データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) にて比較した。また、多雪環境適応種として *Typhula ishikariensis*、少雪適応種として *T. maritima* を代表とし、その生息域での生活史を比較した。

【結果・考察】分離菌株よりデータベース未登録の菌株を7種・12株を得た。特に長野県からは、既知種と形態の異なる複数の *Macrotyphula* 属菌を得た。しかし、ガマノホタケ科菌の多くは、遺伝子情報が少なく、既知種との比較には、基準となる標本との形質の比較が必要となる。今回の分離菌株については、既存標本の範囲を研究者が形態的特徴を基に同定したタイプ以外の標本にも広げて、形態形質の比較をおこない、さらに種同定をおこなう。

T. ishikariensis は、交配型の異なる3系統が確認されている複合種である。今回国内で採集した菌株およびこれまでに北半球各地で採集した菌株を、形態・生理性質・交配型・分子系統を基に分類すると3種 (*T. ishikariensis*, *T. canadensis*, *T. hyperborea*) に大別され、さらに2亜種 (var. *ishikariensis*, var. *idahensis*) とした。

国内の分離菌株はいずれも *T. ishikariensis* および *T. canadensis* であり、凍結耐性の高い *T. hyperborea* は確認されなかった。過去の調査では、本種がカムチャッカ半島に分布すること、北海道と同様の緯度経度を有するボ

ルガ地域では少数ながら分離されることから、本種の分布になんらかの地理的要因があることを見出した。今後さらに検討をおこなう予定である。

T. maritima は、鳥取県から北海道の日本海・オホーツク海側に分布が知られている。青森・岩手両県にて本種の分布調査をおこなった結果、日本海側のみならず陸奥湾・津軽海峡および太平洋岸の砂浜にも本種を確認した。

本種は菌核が海水に浮くことで海流分散により、分布を拡大している可能性がある。このため菌核に模したセルロース粒 (φ4mm) を太平洋側の採集地の一つである青森県東通村の砂浜で散布し、その分散と回収率を計測した。散布1週間後、セルロース粒は散布地点から500m程度移動したことを確認した。その回収率は1日後で3%、1週間後で0.06%であった。浜辺への打ち上げ後、砂丘への移動を考慮すると波浪による菌核の移動は、リスクの高い分散手段と判断した。

本種は海浜性のイネ科植物を宿主とするが、北海道室蘭市および青森県沿岸では、キク科シロヨモギやマメ科ハマエンドウより菌核を採集し、培養・遺伝子解析により本種であることを確認し、本種が双子葉植物を宿主にすることを見出した (図1)。特に青森県太平洋側 (六ヶ所村~おいらせ町) で採集したシロヨモギの菌核は、イネ科植物に比較して大型であり、シロヨモギ葉柄に強く固着し、海水に沈むものがあつた。これら結果から、青森県太平洋側の本種は、シロヨモギを宿主とし、日本海側のイネ科植物を宿主とする系統とは異なる生存戦略を有する可能性を見出した。今後はさらに本種個体群の解析を検討している。

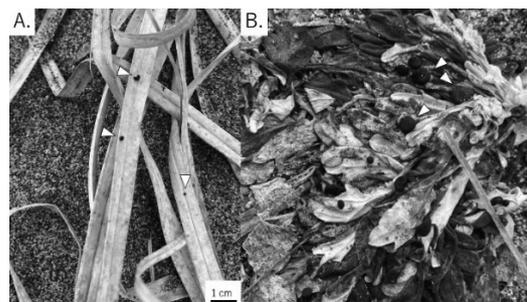


図1 宿主に応じて異なるサイズの菌核を形成するスナハマガマノホタケ。A: 宿主植物はコウボウムギ。B: 宿主植物はシロヨモギ。△は菌核を示す。

Fungi 界に特有なペプチド性化合物生合成因子の生物学的機能解明

梅村 舞子

【目的】糸状菌の分類には有性生殖の有無と種類が重要だが、麹菌のように有性生殖が知られていないものも多い。それらが生来有性生殖能を有していないのか、それとも極限られた環境条件下でのみ起こるため観察が難しいのかの判断は難しい。ところで最近我々は、新しい糸状菌二次代謝経路クラスとして見出したペプチド性化合物生合成因子 (Kex2-processed repeat proteins; KEPs) をゲノム探索・分類し、本因子がほぼすべての Fungi 界菌株に高い配列多様性を持って存在し (図 1), 有性生殖に関与する可能性を見出した (Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7:11, 2020)。そこで本研究では、本因子の種類と分布から真菌類を分類し、本因子の糸状菌有性生殖への関与と役割、二次代謝因子への進化の可能性について、ドライ・ウェット両面の解析からの解明を目指した。

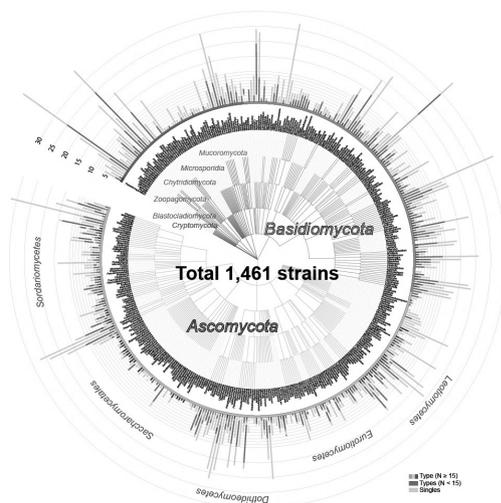


図 1 Fungi 界における KEP 因子の分布

【方法】KEP 因子は、小胞体へのシグナルペプチドと、アミノ酸配列における Kex2 プロテアーゼ認識サイトでの高い繰り返し構造を持つ。この特徴に基づき、公共データベースに登録された Fungi 界菌株の全ゲノム情報から、KEP 因子を探索・分類した。ついで、Ascomycota 門糸状菌の代表的な属および酵母について、単一コピーオーソログの集団から算出した系統樹に沿って、属・種レベルでの KEP 因子の分布と保存性を解析した。また、*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Neosartorya fischeri* について、KEP 遺伝子破壊と子嚢殻形成観察等を行った。

【結果・考察】KEP 因子の周辺には、その繰り返し単位であるペプチドを環化する UstYa ホモログ遺伝子が特異的に集積している。糸状菌 *Aspergillus* 属・*Fusarium* 属・*Penicillium* 属・*Colletotrichum* 属・*Trichoderma* 属における KEP 因子の系統樹上の分布を解析したところ、属レベルで 1~2 種類程度、種レベルで平均 5 種類の KEP 因子が保存されていた。しかしこの属・種レベルでの保存性は、UstYa 環化因子を伴うものでは、伴わないものに比べて低下していた。一方酵母では、一株につき 1~2 種類の、UstYa 環化因子を伴わない KEP 因子しか有さず、その分類は系統樹上の属レベルとほぼ完全に一致していた。

Aspergillus flavus NRRL3357 はヘテロタリックな菌株形成株であり、15 の KEP 因子を持つ。各 KEP 遺伝子破壊株の菌核形成度を観察したところ、3 つについて菌核形成が消失または著しく低下したが、これらはいずれも有性生殖の観察されていない *Aspergillus oryzae* 株で欠損しているものであった。ホモタリックな種である *A. nidulans* および *N. fischeri* の子嚢殻形成度が異なる各 4 株について、ゲノム・全遺伝子発現解析を行ったところ、*A. nidulans* における UstYa 環化因子を伴う 1 つの KEP 因子について、子嚢殻形成度と、配列繰り返し回数および遺伝子発現量が相関していた。そこで、子嚢殻形成株である A4 系統株において本 KEP 因子を破壊したところ、限定的結果ではあるが、子嚢殻形成能の消失を観察した (図 2)。

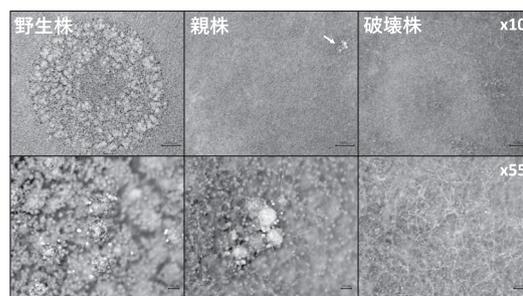


図 2 *Aspergillus nidulans* における KEP 因子破壊の影響

以上の結果は、極めて多様な種が存在するカビが、KEP 由来直鎖ペプチドをフェロモンとして同属を認識し、種レベルで獲得された KEP 由来環状ペプチドにより有性生殖器官の分化等が誘導されるという我々の当初の仮説に反しない。また、KEP 因子群の組み合わせは種の重要な分類指標となりうることが示された。

難培養微生物の培養を目指した新規共培養法の構築

雪 真 弘

【目的】地球上の99%の微生物が未だ培養することが出来ていないと考えられている。もし、これらの難培養微生物が培養可能になれば、莫大な微生物資源を活用でき、様々な産業・学術分野において大きな変革をもたらすことができると考える。

難培養の理由の一つとして、環境中の微生物が様々な異種の微生物と栄養源等を介して相互作用関係にあり、単独では培養することが難しいことが挙げられる。本研究では、複雑な環境中の相互作用関係を模倣した新規共培養システムを構築し、難・未培養微生物の培養を目指した。共培養法は、これまでに様々な手法が開発されている。例えば、寒天培地の上層、下層をフィルターで分け、相互作用する菌を共培養する方法があるが、液体培養でのみ生育する細菌を培養するには適していない。

本研究では、新規共培養法として内部がゾル状態のアガロースゲルマイクロカプセル (AGM) に注目した。AGMは外殻がアガロースゲルで構成されるため、培地成分や代謝物質やタンパク質を透過することが可能である。多種多様な細菌を1細胞ずつ閉じ込めたAGMを培養することにより、各AGM間で相互作用することが予想される。このAGMの特性を活かした難培養微生物の新規共培養法の構築を目的とした(図1)。

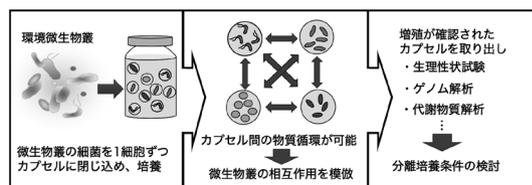


図1 AGMを用いた新規共培養システム

【方法】モデル共生系としてヒト腸内細菌の *Phascolarctobacterium faecium* JCM 30894 と *Bacteroides thetaiotaomicron* JCM 5827^T を用いて実験を行った。 *P. faecium* は単独培養では増殖が弱い、 *B. thetaiotaomicron* と共培養することで、 *B. thetaiotaomicron* が産生するコハク酸を受け取り増殖が良くなることが報告されている。まずAGMに *P. faecium* のみを包埋し、単独で液体培養した。次にAGMに包埋した *P. faecium* と包埋していない *B. thetaiotaomicron* と共培養した。

また、多種多様な細菌が共生しているシロアリ腸内細菌

をAGMに包埋し、混合培養を行った。さらにAGM内で細菌の増殖が確認されたAGMをマイクロマニピレーターで分取後、Phi29 DNA polymeraseを用いてAGM内で全ゲノム増幅し、MiSeqとNanopore MinIONを組み合わせて、ゲノム解析を行った。

【結果・考察】モデル共生系として *P. faecium* と *B. thetaiotaomicron* を用いた実験では、AGMに包埋した *P. faecium* の単独培養に比べて、 *B. thetaiotaomicron* との共培養では顕微鏡観察においてAGM内の *P. faecium* の増殖が良くなることが確認された。この結果から、 *B. thetaiotaomicron* が産生した代謝産物をAGM内の *P. faecium* が受け取ったことにより増殖が良くなったと推察され、AGMが共培養に適応できることを確認した。

シロアリ腸内細菌叢を用いた培養では、新規性が高い細菌を含む複数の細菌種をAGM内で培養することに成功した(図2)。ゲノム解析の結果、 *Dysgonomonas* 属細菌の4.24Mbpの完全長ゲノム配列を取得し、ゲノム系統樹から新規性が高い細菌であることが示唆された。このAGMを用いた方法は新規細菌の分離培養と少量の細胞からの完全ゲノム解読に極めて有効であることが示唆された。

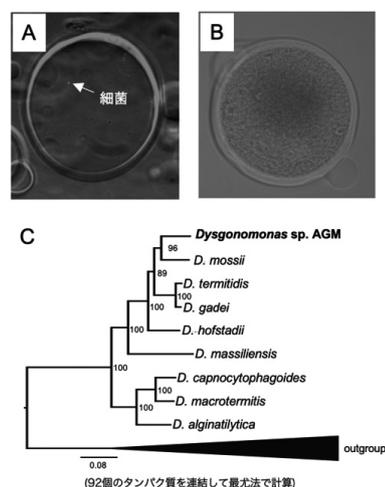


図2 細菌1細胞を包埋したAGM (A)、AGM内で増殖した *Dysgonomonas* 属細菌 (B)、 *Dysgonomonas* 属細菌の系統関係 (C)

本研究は、理化学研究所バイオリソース研究センターで実施された。

一大未知生物群“深海・外洋性ディプロネマ類”の実体と 多様性の理解, および分類体系の整理

矢吹 彬 憲

【目的】ディプロネマ綱(類)は、ミドリムシ等が含まれるユーグレノゾア門に含まれる真核微生物の一群である。2014年までは、わずか2属12種のみが含まれる規模の小さい生物群であったが、環境DNA解析からは海洋、特に深海において数多くの未記載種が生息している可能性が示されていた。それら実体が不明なメンバーの理解は、海洋生物の真の多様性と海洋(微)生物生態系の成り立ちをより正確に理解する上で重要であり、その促進が期待されていた。本研究では、それら未記載種の分布実態の把握と記載報告を目指すとともに、ディプロネマ綱全体の分類学的再整理を目指して研究を実施した。【方法】東京湾海面直下・相模湾水深800m・駿河湾水深397m・新江ノ島水族館の飼育水槽より海水を収集し、0.45 μ mのフィルターで濾過後に環境DNAの抽出を行った。一部の海水は、Hemi培地を用いて培養し、光学顕微鏡下での観察とディプロネマ類の単離を行い、培養株確立に用いた。環境DNAは新たに開発したプライマーを用いてバーコード配列(18S rRNA 遺伝子 V4 領域約470bp)の増幅とシーケンスを行い、ディプロネマ類の分布実態の把握と解析手法の有効性を検討した。また、海水取得時に測定した水温・濁度・塩分等の環境パラメータ情報と環境DNA解析から得られた群集構造情報との比較解析を行った。確立した培養株からは形態情報と分子情報の収集を行い、その分類学的取り扱いについて検討した。

【結果・考察】

相模湾・駿河湾の深層水由来の環境DNAよりバーコード配列の増幅と超並列シーケンサーによる配列取得を行った結果、サンプル間で若干の違いはあるものの、全リード数のうち概ね99%がディプロネマ類由来であった。このことより、新たに開発したプライマーはディプロネマ類の配列を選択的に増幅し検出可能であることが確認された。実際にこの検出系を用いた解析から、東京湾の表層、相模湾と駿河湾の深海域、新江ノ島水族館の飼育水槽内に目的生物が分布・存在し、特に相模湾と駿河湾の深海には“深海・外洋性ディプロネマ類”が属すDSPDHクレードに含まれる多様な系統が分布・存在していることを明らかになった(図1)。さらに環境DNA解析を進めた結果、駿河湾と相模湾の深海域におけるディプロネマ類の群集構造は、各サイト間で季節を通じ

て保存されている傾向があることや水温や濁度などの影響を受け変化する可能性があることが認められた。また、各サンプルより得られた多様性情報を比較することで、普遍的に分布する可能性が高い系統やサンプル特異的に出現する系統に関する情報を得ることも出来た。特に普遍的に存在する系統は、より広い環境に生息可能である可能性も想定されるため、比較的培養株として確立しやすい可能性があると考えている。

実際に培養株の確立を目指す取り組みとしては、目的生物の存在が環境DNA解析から確認された新江ノ島水族館に設置された深海生物の飼育水槽の水を用いた探索を行なった。その結果、光学顕微鏡観察から未記載のディプロネマ類と期待される4培養株を確立したが、配列解析からは新規性を示す結果が得られなかった。ここから、遺伝学的には極めて近くても形態的には区別可能な状態にある可能性が示唆されたが、その詳細把握には今後のより詳しい解析が必要である。また、これまでに確立していた培養株の精査を進める中で、ディプロネマ綱全体の形態的多様性に関する知見を再収集し、これまで *Diplonema* 属としてまとめられていたメンバーを新たに3つの属に分けることなどディプロネマ綱全体の分類体系を再整理した。

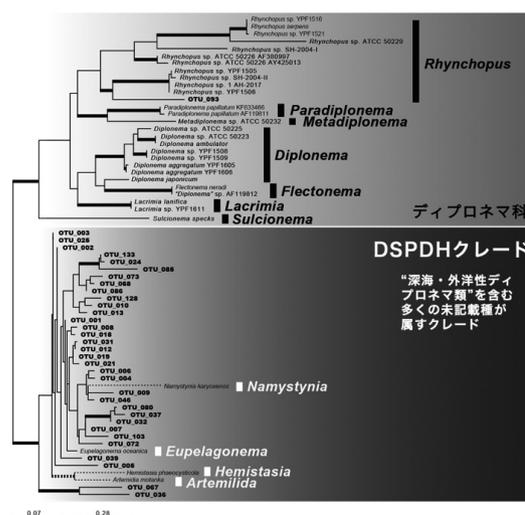


図1 相模湾および駿河湾の深海域より検出した系統(OTU-数字で示す)を含むディプロネマ綱内の系統分岐関係

白癬菌における分類体系の再検討と薬剤耐性との関連性に関する研究

山田 剛

【目的】白癬菌 *Trichophyton indotineae* は白癬の原因菌の1つで、数年前に *T. mentagrophytes/T. interdigitale* 複合群から独立した新種として提案がなされた。本菌では、アザール系抗真菌薬、テルビナフィンの低感受性株に関する知見が散見される一方、アゾール剤への感受性に関する知見は少ない。白癬菌の薬剤耐性化に関する研究で申請者と協力関係にあるスイスの研究グループは、スイス国外で分離された *T. indotineae* を多数収集しライブラリー化している。そこで、ライブラリーに含まれる30株以上の *T. indotineae* を対象に、2種類のアゾール、イトラコナゾール（以下、ITC）とボリコナゾール（以下、VRC）に対する感受性を調査した結果、複数の低感受性株が見出された。本研究では、これらの株に共通するアゾール低感受性化の原因の解明に取り組んだ。

【方法】CLSI broth microdilution method の変法による ITC/VRC 感受性調査で見つかった4株のアゾール低感受性株 (TIMM20116~20119) と2株のアゾール感受性株 (TIMM20114, 20115) を用いて、薬剤低感受性機構の解析を行った (表1)。解析は、過去に白癬菌で報告された2つの薬剤低感受性化の仕組み、(1)薬剤の作用標的分子中のアミノ酸変異、(2)アゾールを細胞外に排出するトランスポーターの過剰発現、との関連を明らかにすることから開始した。

【結果・考察】各菌株の菌糸からゲノムDNAを抽出し、アゾールの作用標的である CYP51A と CYP51B (共に lanosterol 14 α -demethylase) をコードする *CYP51A* および *CYP51B* 遺伝子を PCR で増幅し、塩基配列を比較解析した。その結果、3つのアゾール低感受性株 (TIMM20116, 20118, 20119) の *CYP51B* 遺伝子のコーディング領域中に、タンパク質の443番目のアミノ酸、グリシン (G) がグルタミン酸 (E) に変異する点変異が見つかった。そこで、遺伝子操作しやすく、分子系統的に *T. indotineae* に近い *T. mentagrophytes* のアゾール感受性株を宿主に用いて、先の G443E アミノ酸変異を含む *CYP51B* を発現する変異株を作出した。ところが、変異株のアゾール感受性に明確な変化は認められなかった。次に、qRT-PCR法を用いて、ITCやVRCの排出が示唆される4種類のアゾール排出トランスポーター (MDR1, 2および3, MFS2) の遺伝子発現量を比較解析した結果、TIMM20118と20119で *MDR3* 遺伝子の過剰発現が認められた。そこで、これら2株の *MDR3* 遺伝子を破壊した変異株を作出したものの、何れの変異株のアゾール感受性にも顕著な変化は認められなかった。以上の結果から、*T. indotineae* におけるア

ゾール低感受性化の新たな仕組みの存在が示唆された。そこで我々は再度 qRT-PCR法を用いて *CYP51A* および *CYP51B* 遺伝子の発現量を比較解析したところ、全てのアゾール低感受性株で *CYP51B* 遺伝子の過剰発現が認められた。そこで、TIMM20119から単離した *CYP51B* 遺伝子の cDNA をアゾール感受性株 TIMM20114 で過剰発現させたところ、アゾール感受性の低下が認められた。逆に、RNA 干渉技術を用いて2つのアゾール低感受性株 (TIMM20116, 20118) における *CYP51B* 遺伝子の発現を抑制したところ、アゾール感受性が改善した。以上の結果から、*T. indotineae* におけるアゾール低感受性化への *CYP51B* 遺伝子の過剰発現の関与が予想された。そこで、サザンハイブリダイゼーション法を用いて、6株のゲノム中の *CYP51B* 遺伝子のコピー数を解析したところ、2つのアゾール感受性株 (TIMM20114, 20115) とアゾール低感受性株 TIMM20117 では1コピー、その他3つのアゾール低感受性株は複数コピーの *CYP51B* 遺伝子が存在すると予測された。そこで、1分子リアルタイム DNA シークエンス技術を用いて、これら6株の全ゲノムシークエンスを解析したところ、TIMM20114, 20115 および 20117 の *CYP51B* 遺伝子座には1コピーの *CYP51B* 遺伝子が存在するのに対し、TIMM20116 と 20119 では5コピーの、そして TIMM20118 では7コピーの *CYP51B* 遺伝子がタンデムリピート化した状態で *CYP51B* 遺伝子座に存在することが判明した (表1)。

表1 本研究に使用した *T. indotineae* の表現型と遺伝子型に関する特徴

Species and isolate no.*	ITC MIC ₅₀ (μ g/ml)	VRC MIC ₅₀ (μ g/ml)	Fold expression of <i>CYP51B</i> (mean \pm SD) ^b	<i>CYP51B</i> copy number within genome
<i>T. indotineae</i>				
TIMM20114 (IFM 67092)	0.06	0.015	1	1
TIMM20115 (IFM 67093)	0.06	0.03	1.1 \pm 0.4	1
TIMM20116 (IFM 67094)	1.0	1.0	34.0 \pm 5.3	5
TIMM20117 (IFM 67095)	0.5	0.5	9.6 \pm 0.7	1
TIMM20118 (IFM 67096)	0.5	1.0	35.0 \pm 12.1	7
TIMM20119 (IFM 67097)	1.0	1.0	68.5 \pm 25.3	5

*All strains were from a previously published resistance study in India. They were then preserved in the culture collection of Teikyo University Institute of Medical Mycology (TIMM) and Medical Mycology Research Center, Chiba University (IFM), through the National Bio-Resource Project, Japan (<http://www.nbrp.jp/>).

^bResults represent expression levels from three independent real-time PCR experiments. Expression levels of *TmCYP51B* genes were indicated as relative fold changes compared to the CT mean of the data from TIMM20114.

以上の解析結果から、本研究で見出された *T. indotineae* のアゾール低感受性化の主な原因は、*CYP51B* 遺伝子に繰り返し重複が起こり、ゲノム上でタンデムリピート化したことによって *CYP51B* が過剰発現したことであると判明した。但し、TIMM20117は *CYP51B* 遺伝子が1コピーであるにも関わらずアゾール低感受性であることから、別の原因によるものと考えられ、更なる解析が待たれるところである。

好熱性シアノバクテリアの系統分類体系と菌株コレクションの確立

春 田 伸

【目的】好熱性シアノバクテリアは、生物進化や光合成機構の研究、産業応用など多分野で有用な細菌である。米国オレゴン大学では日本を含む世界中から収集した好熱性シアノバクテリア株を保有していたが、主たる管理者であったRichard W. Castenholz博士の没後、未整理の状態が続いている。これら菌株の多くは、ゲノム情報はおろか、16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報も揃っていない。本研究では、未整理の好熱性シアノバクテリアについて遺伝子塩基配列情報を取得し再分類・整理するとともに、系統学的に特徴づけることを目的とした。

【方法】シアノバクテリア細胞からDNAを抽出し16S rRNA 遺伝子断片をPCR増幅した。増幅したDNA断片の塩基配列はサンガー法により決定した。ゲノム解析には、DNBSEQ-G400 (MGI Tech) およびGridION (Oxford Nanopore Technologies) を用いた。シアノバクテリアの培養、形態・生理試験は常法に従って行った。アセチレン (C₂H₂) 還元活性 (エチレン生成量) の測定には、FID検出器搭載GC (GC-2014, Shimadzu) を用いた。

【結果・考察】細胞形態と培養温度以外の情報がなかったオレゴン大学コレクションの約100株について、16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。系統解析の結果、これらは8科9属 (*Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Neosynechococcus*, *Halomicronema*, *Cymatolege*, *Acaryochloris*, *Desertifilum*, *Limnothrix*, *Chroococcidiopsis*) に分けられると考えられた。なかには既報配列との相同性が90%以下と低い株もあった。

オレゴン大学コレクションの好熱性株のうち、古い系統群に位置する単細胞性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. C9 (=CCMEE 5213) 株についてゲノム情報を取得・解析した。近縁系統の好熱性 *Synechococcus* 株 JA3-3Ab, JA-2-3B'a との比較結果を表1にまとめた。

表1 *Synechococcus* 株の比較

	C9	JA-3-3Ab	JA-2-3B'a
Genome size (Mbp)	2.96	3.05	2.93
GC mol%	52.9	58.5	60.2
No. of rRNAs	1	2	2
No. of tRNAs	44	47	44
<i>nifHDK</i> genes	+	+	+
<i>nifT</i> gene	-	+	+

+, positive; -, negative

これら *Synechococcus* 株の16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性は87~88%であり、Average Nucleotide Identity (ANI) は65~67%と低かった。またC9株は窒素固定関連遺伝子のうち *nifT* 遺伝子を欠損していた。分子系統解析の結果、C9株は既知近縁種とは独立しており、シアノバクテリアの起源に近い古い系統であると考えられた。

次いで、系統分類研究が進んでいなかった糸状性シアノバクテリア *Chlorogloeopsis* について解析した。*Chlorogloeopsis* についても古くから好熱性株の報告があり菌株保存機関に寄託されていた株もあるが、系統分類情報が不足しているばかりでなく、いくつかの菌株についてはすでに消失してしまっている。そこで、日本の温泉から新たに好熱性株 (ON57a株) を分離し、菌株保存施設に寄託するとともに、既知近縁種との比較解析を行った (表2)。

表2 *Chlorogloeopsis* 株の比較

	ON57a	PCC 7702	PCC 9212
Growth at 38°C	+	+	+
Growth at 50°C	+	+	-
under far-red light	-	-	+
on succinate	-	-	+
C ₂ H ₂ reduction	+	-	+
Motility	+	-	+
Genome size (Mbp)	4.90	4.90	7.65
GC mol%	42.4	41.9	41.5
<i>nifHDK</i> genes	+	+	+
<i>vnfDG</i> genes	+	-	-

+, positive; -, negative

生理・形態学および遺伝学的な解析から、ON57a株を含む好熱性系統群 (PCC 7702株, PCC 7518株) は、広く生化学研究の進んでいた中温性株 (PCC 9212株, PCC 6912株) と明確に区別できることが明らかになった。またPCC 7702株とPCC 7518株にも、かつては窒素固定活性および運動性が報告されていたが、今回の試験では検出されず、新たに分離したON57a株はこれらの性質を有していた。以上から、ON57a株は *Chlorogloeopsis* 好熱性系統群の基準株として有効であると考えられる。

酢酸菌群の光に対する適応応答の包括的理解

高野 英 晃

【目的】 酢酸菌は好氣的酸化により酢酸や機能性分子を生産する有用微生物であり、果実や花といった植物性炭水化物が多く含まれる環境から分離される。我々はビタミンB₁₂をクロモフォアとする新しい光センサーLitRファミリーの細菌における多様な分布を明らかにしてきた。しかし、酢酸菌における光応答に関する知見は見つからない。我々のゲノム情報に基づく予備調査によって、酢酸菌の一部は、(i) 青色光センサー (LOV) と DNA 結合ドメイン (HTH) が融合した LOV-HTH タンパク質 (図 1A), (ii) ヒスチジンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレーター (RR) が融合した LOV-HK-RR タンパク質のホモログを保有することが示唆され、クロモフォアであるフラビンの相互作用に必須なアミノ酸残基が保存されていたことから、青色光センサーとして働くことが強く示唆された。本研究では、LOV 保有酢酸菌を対象とした遺伝子発現解析によって、光感知能力を持った酢酸菌の同定とその LOV 遺伝子の機能解明を目的とした。

【方法】 研究対象とした *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388, *Komagataeibacter europaeus* JCM 16935 は公的分譲機関より取寄せた。遺伝子発現解析には、(i) セミ定量 RT-PCR 法および (ii) β -グルクロニダーゼをレポーター酵素とする転写活性測定法を用いた。広宿主域プラスミド pCM130 は米国 Addgene より取寄せた。

【結果・考察】 ドイツの酢酸発酵槽由来の *K. europaeus* JCM16935 株、国内干し柿由来の *G. liquefaciens* NBRC 12388 を明・暗条件において培養し、セミ RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った結果、LOV-HTH の発現は構成的であったが、隣接する DNA 修復酵素遺伝子 *phr* の発現は青色光によって顕著に誘導された。このことから、LOV-HTH が *phr* の発現に対して正に作用するアクチベーターとして機能することが予想された (図 1A)。一方、LOV-HK-RR および近傍のカロテノイド合成遺伝子の発現は、暗条件に比べて明条件で転写レベルの若干の増加が確認された。

次に *G. liquefaciens* NBRC 12388 の DNA 導入系を確立した。RK2 ori とテトラサイクリン耐性遺伝子を有する pCM130 プラスミドが、酢酸菌群に一般的なエレクトロポレーションおよび接合伝達によって効率的に本菌に導入可能であることが判明した。また、レポーターアッセイベクターとして pCM130 に大腸菌 β -グルクロニダーゼ (GUS) を導入した pCM130GUS を構築した。

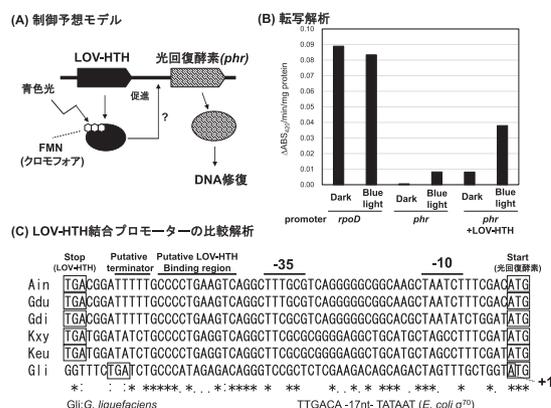


図 1 *G. liquefaciens* の光誘導モデル (A), 光誘導性転写活性 (B), LOV-HTH 認識配列 (C)

pCM130GUS を用いて *G. liquefaciens* における転写レベルの光誘導を解析した結果、*phr* プロモーター活性は光によって上昇した (図 1B)。また、同プラスミド上への LOV-HTH 遺伝子の追加導入によって、その転写はさらに上昇し、生育必須遺伝子 *rpoD* プロモーター活性の 50% 程度であった (図 1B)。このことは LOV-HTH が *phr* プロモーターに作用するアクチベーターであることを示している。また、本系を用いたプロモーターサブクローニング実験によって、LOV-HTH 結合領域は、*phr* 開始コドンから上流 40 から 50bp 付近であることが示唆された (図 1C)。転写開始点はダナフォーム社の改良型 CAGE 法によるゲノム全体の網羅的な決定によって、*phr* 遺伝子開始コドン (ATG) の A であることを明らかにした。

ゲノム比較解析によって、*G. liquefaciens* の LOV-HTH 近傍には、光酸化ストレスセンサーとして働くアンチ σ 因子 ChrR のホモログがコードされていることが判明した。つまり、2 種類の光感知システム、(i) 光を直接感知する LOV-HTH、(ii) 細胞内光増感物質 (ヘムなど) の光受容に伴って発生する活性酸素種を感知する ChrR が存在する。同様の 2 種の光感知系保有菌として *G. dulcium* LMG 1728 と *G. diazotrophicus* NBRC 110704 にも見られる。

本成果は果実・花などに棲息する酢酸菌群の生態に新たな知見をもたらすと同時に、光によって遺伝子オンオフを可逆的かつ非侵襲的に制御する光遺伝学への応用利用が見込まれる。現在、酢酸菌を宿主とした光誘導型物質生産系の構築に取り組んでいる。

脂質非対称バイオセンサーの開発を通じた生体膜研究のボトルネック解消と 細胞外物理化学変数の感知機構に関する新奇概念の提唱

小原 圭介

【目的】細胞膜の脂質二重層では内外層で脂質組成が大きく異なる(図1)。その様な脂質非対称の維持と調節は細胞の生存に必須である。しかし、現在では生きた細胞で脂質非対称の状態をモニターできず、研究のボトルネックとなっている。私は出芽酵母を用いて、脂質非対称の状態変化を感知して適応反応を引き起こす脂質非対称センサーRim21を同定した。また、そのセンサーモチーフを同定し、その部分を含むC末端細胞質領域(Rim21C)を切り出してGFPに融合することで、生きた酵母細胞で脂質非対称変化を可視化できるバイオセンサーの雛型を作製した。本研究では、1. バイオセンサーを改良しS/N比を向上する、2. 様々な環境下でバイオセンサーの挙動を追跡し、脂質非対称に影響を与える細胞外因子を明らかにする、ことを目指した。

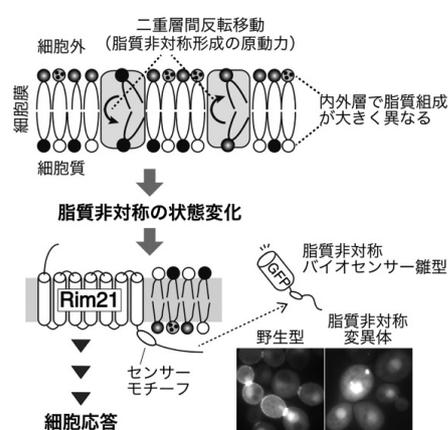


図1 Rim21による脂質非対称の感知とバイオセンサー

【方法】GFP-Rim21Cを雛型として、Rim21C内の荷電アミノ酸残基(脂質非対称の感知に関わると予想される)やセンサーモチーフ近傍の保存された領域に対して系統的な変異導入を行った。その変異GFP-Rim21Cあるいは変異を導入したRim21Cをタンデム連結してGFPに融合したコンストラクトを酵母細胞に導入し、脂質非対称の変化に応じた挙動を蛍光顕微鏡で観察した。

上記の変異解析でS/N比が向上した改良版バイオセンサーについて、その挙動を様々な細胞外ストレスに曝した酵母細胞で観察することで、脂質非対称の状態に影響を与える細胞外ストレスを探索した。

Rim21Cの組換えタンパク質を精製し、各種脂質分子との結合を脂質オーバーレイアッセイ法により検証した。

【結果・考察】GFP-Rim21Cに系統的な点変異を導入した結果、センサーモチーフ近傍の保存領域に点変異を導入したRim21C変異体[Rim21C(mtA)]およびそれをタンデムに連結したRim21C(mtA x 2)をGFPに融合した際に、脂質非対称変化に対する挙動の変化(通常は細胞膜に結合し、脂質非対称変化に応じて細胞膜から解離する)がより高いコントラストで検出できるようになった(図2)。この改良版および雛型を用いて様々なストレス下で培養した酵母を観察したところ、外界のpH上昇および高塩ストレスによって脂質非対称が変化している可能性が示された。外界のpH上昇では、実際に脂質分子の内外層間反転移動が抑制されて脂質非対称が乱されていることも示唆された。興味深いことにRim21は外界のpH上昇や高塩ストレスに対する適応に必要であった。つまり、これらのストレスが脂質非対称の変化を通して感知される可能性が示された。細胞膜全体が細胞外の物理化学ストレスのうちの少なくとも一部に対するセンサーの役割を担っているのかも知れない。

Rim21Cが脂質非対称変化を感知する仕組みを明らかにするためにRim21Cの組換えタンパク質を精製し、各種脂質との結合を調べたところ、酸性脂質の幾つかと結合することが明らかになった。これらの酸性脂質は、細胞内ではほとんどが内層側に存在することやRim21Cのセンサーモチーフでは正電荷を持つアミノ酸残基が細胞膜との結合に必要であることから、実際の細胞内での相互作用を反映している可能性がある。すなわち、Rim21Cは内層の酸性脂質の量やそれらが作り出す負の表面電荷の強さをモニターすることで、脂質非対称の状態変化を感知している可能性がある。

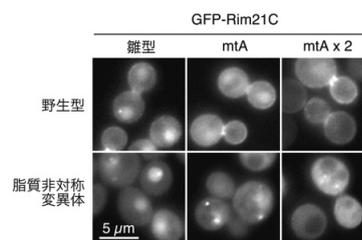


図2 脂質非対称バイオセンサーの雛型と改良版

病原性細菌における毒素遺伝子保有ファージを誘発する因子およびファージ獲得機構の解析

島村 裕子

【目的】 *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) が産生する毒素 (staphylococcal enterotoxin A; SEA) は、毒素型食中毒を引き起こすだけでなく、感染症やアトピー性皮膚炎等の誘発および悪化に関与する。この SEA 遺伝子は、テンプレートファージ上に存在していることから、SEA に起因する食中毒や感染症等の疾病を防止するためには、ファージによる SEA 遺伝子の伝播を抑制することが重要である。本研究では、病原性細菌である黄色ブドウ球菌の SEA 遺伝子の伝播機構の解明を目的に、SEA 遺伝子伝播株の性状および SEA 遺伝子を受容する SEA 非産生株 (レシピエント) の性状を解析した。

【方法】 SEA 遺伝子アクセプター株 (レシピエント) として SEA 非産生株 6 菌株を、SEA 遺伝子ドナー株として No.29 株 (SEA⁺) を用いた。黄色ブドウ球菌が放出する菌体由来分子を包み込んだ膜小胞 (メンブレンベシクル; MVs) の構造は、ファージと似ていることから、バクテリオファージ関連遺伝子と密接な関係があることが示唆されている。そこで、SEA 非産生株の培養上清を加えて溶菌を誘導した No.29 株 (SEA⁺) の培養上清から 0.2 μm フィルターで菌体を除去した後、限外ろ過 (100kDa カットオフ) および超遠心分離 (150,000×g, 3h) して MVs (沈殿画分) を調製した。調製した MVs 中の SEA タンパク質、SEA ファージの有無および MVs を介した SEA 非産生株 (No.77 株) への SEA 遺伝子の伝播について検討した。また、溶菌を誘導した No.29 株から調製した MVs の粒子径、溶血活性および内包タンパク質の変化を調べた。No.77 株 (レシピエント) の培養上清に含まれる溶菌誘導物質を探索するために、No.29 株 (SEA⁺) と No.77 株 (SEA⁻) を単独培養または透析共培養した際の培養上清について LC/MS 分析を行った。さらに、SEA 遺伝子伝播を受容する SEA 非産生株の特徴を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて No.29 株 (SEA⁺, ドナー株)、No.77 株 (SEA⁻, レシピエント株) および No.29 株由来の SEA 遺伝子が No.77 株に伝播した No.77-L22 株 (SEA⁺) の全ゲノム解析を行った。

【結果・考察】 No.29 株由来の MVs には、SEA タンパク質および SEA ファージが内包されていた。この MVs を EDTA 処理により破壊して、No.77 株 (SEA⁻) に添加したところ、SEA 遺伝子の伝播が認められた。また、溶菌を誘導した No.29 株では、MVs の粒子径が大きくなり、病原因子を制御する *agr* システムが活性化するこ

とにより、溶血毒素 (β -hemolysin) が MVs に内包された。溶菌を誘導した No.29 株由来 MVs 内では、delta-aminolevulinic acid dehydratase, Fe/B₁₂ periplasmic binding protein 等の溶血活性や遊離鉄の取り込みに関わる複数のタンパク質の増加が認められた。No.29 株 (SEA⁺) と No.77 株 (SEA⁻) を単独培養または透析共培養した際の培養上清を LC/MS 分析にて比較したところ、培地のみと各培養上清から検出されたピークに差が認められなかったことから、培養上清の分画物をさらに精製して溶菌誘導活性を確認する予定である。

No.77 株 (レシピエント) に No.29 株の SEA ファージが挿入されると考えていたが、ドナー株とレシピエント株の全ゲノムを解読したところ、No.77 株は、*hlyB* 遺伝子領域に既にファージが存在しており、SEA 遺伝子の伝播が確認された No.77-L22 株では、元のファージの挿入位置に No.29 株の SEA ファージ配列が挿入されていた (図 1)。この No.77 株の保有するファージは、enterotoxin type A/P を保有する ϕ BU01 と類似した配列を有していたが、既報のファージとは異なり、今後、さらに解析する必要がある。また、No.29 株の SEA 遺伝子を受容する SEA 非産生株 (レシピエント) の保有ファージ (SEA⁻) のタイピングを行ったところ、No.29 株が保有するファージテイル (ϕ Mu3A) と同様のタイプであった。このことから、同様のファージテイルを保有する菌株間で SEA 遺伝子が伝播することが示唆された。

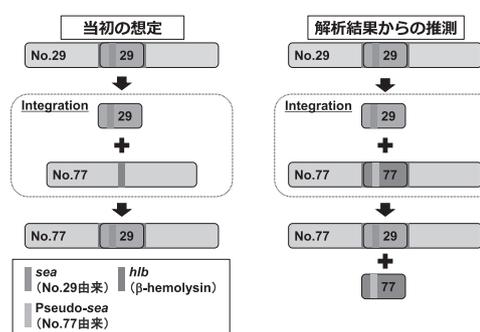


図 1 SEA 遺伝子保有ファージの挿入

本研究の成果および今後のさらなる研究により、SEA 遺伝子伝播の全容を明らかにすることで、細菌の進化のメカニズムの解明および SEA に起因する食中毒等の疾病の有効な予防・治療法の開発が期待される。

腸内細菌科細菌における新規カルバペネム高度耐性機構の解明

多田 達哉

【目的】 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 CRE (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* の略) が地球規模で医療安全を脅かしている。我々はこれまでのアジア諸国で分離された CRE が種々のカルバペネム耐性因子を保有し、それらの因子が医療施設で蔓延していることを明らかにしてきた。ほとんどの CRE はカルバペネマーゼを産生する CPE (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* の略) であるが、一部の CRE はカルバペネマーゼをコードする遺伝子を保持していないにもかかわらず、カルバペネム高度耐性を示すものが存在する。本研究の目的はカルバペネマーゼ非産生型 CRE の新規カルバペネム耐性メカニズムを明らかにすることである。

【方法】 大腸菌 DH5 α を用いて *mutS* 遺伝子欠損大腸菌株を作製し、カルバペネム系薬であるメロベネムの濃度を段階的に増加させた培地で継代培養した。継代前及び継代後の *mutS* 欠損大腸菌を用いてカルバペネム系薬、セフェム系薬およびモノバクタムを含む β -ラクタマーゼ、アミノグリコシド系薬及びキノロン系薬に対する薬剤感受性プロファイルを作成した。薬剤耐性獲得前と薬剤耐性獲得後の大腸菌のゲノムを抽出し、次世代シーケンサを用いて全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析により変異部位を特定した。薬剤耐性獲得前と薬剤耐性獲得後の大腸菌から RNA を抽出し、RNA-Seq 解析により RNA 発現を比較した。

【結果・考察】 大腸菌 DH5 α を用いて *mutS* 破壊株を作製し、メロベネム含有培地で継代した結果、10代継代でメロベネム耐性「最小発育阻止濃度 (MIC) 4 μ g/ml 以上」となり、耐性化した。この継代株における各種 β -ラクタム剤の最小発育阻止濃度を決定したところ、セフェム系薬及びイミペネムを除くカルバペネム系薬で有意に上昇がみられたが、ペニシリン系薬に対する MIC 値に変化は見られなかった (表1)。アミノグリコシド及びキノロン系薬に対する MIC に変化は見られなかった (表1)。さらに、本破壊株において継代前の株と10代継代株の全ゲノム解析を行ったところ、115塩基の置換あるいは欠損が見られた。RNAseq を行ったところ、内・外膜に参与する遺伝子 (*ompA*, *ompT*, *ompX*) 及び鉄代謝に参与する遺伝子 (*hemB*, *marA/B/R*) の発現が有意に発現上昇していた。さらに、これらの内、*mutS* による遺伝子変異と関連して発現量が変化した遺伝子は *hemB* であると考えられた。*hemB* のプロモータ領域 (上

流 295 番目の塩基が A から C に変異) に変異が確認され、それが原因で *hemB* 発現を上昇させていることが示唆された。*hemB* は細菌におけるヘミン合成に参与しており、ポルフィリン合成経路の一端を担っている。その他の *hem* 遺伝子の発現を解析したところ、*hemF* は上昇し、*hemH* 及び *hemX* では減少していた (図1)。*hemA*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemG*, *hemL*, *hemN* 及び *hemY* においては僅かな変化は見られたものの、有意差は見られなかった。

mutS 欠損大腸菌株において、継代前と継代後の増殖速度を比較した結果、継代後の増殖は僅かに低下したものの大きな差は見られなかった。

hem 遺伝子の欠損が菌の増殖に影響を与えることにより、特定の薬剤に耐性を示す研究はいくつか報告されている。しかし、 β -ラクタム系でもセフェム系及びイミペネムを除くカルバペネム系薬に対して感受性を低下させる遺伝子欠損あるいは遺伝子変異は報告されていない。本研究から *hem* 遺伝子変異が β -ラクタム系の耐性にも影響を与えることが示唆された。

表1 薬剤感受性試験

各種抗菌薬	最小発育阻止濃度 (μ g/ml)		
	DH5	Δ <i>mutS</i> 継代前	Δ <i>mutS</i> 継代後
Penicillin	32	32	32
Cefradine	16	16	128
Ceftazidime	0.25	0.25	4
Imipenem	0.5	0.5	0.5
Meropenem	0.06	0.06	4
Aztreonam	0.5	0.5	4
Amikacin	0.5	0.5	0.5
Ciprofloxacin	<0.063	<0.063	<0.063

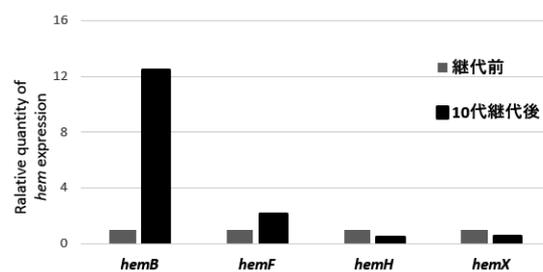


図1 *mutS* 遺伝子欠損株における継代前及び10代継代後の *hem* 遺伝子の発現量の変化

オートファジーから逃れるタンパク質の網羅的解析

古川 健太郎

【目的】 オートファジーは、酵母からヒトまで保存された細胞内タンパク質やオルガネラの分解およびリサイクル機構である。栄養飢餓など様々なストレスによってオートファジーが誘導されると、細胞質内に隔離膜と呼ばれるカップ状の膜構造が出現し、伸展とともに細胞質成分を包み込み、膜が閉じることによって二重膜のオートファゴソームが形成される。引き続き、オートファゴソームはリソソーム（酵母や植物では液胞）と融合し、取り込まれた細胞質成分は加水分解酵素の作用によってアミノ酸・核酸・脂肪酸にまで分解され、最終的に細胞質へ戻され再利用される（図1）。

オートファジーにおいて、通常のタンパク質は無作為に分解されると考えられている。しかしながら、特定のタンパク質は分解から積極的に逃れることによって、生理機能を発揮した方が有利な状況もあるはずだが、そのような概念（図1：オートファジーエスケープ、以下エスケープ）はほとんど検証されていない。本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてオートファジーから逃れるタンパク質を同定し、エスケープの概念を実証することを目的とした。

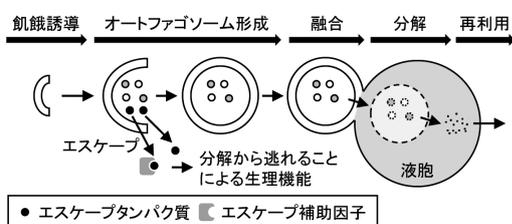


図1 オートファジーエスケープの概念

【方法】 エスケープタンパク質を同定するため、内在性プロモーター制御下でGFP融合タンパク質を発現させた。オートファジーによりGFP融合タンパク質が液胞に運ばれると、タンパク質は速やかに分解されるが、GFPそのものは液胞内でも安定であるため分解されにくく、ウェスタンブロット解析で検出される（図2A）。そこで、ラパマイシン添加によるオートファジー誘導後に分解されない、すなわちGFP単体が検出されない融合タンパク質を網羅的に探索した。発現レベルの低さが原因でGFP単体の検出が困難な場合、蛍光顕微鏡を用いた液胞内GFP蛍光の有無による判断（図2B）、あるいは、強力なプロモーターへの置換によって発現量を増加させた。

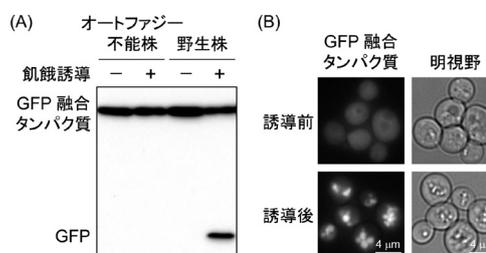


図2 オートファジーの検出方法

【結果・考察】 本研究で解析したGFP融合タンパク質のパターンとして、①高発現タンパク質はGFP単体が容易に検出されたことから、オートファジーによって無作為に分解されやすいタンパク質とその発現レベルは正の相関があると考えられた。しかしながら、ヒストンなどの高発現タンパク質であっても、オートファジーの標的になりにくい核内などに局在する場合は分解されにくいことが確認された。②低発現タンパク質はウェスタンブロットでも蛍光顕微鏡でも明瞭な結果が得られない傾向があり、オートファジーの標的となっているのか判断できなかった。強力なプロモーター制御下で再検討した結果、分解が確認されるケースが見られたことから、やはり、発現レベルとの相関があるという結論に至った。

本研究における解析の中から、オートファゴソーム形成因子に焦点を当てた結果を紹介したい。オートファゴソーム形成因子は、その機能から6つのグループ、(a) Atg1プロテインキナーゼ複合体、(b) Atg9小胞、(c) PI3キナーゼ複合体、(d) Atg2-Atg18複合体、(e) Atg8結合反応系、(f) Atg12結合反応系に分類される。これらの因子は、オートファゴソーム直下もしくは近傍に局在することから、オートファジーによって分解されやすいと予想した。実際、(b)~(e)のグループに属する因子のほぼ全ての分解が確認されたが、(a)に属する因子 (Atg1-13-17-29-31) のうちAtg1以外は分解されにくいことが分かった。Atg1以外の因子は再利用を目的として分解されにくい可能性が考えられるが、それではなぜAtg1は分解されるのだろうか？ Atg1はAtg8結合モチーフを有するため、複合体を形成せずにフリーで存在しているAtg1がAtg8に補足されて分解された可能性、Atg1を複合体から切り離して分解することがオートファジーの負の制御となっている可能性などが考えられ、更なる検証が必要である。

細菌べん毛成長端の機能構造解析に基づくべん毛形成機構の解明

今田 勝 巳

【目的】多くの細菌は、繊維状の運動器官であるべん毛を用いて自身に適した環境へ移動する。べん毛運動性を失うと病原性は極端に低下し、バイオフィーム形成も阻害されるなど、べん毛は細菌の生存・感染に重要である。べん毛は約30種類の蛋白質が多数集合してできた超分子複合体である。その大部分を占めるべん毛繊維は、約2万個のフラジェリン分子(FliC)で構成されるらせん状集合体で、先端に5個のFliD蛋白質でできた蓋(キャップ)が存在する。べん毛はパイプ様の中空構造を持ち、菌体内で合成されたFliCはこのパイプを通過して先端まで運ばれ、キャップ直下でべん毛に組込まれる。しかし、キャップが先端に結合した状態でどのように連続してFliCを組込むのか、FliCのfoldingと結合はどのように起こるのか、といったべん毛伸長の分子機構は不明である。また、11本の素繊維から成るらせん対称性を持つべん毛繊維と5回回転対称性を持つキャップがシンメトリーミスマッチを克服して安定に結合するしくみも謎である。そこで、サルモネラべん毛先端部の構造をX線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析を用いて原子レベルで解明し、べん毛繊維形成の分子構造基盤を解明することを目指した。

【方法】大腸菌BL21(DE3)で発現したサルモネラFliDを精製・結晶化し、結晶構造を3.2Å分解能で解析した。次に、FliCの発現を制御できるようにしたR型直線べん毛サルモネラ変異体を用いて短いべん毛を持つ菌体を作成し、密度勾配遠心法でべん毛を基体ごと精製した。この試料をクライオ電子顕微鏡で撮影して3次元再構成を行い、1,772個のべん毛先端の画像から8.5Å分解能の密度図を得た。FliDの結晶構造と既知のR型直線べん毛構造を参考に、この密度図を用いてサルモネラべん毛先端部の原子構造モデルを構築した。

【結果・考察】FliDは3個の球状ドメインと長く伸びたコイルドコイルを形成する2本のヘリックスから形成されていた(図1A)。FliDキャップ5量体は結晶構造では5回回転対称性を有していたが、べん毛先端に結合したキャップ5量体は、段差を持つ非対称な鳥カゴ状構造を形成していた(図1B)。2個の球状ドメインはべん毛先端で歪んだプレート状構造を形成し、その直下には運ばれてきたFliCがfoldingする場所と考えられる幅40Å深さ80Åの空間があった。キャップ5量体の1つのドメインとコイルドコイルを形成する2本のヘリックスは、

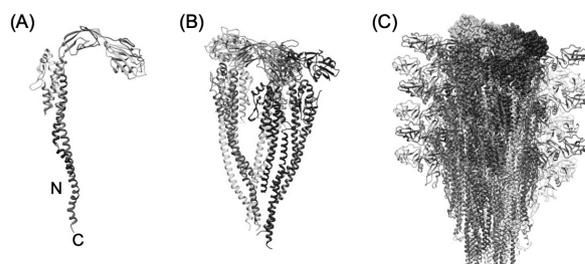


図1 べん毛先端に結合したFliDの構造モデル
(A) FliDサブユニットの構造. (B) FliD 5量体の構造.
(C) べん毛先端の構造.

べん毛繊維中央のパイプに深く突き刺さり、ヘリックスの集まる先端は閉じてゲートを形成していた。このゲートの存在により、foldingの場所に複数の分子が入ることを防いでいると考えられる。

べん毛先端で各FliDサブユニットは、繊維先端のFliCサブユニットに沿うようにらせん状に配置していた(図2)。このため、次のFliCが組込まれる繊維先端の一番低い場所の左にキャップにも段差が生じ、外に向かって大きな隙間ができていた。また、FliDとFliCは、段差の右側以外は密に結合していた。この構造に基づき、以下にべん毛成長モデルを提唱する(図2)。新たなFliCが隙間に組み込まれるとキャップの段差位置が移動する。段差の移動時には隙間の両側のFliDサブユニットとFliCの結合が変化する。一方で他のFliDサブユニットとFliCの結合は変化しない。従って、FliCの組込による構造変化は段差両側のFliDサブユニットに限られる。このため、キャップが安定に結合したままFliCを挿入することができ、段差の伝播により連続したFliCの挿入が起こると考えられる。

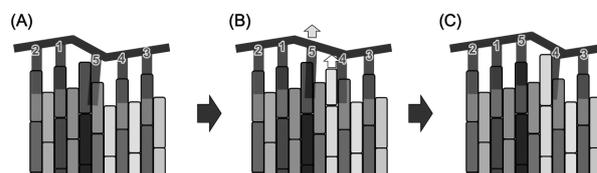


図2 べん毛繊維の成長メカニズム

FliDサブユニット5のみFliCサブユニットとの相互作用が異なる(A)。FliCサブユニットの挿入により段差部分のFliDサブユニットが持上がる(B)。段差が移動する(C)。FliCサブユニットの挿入前後でFliDサブユニット1,2,3とFliCサブユニットの相互作用は変化しない。

液胞による染色体・核小体の核内配置制御の解析

丑丸 敬史

【目的】 出芽酵母で栄養源飢餓により誘導されるヌクレオファジー（核を分解するオートファジー）では核小体タンパク質が選択的に分解されるが、核小体内にあるrDNA領域も含め染色体DNAは分解されない。マイクロヌクレオファジーにおいて、この分解は液胞と核の接触部（NVJ）が液胞内に陥入り取り込まれることにより起こる（図1）。その際、分解される核小体タンパク質はNVJに近寄り、分解されないrDNAは凝縮しつつ核小体タンパク質から分離してNVJより遠ざかる。本申請研究では、NVJがこの染色体・核小体の核内配置を制御する分子基盤を明らかにすることを目的とした。

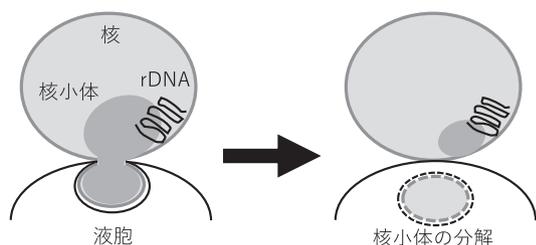


図1 飢餓時のNVJによる核小体のリモデリング

【方法】 rDNA結合性タンパク質、核小体タンパク質体に蛍光タンパク質を融合させた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でNVJを欠く欠損株 *nvj1Δ nvj2Δ nvj3 mdm1Δ*、NVJに局在するタンパク質遺伝子欠損株 (*nvj1Δ*, *mdm1Δ* 等)、Cdc14フォスファターゼ変異株 *cdc14-1*、トポイソメラーゼII変異株 *top2*、コンデンシン変異株 *yca4-2*、ヒストン脱アセチル化酵素欠損株 *rip3Δ*、CLIP欠損株 *heh1Δ*、cohibin欠損株 *lrs4Δ* を用いて、顕微鏡観察により核小体リモデリングを評価した。それらの因子に関して、その存在量、局在、飢餓後の生存への関与等々を評価した。

【結果・考察】 研究代表者は、NVJに対しての核小体タンパク質とrDNAの定方向性の運動性がrDNA凝縮（コンデンシンとヒストンH1様タンパク質Hmo1による）を必要とすること、rDNAの核内膜繫留（CLIP複合体、cohibinを介して）を必要とすることをすでに明らかにしてきた。本研究はそれを受け、以下の研究を行った。

出芽酵母では、核と液胞は常にNVJでコンタクトしている。液胞がNVJを介して核外から核小体リモデリングを制御するのかを証明するため、NVJを持たない

nvj1Δ nvj2Δ nvj3 mdm1Δ 株 (*NVJΔ*) の提供を受け用いた。予想通り、この欠損株ではマイクロヌクレオファジーが消失した。それに加え、核内イベントであるrDNA凝縮、rDNAと核小体タンパク質との分離も消失した。このことは、rDNA凝縮に伴う核小体リモデリングという核内イベントを液胞が核外からNVJを介して指令することを示す。

次にこれを受けて、NVJ局在性タンパク質を網羅的に調べ、核小体リモデリングの動力源となると予想されるrDNA凝縮に必要な因子の同定を試みた。その結果、既知因子Nvj1に加えて、Mdm1を同定した。*mdm1Δ*細胞では、rDNA凝縮、核小体タンパク質とrDNAのNVJに対する定方向性の運動が消失した。その結果、マイクロヌクレオファジーによる核小体タンパク質の分解が抑制され、飢餓後の生存が著しく低下した。以上の結果から、飢餓誘導性の核小体リモデリングのモデルを提唱した（図2）。

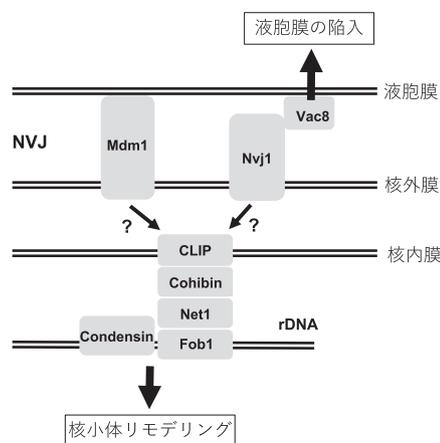


図2 飢餓時の核小体リモデリングに関与する因子

さらに、分裂期のrDNA凝縮に必要なCdc14フォスファターゼとトポイソメラーゼIIが飢餓誘導性の核小体リモデリングに必要であることを、蛍光タンパク質を融合した核小体タンパク質を観察して見出した。

上記の実験結果は全て対数増殖期細胞を飢餓処理して得られたものである。分裂期因子であるコンデンシンやCdc14フォスファターゼが間期の飢餓誘導性rDNA凝縮に関しても必要であるかを疑い、それを検証した。その結果、間期における飢餓誘導性rDNA凝縮はCdc14を必要とするが、コンデンシンは関与しないことを明らかにし、間期染色体凝縮の新たなシステムを見出した。

糖消費速度をモニタリングするフラックスセンサーの探索

柘植 陽太

【目的】 微生物を用いた有用物質の生産には速い糖消費速度が必要である。現在、糖消費速度の向上のために代謝遺伝子の高発現などが行われているが、糖消費速度とハウスキーピング遺伝子である中央代謝経路の遺伝子発現レベルの関係については未だ不明な点が多い。もし中央代謝経路の遺伝子の発現レベルが糖消費速度と連動して変化するのであれば、糖消費速度を感知するセンサーが存在する可能性がある。そこで本研究ではアミノ酸生産菌として工業利用されているコリネ型細菌をモデルとして糖消費速度を感知するフラックスセンサーを探索することを目的とした。

【方法】 コリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) の ATCC 13032 (WT 株) に加えて、グルコース消費速度が増加する株として H⁺-ATPase 活性が低下する *atpG* 一塩基置換株 (*atpG*^{t817c} 株) を使用した (Sawada *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 2012)。また、グルコース消費速度が低下する株として、グルコースの取り込みとリン酸化に関わるホストランスフェラーゼシステムの遺伝子 (*ptsG*) の欠損株を使用した。各株を 30℃, 180rpm で 24h 前培養後、グルコースを単一炭素源とする合成培地に初期 OD₆₀₀ = 0.5 となるように植え継ぎ、対数増殖期で転写解析、代謝解析用のサンプリングを行った。転写解析用の菌体は mRNA を抽出後、qRT-PCR 解析を行った。代謝解析用の菌体はメタノール・クロロホルム法により代謝物を抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) で中央代謝経路の代謝物を分析した。

【結果・考察】 3株の単位菌体量あたりのグルコース消費速度を算出した結果、*atpG*^{t817c} 株は野生株より 125% 増加し、*ptsG* 株は野生株より 79% 減少したため、目的の糖消費速度の変動を確認した。各株における転写解析の結果、中央代謝経路の 41 遺伝子のうち 15 遺伝子の発現レベルが糖消費速度と正の相関を示し、3 遺伝子の発現レベルが負の相関を示した。従って、本種では糖消費速度の変化に連動して中央代謝経路の遺伝子の発現レベルが変動することが明らかになった。これは細胞が糖消費速度を感知してその発現レベルを調整している可能性を示唆している。糖消費速度を感知するセンサーとしては代謝物である可能性がある。そこで次に LC-MS を用いて代謝解析を行い、中央代謝経路の代謝物の濃度を分析した。その結果、グルコース消費速度が増加すると、解糖系や TCA サイクルの代謝物濃度が全体的に高く

なった。一方、ペントースリン酸経路 (PPP) では、グルコース消費速度が増加すると代謝物レベルが全体的に低下した。このことから、グルコース消費速度が上がると PPP への代謝フローが弱まり、解糖系及び TCA 回路への代謝フローが強まる可能性が示唆された。一方、糖消費速度と細胞内濃度が正の相関を示す代謝物としてホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸、イソクエン酸、フマル酸、コハク酸の 5 つが見出された (図 1)。

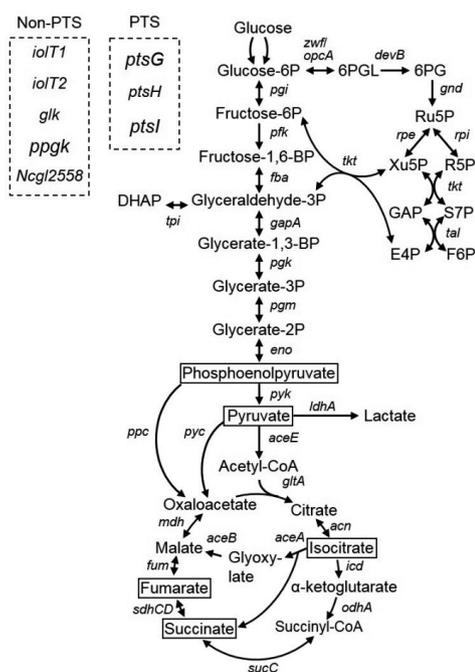


図 1 コリネ型細菌の中央代謝経路と糖消費速度と連動して細胞内濃度が変動した代謝物 (黒枠)

コリネ型細菌では中央代謝経路の遺伝子群の転写制御ネットワークが詳細に解明されている。また、代謝物は転写因子と直接結合して、転写因子が制御する遺伝子の発現を調節する可能性がある。従って、本研究でグルコース消費速度の変動に合わせて細胞内濃度が変化した 5 つの代謝物の中に、転写因子との結合を通して中央代謝経路の遺伝子群の発現を調節しているフラックスセンサーが存在する可能性が示唆された。今後は 5 つの代謝物と中央代謝経路の遺伝子発現を制御する転写因子群との結合を調べることでフラックスセンサーシステムの分子機構の解明に取り組む。

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の高温下での脂質代謝変化の解析

星田 尚 司

【目的】酵母 *Kluyveromyces marxianus* は 50℃ 近い高温でも増殖可能な耐熱性を持つ。しかし、このレベルの耐熱性を *K. marxianus* に与える分子レベルの機構は全く明らかになっていない。細胞膜は生物に必須の構造であり、その主成分であるリン脂質に対する生育温度に応じた適応機構がよく知られている。*K. marxianus* において細胞膜構成成分が耐熱性に関与しているかどうかを明らかにする目的で網羅的な脂質解析を行ったが、リン脂質を構成する脂肪酸の種類に培養温度の違いによる明確な差は認められなかった。一方で、高温で培養した細胞では、リン脂質量が減少し、中性脂質であるトリグリセライド (TAG) 蓄積量が増加していた。そこで本研究では、*K. marxianus* が高温で TAG 蓄積量を増加させる機構とその高温での増殖に対する効果を解析した。

【方法】*K. marxianus* の培養には酵母の一般的な培地である YPD を使用し、24 ウェルプレートに 1mL の培地を入れ、各温度で振とう培養した。次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析では、フラスコを用いて 50mL の培地で 30℃ 及び 45℃ で培養した細胞から RNA を抽出し、解析した。レポータープラスミドの構築及び、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子破壊では、必要な DNA は染色体 DNA またはプラスミド DNA をテンプレートとして PCR で増幅し、*K. marxianus* へこれらを導入した。形質転換体の選択にはウラシルまたはロイシンを欠損させた合成培地を用いた。TAG の定量では、一定量の細胞をガラスビーズで十分に破碎し、得られた破碎液に含まれる TAG の濃度をラボアッセイ™ トリグリセライド (富士フィルムワコー) を用いて定量した。細胞の増殖は 600nm の濁度で評価した。レポーターアッセイの蛍光強度は培養液を 96 ウェルプレートに入れ、プレートリーダーで測定した。

【結果・考察】*K. marxianus* のゲノムから、TAG 合成経路遺伝子が明らかになっている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子と相同性のある遺伝子を探索した結果、TAG 合成経路遺伝子が保存されており、代謝経路は基本的に同じであることが示唆された。これらの遺伝子の発現が高温での TAG 蓄積量の増加に関与しているかを知るために、次世代シーケンスによる RNA 解析を行った。TAG 合成に関わる 22 の遺伝子のうち 30℃ に比べ 45℃ で 2 分の 1 以下に発現低下した遺伝子は *SCT1* だけで、多くの遺伝子の発現が増加していた (図 1)。

Sct1 のアイソザイムをコードする *GPT2* の発現が 1.7 倍程度に増加していたことから、高温下において TAG 合成に関わる酵素の発現が転写レベルで増加することが明らかになった。一方で、蓄積した TAG を分解する酵素をコードする *TGL3*, *TGL4* の発現が増加しており、単純に合成経路の活性化の結果として TAG が蓄積するわけではないことが示唆された。合成経路の各遺伝子のプロモーターに相当する領域の配列を赤色蛍光タンパク質遺伝子上流クローニングしたレポータープラスミドを用いた解析でも、網羅的な解析と同様、高温で転写活性が低下するプロモーターは少なく、リン脂質からジアシルグリセロールに脂肪酸を転移する酵素 *Lro1* や脂肪酸合成に向かう酵素の *Slc1*, *Dga1*, *Gpt2* の各遺伝子のプロモーター活性が 40℃、あるいは 45℃ で増加していた。

発現が増加した遺伝子が高温での TAG 蓄積に関与しているかどうかを明らかにするために遺伝子破壊を行った。*GPT2*, *ALE1*, *DGA1*, *TGL4*, *LRO1* の 5 つの遺伝子破壊株を構築した。これらの株を培養し増殖と TAG 蓄積量を野生株と比較した。その結果、*DAG1* と *TGL4* の破壊株では 40℃ での細胞の増殖が野生株と比べて大きくなり、また、細胞 (濁度) 当たりの TAG 蓄積量が野生株に比べて低下した。この結果から、高温下での TAG の蓄積は、ストレス状況において、炭素源およびエネルギー源を一時的に脂質として確保するための機構ではないかと考えている。

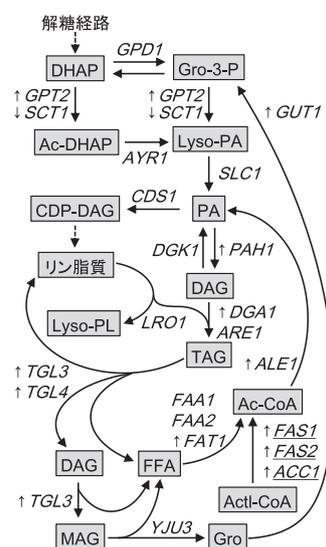


図 1 *K. marxianus* の脂質代謝経路と高温での発現変化
遺伝子名の前の矢印が 30℃ に対する 45℃ での発現変化を示す。2 倍以上の増加, ↑; 半分以下の低下, ↓; Ac, アシル; Actl, アセチル; DAG, ジアシルグリセロール; DHAP, ジヒドロキシアセトンリン酸; Gro, グリセロール; MAG, モノアシルグリセロール; P, リン酸; PA, ホスファチジン酸; PL, リン脂質; TAG, トリアシルグリセロール

海藻（褐藻）分解小動物の腸管と腸内複合微生物の 協同による褐藻の完全分解系の解明

河井重幸

【目的】ハマトビムシ (*Platorchestia joi*) (図1) は、砂浜生態系の一次生産物である漂着海藻バイオマスの主要分解小動物 (直径8mm程度) である。砂浜生態系の一次生産物である漂着海藻の分解系の解明は、砂浜生態系および海洋炭素循環を理解する上で、更には褐藻の新たな利用方法の開発において重要であるが、その詳細は不明である。著者は褐藻を餌とするハマトビムシ腸管部位から、褐藻主要炭素源アルギン酸 (難分解性高分子) を資化する細菌 (*Vibrio*, *Paracoccus* 各属細菌など) を単離している。

これらの事実から、ハマトビムシの腸管では、腸管側代謝系のみならず、腸内複合微生物群も協同して関わる「褐藻の完全分解系」が機能していると推察される。本研究の目的は、ハマトビムシ腸管における、この褐藻の完全分解系の解明である。



図1 ハマトビムシ

【方法】

ハマトビムシの腸管メタゲノム解析 褐藻または紙を食しているハマトビムシを同定および解剖し、腸管を採取した。採取した腸管 (計35サンプル) からDNAを抽出し、1匹ずつメタゲノム解析 (16S, ITS2, および18Sに対するアンプリコン解析でFASMAC社に依頼) を行い、腸管内微生物叢を明らかにした。ただし、ハマトビムシの飼育条件を、滅菌の有無、飼育日数 (1, 2週間)、餌 (褐藻, 紙)、漂着海藻群 (α , β) で分けて実験区BからGとして設定し、それぞれの飼育条件に依存した特徴的な腸管内微生物叢が形成されるかどうかを確認した。また漂着褐藻そのもののメタゲノム解析も行った (実験区A)。

抗生物質介入試験 滅菌環境の実験区H (褐藻で飼育, 抗生物質非添加), I (褐藻で飼育, 抗生物質添加), およびJ (紙で飼育, 抗生物質添加) を作製して観察後、これら実験区で飼育したハマトビムシの腸管メタゲノム解析 (16SおよびITS2) を行った。なお、すべてのメタゲノム解析データはQiime2 (ver. 2020.2) で解析した。また、実験区Iの腸管由来の微生物も単離した。さらに、

抗生物質がハマトビムシの寿命に与える影響を調べるために、褐藻を餌としてハマトビムシを抗生物質添加または非添加条件で飼育し、生存数を計測した。

褐藻または紙を食したハマトビムシに対するRNA-seq

褐藻または紙を餌とした実験区でハマトビムシを飼育し、個体からRNAを抽出した。RNA-seqはFASMAC社に依頼し、得られた生データをTrinityで*de novo*アセンブリし、KallistoとTransDecoderを使用して転写産物発現量の推定とCDS配列の抽出を行い、BLASTPで解析した。このRNA-seq解析を独立して2回実施した。

【結果・考察】

ハマトビムシの腸管メタゲノム解析および抗生物質介入試験

餌や環境等の飼育条件によって固有の腸管内微生物叢が検出されることを期待したが、ハマトビムシの腸管内微生物叢は飼育条件に依存せず個体ごとに大きく異なっていた。また漂着褐藻の微生物叢とも大きく異なっていた。一方、これらの実験区のハマトビムシの腸管には*Paracoccus*属や*Vibrio*属の細菌が検出された。特に*Vibrio*属の細菌は実験区AからG由来のすべてのサンプルで検出され、36サンプル中10サンプルで30%以上の微生物組成比を示した。

抗生物質介入試験の結果、抗生物質添加区のハマトビムシは抗生物質を添加しない対照区と同程度の速度で餌を食べ、抗生物質添加および非添加条件のハマトビムシ生存数は両者同様に生存数が減少した。すなわち、抗生物質介入の、褐藻摂食と寿命に対する明瞭な効果は観察されなかった。一方、腸管メタゲノム解析では、抗生物質添加区の腸管内微生物叢は単純化して餌に依存した微生物叢を示し、*Paracoccus*属や*Vibrio*属の細菌は検出されなかった。

褐藻または紙を食するハマトビムシに対するRNA-seq

褐藻または紙を餌とするハマトビムシで発現する遺伝子のリストを得た。両者でセルラーゼが検出された。褐藻を食するハマトビムシからアルギン酸の資化に関わる遺伝子は現在のところ検出されていない。抗生物質介入試験の結果も考え併せると、褐藻完全分解のためにセルロース成分は腸管セルラーゼにより、アルギン酸は腸内細菌により分解資化されていると推察された。

昆虫共生細菌による殺虫剤の腸内解毒機構の解明

菊池 義智

【目的】異なる2種が共生することで、ときに生物は全く新しい機能を獲得する。これまでの研究で我々は、農業害虫のカメムシ類が農薬分解菌を体内に共生させることで、昆虫自身までも農薬抵抗性化するという現象を見出してきた。気候変動や人口増加による食料難が叫ばれるなか、食料の安定供給のために農薬の重要性はますます高まっている。一方で、単一の農薬を連続して使用すると、農薬抵抗性を持つ害虫が出現することが大きな問題となっている。このような農薬抵抗性は昆虫自身の遺伝子で決まる性質であると常識のように考えられてきたが、近年、我々の研究によって、昆虫体内の共生細菌が農薬の解毒に重要な役割を果たしていることが分かってきた。我々の報告の後、世界中で同様の現象が報告されてきた。しかし、これまで共生細菌を介した農薬の解毒メカニズムは解明されていなかった。本研究では、共生細菌のゲノム解析、遺伝子発現解析、遺伝子ノックアウト解析により共生細菌の農薬分解遺伝子を特定し、昆虫体内における解毒プロセスを解明することに成功したので報告する。

【方法】本研究で対象とするのは大豆の害虫として知られるホソヘリカメムシ(*Riptortus pedestris*)である(図1)。このカメムシは消化管に「盲嚢」と呼ばれる袋状組織を多数発達させており、その内腔中に *Burkholderia* 属細菌を特異的に共生させている。この害虫は、孵化後しばらくたってから共生細菌を環境土壌中から獲得することが知られている。土壌中には様々な機能(遺伝子型)を持った共生細菌が息しているが、中には有機リン系農薬であるフェニトロチオン(MEP)を分解できる系統もあり、そのような農薬分解共生細菌をホソヘリカメムシが獲得すると、たちどころにMEP抵抗性になってしまう。

MEP分解共生細菌である *Burkholderia* sp. SFA1株を対象に全ゲノム解読を行い、同時に培養液にMEPを添加した際のトランスクリプトーム解析を行い、MEP分解経路および関与遺伝子群の特定を行った。特定されたMEP分解遺伝子群について遺伝子欠損株を作成し、培

養およびカメムシへの感染実験によって、宿主害虫への農薬抵抗性賦与に関わる責任遺伝子を特定した。また、それら分解遺伝子群についてカメムシ共生時のトランスクリプトーム解析を行い、体内における分解プロセスの解明を行った。加えて糞の化学分析を行い、MEP分解産物がどのような形で排泄されているか調査した。

【結果・考察】SFA1株のゲノムサイズは約9.5Mbであった。MEP分解に関わる遺伝子群については他の細菌において既報があり、それら情報とMEP培地培養時のトランスクリプトーム解析結果と照らし合わせて、SFA1では7つの遺伝子によってMEPが分解され資化されていることが明らかとなった。カメムシに共生した際のSFA1のトランスクリプトーム解析を行ったところ、興味深いことにMEP分解経路の第1番目の遺伝子(*mpd*)のみが発現していた。この *mpd* の欠損株を作成したところ、MEP分解能および宿主カメムシへの抵抗性賦与能力を完全に失っていた。一方、*mpd* 相補株ではこれらの能力が回復していたことから、この第1番目の遺伝子が農薬抵抗性賦与の責任遺伝子であることが証明された。*mpd*によるMEPの分解産物である3-メチル-4-ニトロフェノール(3M4N)は害虫に無毒である一方、面白いことに3M4Nは共生細菌に対して非常に高い殺菌活性を示すことが明らかになった。カメムシ体内での3M4Nの代謝過程をHPLCにより調査したところ、3M4Nはほとんど代謝されることなく速やかに糞とともに体外に排出されることが明らかとなった。つまり、宿主害虫にとって有害な農薬(MEP)を共生細菌が分解し、共生細菌にとって有害な農薬分解産物(3M4N)を宿主害虫が速やかに除去するという、相互解毒ともいべき共生システムによって、共生細菌を介した農薬抵抗性が成立していることが明らかとなった(図2)。

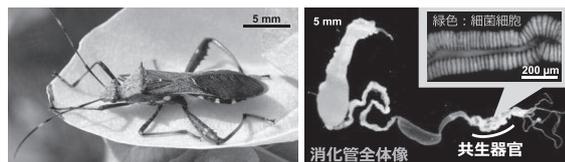


図1 ホソヘリカメムシとその共生器官。

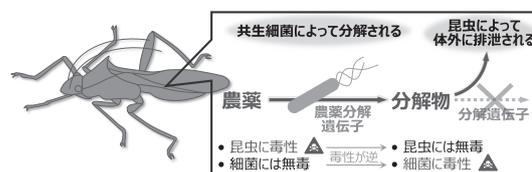


図2 今回発見された害虫と共生細菌の相互解毒機構。

本研究は共生細菌を介した農薬抵抗性について、体内の解毒プロセスを明らかにした世界初の成果であり、害虫の進化における共生細菌の重要性を示すものである。

低グルコースに対する分裂酵母の適応戦略

中 岡 秀 憲

【目的】 炭素源枯渇は細胞死に直結するストレスである。特に分裂酵母はグルコースに対する依存性が高く、増殖中の細胞をグルコース非含有培地に移すと24時間程度でほぼ死滅する。しかし低濃度(標準濃度の1/100程度)グルコース含有培地で馴化させた細胞は、その後の炭素源枯渇に対して耐性をもつことが報告されている。自然界における微生物は栄養の少ない厳しい環境に晒されることも多いと考えられるため、このような馴化応答が重要な生存戦略であると推察される。環境ストレスに関する研究は広く行われているものの、比較的短時間の強いストレス条件における細胞表現型が研究対象とされることが多く、慢性的な低容量ストレスに対する細胞生理状態についての知見は不足している。そこで本研究では、低濃度グルコース培地に対する馴化過程における分裂酵母細胞の生理状態変化を様々な角度から特徴付けることを目的とした。

【方法】 マイクロ流体デバイスによる長期ライブイメージング: 多数の独立した一細胞系列をトラッキングできるように独自開発したデバイスを用いた長期タイムラプスによって、低グルコース培地条件(0.02%グルコース含有 Edinburgh 最少培地, 30°C)における恒常発現蛍光蛋白質の輝度変化を観察した。また、馴化過程における細胞質 pH の変化を測定するために、pH センサーである pHluorin2 を発現する *Schizosaccharomyces pombe* 株を作成し、pH 測定イメージングを行った。

細胞質流動性の計測: 鳥ウイルス由来の μ NS 蛋白質は凝集しやすいことが知られており、蛍光蛋白質と融合させた μ NS を発現させた分裂酵母株の細胞質では凝集蛋白質塊の輝点が観察される。この輝点のブラウン運動様の動態をタイムラプスによって追尾し、その実行的な運動範囲を定量することによって細胞質の流動性を評価した。

蛋白質凝集傾向の観察: 古細菌のエンカプスリン足場蛋白質の一種である GEM に蛍光蛋白質を融合したものを発現する株を構築し、その凝集に対応する輝点の生成を低グルコース環境下でモニターすることによって蛋白質凝集の生じやすさを評価した。

定量位相イメージングによる細胞内部の密度測定: 定量位相イメージングの一種であるデジタルホログラフィック顕微鏡技術を利用して、細胞質の密度計測を行った。デジタルホログラフィーは光の干渉を利用することによって試料に由来する光の位相変化を定量的に検出する方法であり、位相変化が光路長に対応することから、試料厚みが既知であれば細胞の屈折率分布(≒細胞内物質密度)をイメージングによって推定できる。本研究では細胞が楕円体であるとのモデルに基づいて厚み推定を行い、屈折率分布を算出した。本手法による計測は東京大学大学院理学研究科の井手口拓郎研究室の協力の下で行った。

【結果・考察】 図1に示すように、低グルコース(0.02%)含有培地で培養した分裂酵母細胞の細胞質 pH の変動は4日程度かけてプラトー(6.0-6.5程度)に達することが分かった。また、その pH の値は急速なグルコース飢餓条件

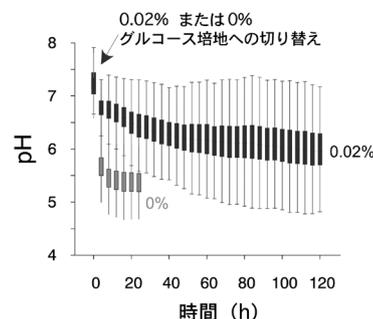


図1 低グルコース環境における細胞質 pH の変動

(0%グルコース)によって到達する pH (約 5.5) の値と比べて高いレベルであった。

pH の低下による帰結として細胞質における蛋白質の凝集の促進およびそれに伴う細胞質の固化が想定される。実際、急速なグルコース飢餓によって pH が 5.5 程度まで低下した細胞においては Sup35 プリオンの凝集や μ NS のブラウン運動が停止するなどの結果が得られた。しかし、 μ NS の運動解析の結果から、低グルコース濃度での馴化を経た細胞では、その後グルコースの厳密な飢餓条件に移した場合であっても細胞質流動性がある程度保たれることが明らかとなった。また、GEM-T-Sapphire の凝集体をモニターし

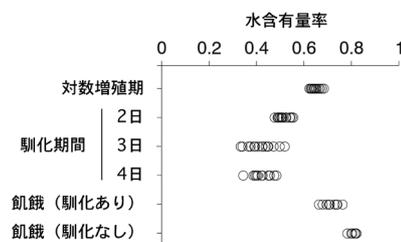


図2 細胞の水含有率推定値

た結果も、馴化細胞では蛋白質凝集が抑制されていることを示唆していた。

一方で、定量位相イメージングによる細胞質の物質密度推定の結果、低グルコース馴化過程において物質密度の上昇が示唆された(図2。水含有率の低下は水以外の物質密度が上昇していると解釈できることに注意)。興味深いことに、厳密なグルコース飢餓条件では物質密度が低下するものの、馴化を経験した細胞群ではその低下程度が抑えられている可能性がある(図2)。このことが細胞の生存を保証することに繋がっているのかどうかは今後の研究課題の一つである。

また、トレハロース合成やオートファジーなどの、炭素源飢餓応答に必要なと思われる活性が、本研究で観察された生理現象にどのように関与するのかについてもさらなる研究が必要である。

新規機能性 DNA 断片を介した酵母の適正なゲノム構造維持機構の解明

飯田 哲史

【目的】 ゲノムの不安定化によって引き起こされる遺伝子のコピー数変化は、様々な細胞異常を引き起こす。リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) は、複数コピーがリポトとして各生物に適正なコピー数で維持されている。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の研究から、rDNA の低コピー化が DNA 損傷感受性を誘導することがわかっている。したがって、適正な rDNA コピー数の維持は正常な細胞機能に重要である。我々は、*S. cerevisiae* の rRNA 転写の活性化因子 UAF が、適正なコピー数 (150 コピー) からのコピー数減少を感知し、rDNA の安定性を維持する Sir2 の発現量を抑制することで、適正なコピー数への回復を促す機構を明らかにしてきた (図 1)。本研究では、*SIR2* プロモーター領域における遺伝子発現制御の機構を明らかにするとともに、*SIR2* プロモーター領域で見つかった DNA 断片の機能の解明を目的とした。

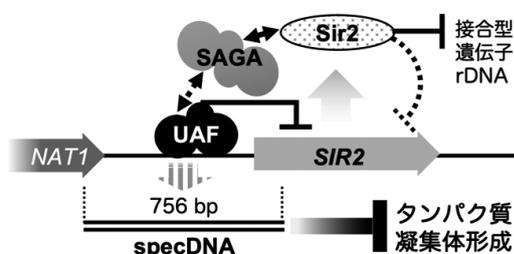


図 1 *SIR2* プロモーターにおける遺伝子発現制御

【方法】 *SIR2* プロモーター領域における遺伝子発現制御因子の同定は、*S. cerevisiae* の *FOB1* 遺伝子破壊株をもとに rDNA のコピー数が野生型の 150 コピーから 15 コピーまで減少した変異体 (低コピー株) に、*SIR2* プロモーターにハイグロマイシン B 耐性遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入し遺伝学的スクリーニングを行った。野生型株に比べて低コピー株は DNA ハイグロマイシン B 感受性となるが、*SIR2* の転写抑制因子の機能欠損変異体はハイグロマイシン B に耐性となる抑圧変異体として単離できる。得られた変異体は、相補グループに分類した後、次世代シーケンサー (NGS) で原因変異を同定した。

SIR2 プロモーター領域から発現する DNA は、NGS 解析により発現領域を同定し、サザン解析により確認した。DNA と相互作用するタンパク質は、複合体の精製を行ったのち質量分析により同定した。DNA の機能解

析は、遺伝子領域の欠失変異体を作成し、接合試験およびハンチントン病原タンパク質 HttQ103QP-GFP の凝集体形成の観察により行った。

【結果・考察】 *SIR2* の発現抑制が解除される変異体を網羅的にスクリーニングした結果、*SIR2* の発現抑制が部分的に解除される複数の相補グループに分かれる変異体を単離した。NGS を用いた原因変異の同定により、UAF 以外の複数の遺伝子が脱ユビキチン化サブ複合体を構成するサブユニットをコードするものであり、転写活性化に関わる SAGA 複合体が *SIR2* の発現抑制に関与することが示された。これまでに、UAF 変異体で完全に *SIR2* の発現抑制が解除されること、*SIR2* の発現抑制には Sir2 タンパク質も部分的に関与していること見出している。さらに、SAGA が Sir2 と相互作用する報告もあることから、UAF の下流で、Sir2 と SAGA が協調して *SIR2* の発現抑制を行っている可能性が示唆された (図 1)。今後は、転写活性化因子である SAGA がどのように *SIR2* の転写を抑制するのかを明らかにするのが課題である。

SIR2 プロモーターの研究過程で、NGS を用いた解析から、*SIR2* の 5' 領域と上流の遺伝子 *NAT1* に掛けての 756 塩基に対応する二本鎖 DNA が染色体外の DNA として発現していることを見出した。我々は、二本鎖 DNA を specDNA (short priared extra-chromosomal DNA) と名付け、相互作用するタンパク質の精製と同定を試みた。specDNA を含む複合体を精製し相互作用するタンパク質の同定を行ったところ、タンパク質脱リン酸化酵素 Glc7 が specDNA と複合体形成していることが明らかとなった。specDNA と *SIR2* に関連する遺伝子領域の変異体を用いてその表現型を解析した結果、Sir2 タンパク質を発現し接合能を有する specDNA 部分欠失変異体で、異常タンパク質 HttQ103QP-GFP の細胞質凝集体形成が促進すること、*SIR2* 欠失変異体と同様に接合不能となる *SIR2* の部分欠失変異体で、specDNA 領域を維持している変異体では、HttQ103QP-GFP の細胞質凝集体形成の促進が観察されないことから、specDNA が Sir2 の機能とは独立した形で、凝集体形成の抑制に関与することが明らかとなった (図 1)。今後は、specDNA の発現が *SIR2* の発現制御や rDNA コピー数制御、異常タンパク質凝集体形成とどのように関わっているのかを明らかにするのが課題である。

ゲノム DNA は、細菌細胞内ではどのように折りたたまれているのか： HU タンパク質による細菌ゲノム DNA 折り畳み機構

大 島 拓

【目的】生物のゲノム DNA の長さは、細胞に比べ長大で、折りたたまない限り細胞内に格納することは難しい。しかし、無秩序に折りたたむと、遺伝子発現や複製の制御に不都合が生じるかもしれない。実際に真核生物では、ゲノム DNA はヒストンと相互作用して規則的に折りたたまれ、さらにゲノム上の機能領域の違いによって異なる形をとる。ここからも、ゲノム DNA には「折りたたみ方」があることが示唆される。しかし、真核生物と異なり、細菌と古細菌の一部の種にはヒストンが存在しない。その代わりに、核様体タンパク質 (Nucleoid Associated Protein=NAPs) と呼ばれるタンパク質群が存在する。

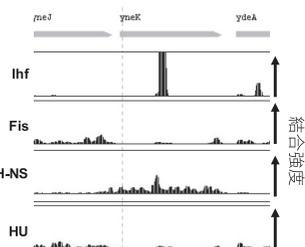


図1 NAPsの大腸菌ゲノム上の分布

これまでも、NAPsがヒストンに代わり原核生物のゲノムDNAを折りたたむ、と提案され続けてきた。しかし、その「折りたたみ方」は明らかになっていない。本研究ではNAPsの解析が最も進んだ大腸菌をモデルとし、高解像度ChIP-seqを用い、細菌のゲノムDNAの「折りたたみ方」の解明を目指した。

【方法】大腸菌の主要NAPs (HU, IHF, Fis, H-NS) を、ヒスチンタグを付加した形で発現するようにゲノム改変した大腸菌株を作成し、LB培地で対数増殖期まで培養した。ゲノムDNAをDNaseIで部分消化した後、NAPsとのタンパク質-DNA複合体を精製し、その複合体からDNA断片を回収して、次世代シーケンシングを行い、精密な主要NAPsのゲノム結合地図を作製した (GeF-seq法: 図1)。DNaseIによる断片化で、結合位置の検出精度の向上以外の影響が出ないことは、通常のChIP-seqとの比較で検証した。同時に、HUとIHFを同時に欠損した株を作成し (*hupAhupBihfA* 欠損株) を作成し、その表現型を解析した。変異株が温度感受性を示したため、その抑圧変異を分離し、ゲノムシーケンスにより変異箇所を決定した。

【結果・考察】大腸菌には、HUとIHFという2種類の

HU型NAPsが存在する。一方、枯草菌などの細菌種には、HUが一種類しか存在せず、生育に必須である。興味深いことに、大腸菌のHUとIHFの2重欠損株は、温度感受性を示した。その抑圧変異株を分離したところ、トポイソメラーゼとRNAポリメラーゼに変異が生じていた。このことは、HUとIHFが、ゲノムDNA全体の超らせん構造の維持と転写に強くかかわることを示している。さらに、GeF-seqにより、NAPsの詳細な結合地図を決定したところ、HUはゲノムDNA全体に弱く均一に結合しており、Fisの結合パターンもHUとよく似ていた。それとは対照的に、H-NSはゲノムの一部に強く結合し、さらにIHFは、特定の部位に鋭く大きなピークを示した。このことは、H-NSとIHFがゲノムの領域あるいは配列特異的に結合することを示している。さらに興味深いことに、H-NSの結合領域では、HUとFisの結合が非常に弱いことがわかった。IHFの結合部位のDNA配列を抽出し、認識配列を決定したところ、ほぼすべての結合部位にこれまで報告されてIHFのコンセンサス配列が見つかり、IHFの結合は、HUとは全く異なり塩基配列特異的であることが判明した。同時にIHFの結合が転写制御領域に偏って存在するかを解析したところ、IHFの結合部位の80%以上は遺伝子コード領域に存在していた。

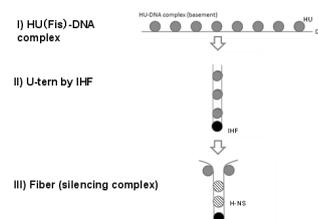


図2 NAPsの大腸菌ゲノム上の分布

これらの観察結果と、IHFの結合によりDNAが強力に屈曲することを考慮し、IHFが転写制御因子としてではなく、核様体の構造タンパク質として大腸菌ゲノムの「折りたたみ方」を決定するモデルを考えた (図2)。

1. HU (Fis) がゲノム DNA に結合し 基盤構造を作る。
2. IHF が特異的な部位に結合しゲノム DNA を湾曲させる。
3. ゲノムの一部では、IHF の結合により湾曲した領域に H-NS が結合し架橋構造を作り、HU (Fis) の結合を阻害して転写抑制領域を形成する。今後は、精製した HU, IHF, Fis, H-NS を用いた試験管内再構成を進め、本モデルの妥当性を試験管内で示していく予定である。

グラム陽性菌に見いだされた新規電子受容体と超低栄養生育との関連性

吉田 信行

【目的】 私たちは、炭素源を含まず、独立栄養性細菌（オートトローフ）を培養する際に必要な光、金属、水素などの還元力も加えない培地（BM培地）を用いて、自然界からの微生物の単離を試みている。寒天やシリカゲル、あるいはスポンジを支持体として用いれば、そのような条件でも驚くほど簡単に単離することができ、そのような細菌を超低栄養性細菌（スーパーオリゴトローフ）と呼んでいる。*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は最初に見つけた超低栄養性細菌であり、CO₂を要求することが分かっている。さらに興味深いのは、炭素源のみならず、窒素源を含まない無機塩固体培地上で良好な生育を示す。本菌のCO₂固定系についてはその意義も含めて不明であるが、プロテオーム、トランスクリプトーム解析から炭素・窒素代謝の大まかな流れは明らかになりつつある。*aldA*と*mnoA*は本菌を低栄養条件下で生育させた際、最も発現する遺伝子であり、それぞれNAD依存性のアルデヒド脱水素酵素（NAD-ALDH）と*N,N'*-ジメチル-4-ニトロソアニリン依存性メタノール脱水素酵素（NDMA-MDH）をコードする。このうち*aldA*の方はその欠損株が低栄養性を失うことが早くから分かっており、詳細に検討を進めてきたが、*mnoA*の方は検討が遅れていた。本研究では、*mnoA*およびその電子受容体の生成に関わる遺伝子と、N9T-4株の超低栄養生育との関係を調べた。

【方法】 NDMA-MDHは、グラム陽性のメタノール酸化性菌（メチロトローフ）に存在し、メタノール酸化の初発酵素と考えられている。最近、グラム陽性メチロトローフである*Mycobacterium smegmatis*のMDHにおいて、マイコファクトシン（MFT）という化合物が電子受容体であることを示唆する報告があった。MFTはペプチド前駆体からPQQ類似の経路で生合成されることから、グラム陰性菌におけるPQQと同様の生理活性を持つものと予想されているが、酵素の電子受容体となる直接的な証拠を示した例はない。興味深いことに、N9T-4株ゲノム上において、*aldA*と*mnoA*の間にMFT生合成系の遺伝子が全て存在していた（図1）。この低栄養性遺伝子クラスターに存在する遺伝子を*sacB*を用いた相同組換えにより欠損させた株を作成し、その低栄養生育を評価した。また、*mnoA*についてはHisタグをつけてN9T-4株内で発現させ、その精製タンパク質の機能を解析した。

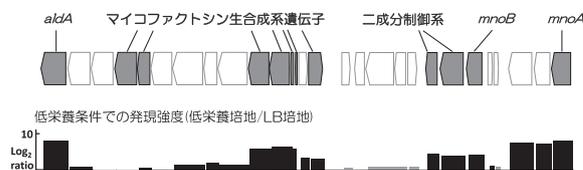


図1 N9T-4株ゲノム上で*aldA*-*mnoA*間に存在する低栄養性遺伝子クラスター領域

【結果・考察】 今回、初めて*mnoA*欠損株（ $\Delta mnoA$ 株）の取得に成功し、その欠損株の低栄養生育能が著しく低下したことから、*aldA*同様本菌の生育に重要な役割を果たすことが明らかとなった（図2）。さらに、MFTの前駆体ペプチドをコードする*mftA*、MFTに糖鎖を付加する糖転移酵素をコードする*mftF*の欠損株は低栄養生育能をほとんど失ったが、これもMFTのメチル化に関与すると予想されている*mftM*の欠損株は親株と同様の生育を示した。

*mnoA*の遺伝子産物（NDMA-MDH）の機能解析を行うため、まず大腸菌を用いて発現を試みたが、活性なタンパク質を得ることができなかった。そこで、N9T-4株内で発現させたMnoAの酵素活性を測定したところ、NDMA依存的にエタノールを酸化する活性が認められたが、メタノールに対する活性は検出できなかった。*mnoA*欠損株および*mftA*欠損株はエタノールを炭素源とする液体培地で生育を示さなくなることから、MnoAの機能にMFTが関与する、つまり電子受容体である可能性が示唆された。現在、MFTのN9T-4株からの単離、あるいは有機合成を試みており、今後MFTが実際にMnoAの電子受容体となるか検討する予定である。

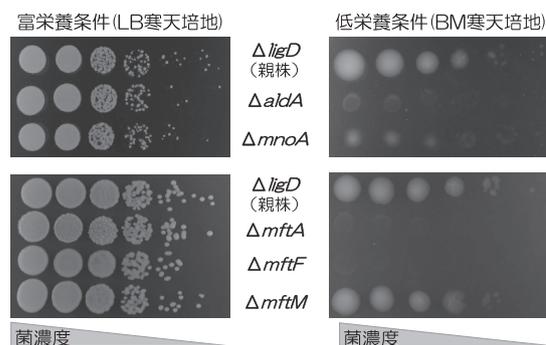


図2 低栄養性に関与する遺伝子欠損株の生育

一細胞力学操作を用いた病原性細菌の細胞侵入における定量的解析： 細菌感染を支配する力学的メカニズムの解明

久保田 寛 顕

【目的】腸内細菌科細菌にはサルモネラ属菌のように、腸上皮細胞に接着するとともに組織内に侵入し、感染を確立することで強い病原性を生む菌種が存在する。このような菌は上皮細胞に侵入する際に細胞質内に注射器のような形状をしたⅢ型分泌装置を介し、エフェクターと呼ばれるタンパク質群を注入する。その後、アクチン細胞骨格の再編成による細胞表面の局所的な変化が菌を引き込むような挙動を示し、侵入の効率が向上するとされている。これまで細胞骨格を介した細菌侵入については主に分子生物学的、あるいは細胞生物学的手法を用いて深く研究されており、多くのエフェクターとそれらが相互作用する細胞内のタンパク質群が同定されてきた。本研究では、過去に調べられてこなかった力学的な情報に焦点を当て、生物物理学的手法である光ピンセット法を用いた一細胞操作による顕微力学解析を駆使し、細胞侵入時に発生する力の計測を試みた。具体的には、*Salmonella typhimurium* の細胞侵入時に発生する波打ち現象（Membrane Ruffling）を研究対象とし、細菌侵入のメカニズムを探る第一歩とした。この波打ち現象はアクチン骨格の再編成による細胞表面の局所的な形状変化の一種であるが、例えば消化管の動きや消化管内の流れによって想定されるような力学的負荷に対する安定性など、動的な性質にはまだまだ未解明な点が残されている。

【方法】過去に細胞侵入性が報告されている *S. typhimurium* SL1344 株を研究材料とした。サルモネラ共通構造抗原（CSA-1）特異的抗体をアミンカップリングにより固定した直径1ミクロンのポリスチレンビーズを光ピンセットで操作し、同じく観察セル内に分散させた SL1344 株一個体に結合させることにより間接的な菌体の捕捉、菌が発生する力の定量を可能とした。顕微鏡下でビーズと菌を結合させる際は素早い鞭毛運動が障害となるため、相誘導血清（i）により運動性を抑えた。ビーズを介して菌を捕捉した後は、観察セルの底面に培養した Madin-Darby Canine Kidney（MDCK）細胞上に移動し、接着及び波打ち構造の形成を観察した。観察には100倍の対物レンズを用い、輝度重心リアルタイム追跡機能を備えた自作の画像（動画）取り込みプログラムにより位相差像を取得した。

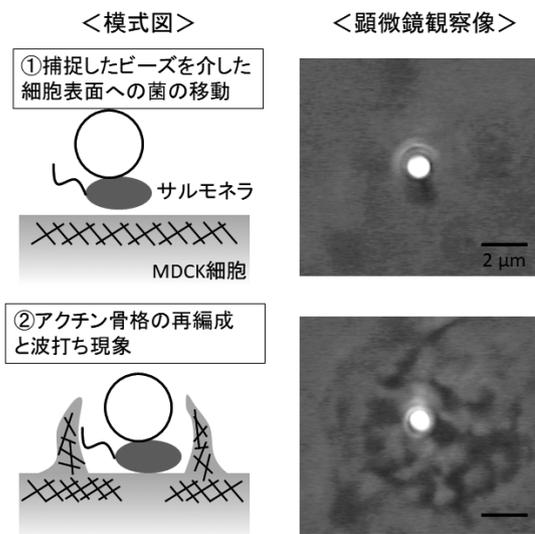


図1 光ピンセットを用いた実験系と波打ち現象

【結果・考察】図1に示すように、ビーズを介して捕捉した菌により波打ち現象を誘発することに成功した。波打ち現象は全ての個体からは誘発されることはなく、多くの個体は数分間細胞表面に配置しても接着すらしなかった。その一方、一部の個体は細胞表面に移動すると同時に接着し、速やかに波打ち現象を誘発した。また、本実験を行うにあたり、釣菌した SL1344 株のコロニーを Luria-Bertani (LB) 液体培地により培養したが、接着・波打ち現象の誘発には培養時の NaCl 濃度が大きく影響した。具体的には、LB 培地中の NaCl 濃度を 5g/L (Lennox 組成) とした場合は 100 個体ほど試行してもこのような現象を観察できなかったのに対し、15g/L にすると 10% から 20% 程度の割合で観察することが可能であった。培養時の NaCl 濃度はⅢ型分泌装置を構成する遺伝子群を含むサルモネラ病原性アイランド (SPI)-1 の発現を左右することが知られており、本実験でも SPI-1 が ON となる個体の割合に大きく影響したと考えられた。

今後は波打ち現象で見られる繊維上の影（図1）がアクチン骨格であるか否かについて蛍光標識により判別するとともに、力学的負荷を加えることで波打ち現象の力学的安定性を調べていく予定である。

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* における CoA 生合成経路の制御機構の解明と CoA 製造への応用

本田 孝 祐

【背景と目的】 Coenzyme A (CoA) はあらゆる生物で普遍的に用いられる補酵素であり、診断用酵素の補助剤や化粧品添加剤などとして商業的にも利用されている。真核生物や細菌において CoA は、パントテン酸を前駆体とする5段階の酵素反応により生合成される (図1)。その初発反応を触媒するパントテン酸キナーゼ (PanK) は一次構造に基づき、type I~III の3つのファミリーに分類される。このうち type III PanK は、2005 年に *Helicobacter pylori* より見出された比較的研究歴の浅い酵素である。Type I, II PanK が CoA によるフィードバック阻害を受け、細胞内 CoA 濃度の恒常性維持に寄与することが知られる一方で、type III PanK は CoA に対する感受性を示さない。本研究では、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* が type III PanK を有することに着目し、同菌由来の耐熱性 CoA 生合成酵素群からなるカスケード反応を *in vitro* で構築し、これを用いた CoA 生産試験に取り組んだ。また、*T. thermophilus* における CoA 生合成の調節機構解明の足掛かりとすべく、当該試験の過程で得られた酵素群の CoA に対する感受性を評価した。

【方法】 *T. thermophilus* 由来の PanK, pantetheine-phosphate adenylyltransferase (PPAT), dephospho-CoA kinase (DPCK) 遺伝子を大腸菌内に導入し、得られた組換え菌体の無細胞抽出液を 70℃、30 分間の熱処理に供することで粗精製酵素標品を得た。得られた3つの酵素

を適当な比率で混合し、2.0mM パンテテイン、6.0mM ATP を含む溶液中で 70℃ にて反応させた。HPLC にて経時的に反応液を分析し、CoA の生産を確認した。

【結果・考察】 *T. thermophilus* は本来、PanK を初発反応とした5ステップの酵素反応により CoA を生合成する。一方、多くの PanK は本来の基質であるパントテン酸のほか、これがシステアミンアミド化されたパンテテインに対しても活性を有し、PPAT の基質であるホスホパンテテインを生産する。*T. thermophilus* 由来 PanK でも同様の活性が認められたことから、本研究ではパンテテインを出発原料とした3ステップでの CoA 生産を実施した。この結果、2.0mM パンテテインより、モル収率 47% で CoA を得ることができた。ここで十分な収率が得られなかった原因として、PanK 以外の2つの酵素 (PPAT および DPCK) が CoA に感受性を示す可能性が考えられたことから、その検証に取り組んだ。この結果、1.0mM CoA の存在下で PPAT の活性が CoA 非存在下の 20% 弱にまで低減することを見出した (図2)。以上の結果より、*T. thermophilus* では、PPAT に対するフィードバック阻害により CoA の生合成が制御されていること、また今後、CoA による阻害を被らない耐熱性 PPAT を利用することで、より高濃度、高収率での CoA 生産が可能なカスケード反応が構築できる可能性が示された。

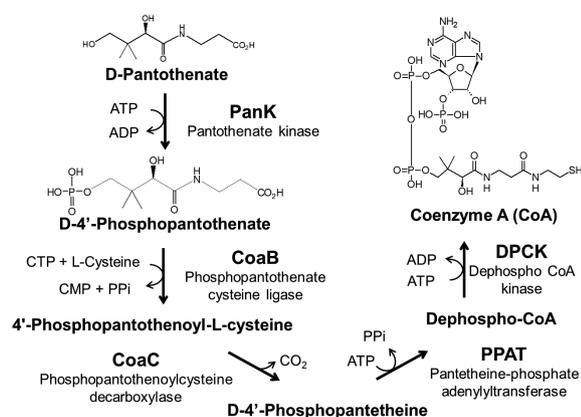


図1 一般的な CoA 生産試験

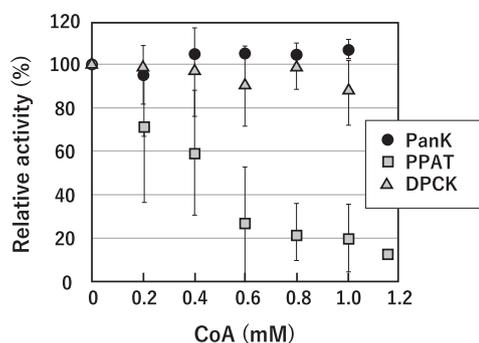


図2 CoA が *T. thermophilus* 由来 CoA 生合成酵素の活性に及ぼす影響

植物免疫を活性化する微生物の新規評価法の確立と探索への応用

古屋 俊 樹

【目的】近年、植物病原菌や病害虫に対して防除効果を示す微生物を農薬として利用する微生物農薬が注目されている。とくに、植物の免疫システムを活性化する微生物は、植物と相互作用することによりその病害抵抗性を高められるため、次世代の微生物農薬として期待されている。しかし、植物免疫活性化微生物を新たに自然界から発見することは難しい。従来の当該微生物のスクリーニング手法は、温室等で育成した植物体を用いた煩雑な菌の接種試験に依存しており、多くの時間と労力を要する。そこで本研究では、植物の免疫システムを活性化する微生物の簡便な評価手法を考案した。さらに、開発した手法を利用して、実際にコマツナの内部から当該微生物を探索した。

【方法】タバコの培養細胞BY-2は、病原性卵菌 *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリターであるクリプトゲインを受容すると免疫応答を示すが、活性酸素種 (ROS) の生成量と防御応答の強さに正の相関があることが知られている。そこで、微生物をBY-2細胞と試験管内で接触させた後、クリプトゲインを添加してROS生成を計測することにより、微生物の植物免疫活性化能を評価できるのではという着想に至った (図1)。もし微生物が植物免疫活性化能を有していれば、微生物を接触させていないときと比較して、クリプトゲイン添

加時のROS生成が高まるだろうという原理である。

具体的には、BY-2細胞の懸濁液に微生物を接種後、4時間振とうした。その後、この時点までにBY-2細胞や微生物により生成された物質を除去するために、遠心分離して上清を除去した。さらに、BY-2細胞を緩衝液に再懸濁後、クリプトゲインを添加し、ROS生成を化学発光試薬と発光測定装置で計測した。

【結果・考察】まず、有機栽培で育てられたコマツナから内生菌の分離を試みた。有機栽培では化学農薬を使用せずに、長年の経験を通して植物が病気にかかりにくい栽培手法を確立している。有機栽培で育てられたコマツナの内部には、植物免疫を活性化する微生物が住みついているのではないかと予想した。そこで、東京都立川市の鈴木農園の協力を得て、有機栽培で育てられたコマツナをサンプルとした。表面を次亜塩素酸ナトリウムとエタノールにより殺菌後、内部を固体培地に接触させることにより内生菌の分離を試みた結果、コマツナから約30株の細菌を取得できた。

分離した約30株のコマツナ内生菌を、方法に示した評価手法に供した。その結果、多くの細菌はBY-2細胞に影響を及ぼさないのに対して、一部の細菌はBY-2細胞のクリプトゲイン誘導性のROS生成を亢進することがわかった。ROS生成の亢進を指標とする本手法を利用すると、微生物が植物免疫を活性化するポテンシャルを有するかどうかを、わずか数時間で判定することができる。

この一次評価で陽性を示した細菌 *Delftia* sp. BR1R-2株と *Arthrobacter* sp. BR2S-6株をモデル植物であるシロイヌナズナの幼苗の根に接触させたところ、シロイヌナズナの生育に影響を与えずに内生した。さらに、内生させたシロイヌナズナにトマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌を感染させたところ、BR1R-2株とBR2S-6株はどちらもシロイヌナズナに両病原菌に対する抵抗性を付与することができた。シロイヌナズナに感染したトマト斑葉細菌病菌の数を計測したところ、内生させていない対照と比較してBR1R-2株を内生させた場合には0.9%、BR2S-6株を内生させた場合には7.4%まで減少していた。また、BR1R-2株に関しては遺伝子レベルでの解析も実施し、免疫応答に関わる防御関連遺伝子 (*PR-1*, *PR-5*, *PDF1.2*) の発現が高まっていることを確認できた。発見した細菌はコマツナにも耐病性を付与できた。

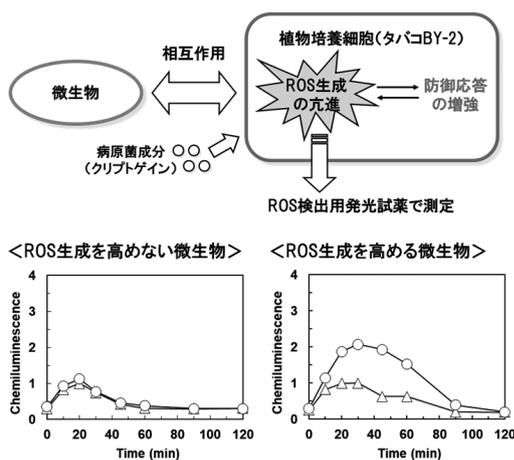


図1 微生物の植物免疫活性化能を評価する新しい手法。ROSは活性酸素種を表す。右のグラフでは、微生物を添加していないサンプル(△)と比較して、添加したサンプル(○)では、微生物との相互作用により植物培養細胞のROS生成が高まっている。

バイオ医薬品の次世代製造宿主を指向した 光発現誘導システム導入ブレビバチルス菌の創製

浅野 竜太郎

【目的】大腸菌に比べ、グラム陽性菌である *Brevibacillus* (ブレビバチルス菌) は、タンパク質分泌能の高さに加えて、菌体外プロテアーゼ活性が低いことなどから次世代微生物宿主として期待されている。大腸菌発現に於いて問題となるエンドトキシンの除去工程も必要ないため、治療薬を指向した分子の製造コストの低減も見込まれる。しかしながら、ブレビバチルス菌を用いた実用的な発現誘導システムは未確立であるため、宿主に成長阻害をもたらすような目的タンパク質の場合、形質転換体すら得られない。

そこで本研究では、ブレビバチルス菌に対して、化合物の添加を必要としない非侵襲的な発現誘導法である光発現誘導システムの導入を目指した。具体的には、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する、緑色光で転写促進し赤色光で抑制する CcaS/CcaR 二成分制御システムのブレビバチルス菌への導入を検討した (図1)。

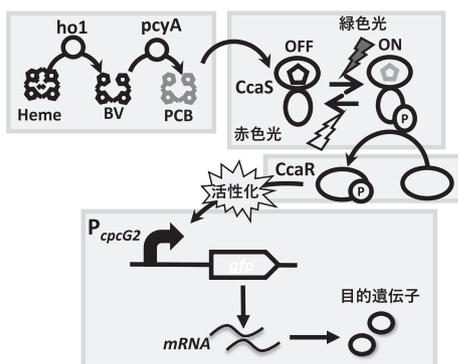


図1 CcaS/CcaR二成分制御システム

【方法】図1に示した光発現誘導システムの導入に向け、ブレビバチルス菌で機能することが既知の *Bacillus subtilis* 由来プロモーター P_{serA} 下流に緑色光センサタンパク質をコードする *ccaS* 遺伝子と転写因子をコードする *ccaR* 遺伝子、および恒常性プロモーター P_5 下流に CcaS の補因子であるフィコシアノビリリン (PCB) の生合成に関与する *ho1* 遺伝子と *pcyA* 遺伝子、さらに CcaS/CcaR により制御されるプロモーター P_{cpcG2} 下流に GFP (緑色蛍光タンパク質) をコードする *gfp* 遺伝子、をそれぞれコードするベクター pNCM02-PCB-GSS を構

築した (図2上)。得られたベクターを用いてブレビバチルス菌を形質転換した後、 P_{cpcG2} が活性化する緑色光を含む白色光照射下、および不活性化する赤色光照射下の2条件に加え、PCB産生の補助となる $FeCl_3$ を添加しない条件 (Fe(-))、および添加した条件 (Fe(+)) で培養を行った。遺伝子発現制御能は GFP 由来の蛍光強度の経時変化を指標として評価した。さらに導入した *ccaS*, *ccaR*, *ho1*, *pcyA* 遺伝子の転写解析を行うことで、制御系の構成因子の発現評価を行った。

【結果・考察】ブレビバチルス菌の蛍光強度を測定した結果、 $FeCl_3$ 添加により GFP 由来の蛍光強度の明確な増加が観察された (図2下)。これは、PCBの基質である Heme が増加したためであると考えられる。一方で、照射光の違いに依存した蛍光強度の差は観察されなかった。転写解析の結果、期待通り各構成遺伝子の転写が確認され、また条件間の差も確認されなかった。このため蛍光強度の差が確認されない原因として菌体に十分に光が行き届いていない、あるいは各遺伝子の転写レベルが低いことが考えられる。これらの結果から、ブレビバチルス菌において、シアノバクテリア由来 CcaS/CcaR 二成分制御システムを用いた発現は可能であることが示されたものの、発現の制御には至らなかった。今後は、光強度や各遺伝子の転写レベルの検討をプロモーターの改変などと併せて行うことで光に応答した遺伝子発現制御が可能となることが期待される。

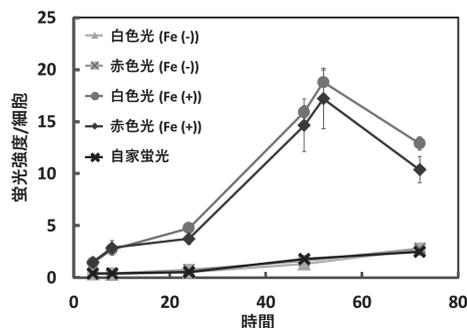
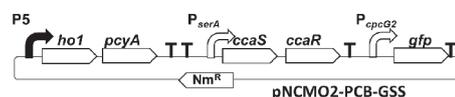


図2 構築した発現ベクター (上) と形質転換したブレビバチルス菌の蛍光強度測定結果 (下)

長期間持続可能なインジゴ還元発酵液の新規調整方法の開発

湯 本 勳

【目的】 インジゴ還元発酵の原料はスクモと呼ばれる蓼藍をコンポスト化したもので、この製造過程で植物体に含まれていたインジカンが水不溶性のインジゴに変換される(図1)。さらに、このインジゴは灰汁の中での液体発酵過程でスクモ由来の微生物による還元力によって水溶性のロイコインジゴになり、染色可能になる。藍染めは発酵液に存在する色素であるインジゴを還元する微生物叢の維持によって運用されている。この発酵液の中の微生物は仕込みの方法やスクモに存在する微生物によって変化し、これらの要因が仕込みから還元開始までの時間を左右する。そこで本研究では仕込みからインジゴの還元が起こるまでの期間を短縮した長期間持続可能な発酵液の調整方法を検討した。

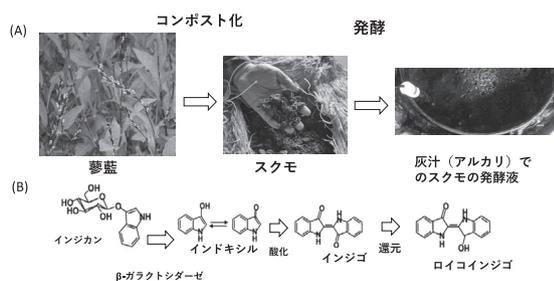


図1 発酵法による藍染の工程
(A) 蓼藍収穫後の工程。(B) 蓼藍の中のインジカンが可溶性のロイコインジゴへの変換過程。

【方法】 インジゴ還元発酵液の長期安定化にはインジゴが還元された時に安定な微生物叢が形成されていることがその長期安定に重要である。本研究の目的はインジゴの発酵液のインジゴの還元を確実にかつ仕込みからのインジゴの還元までの日数を短縮することであることから、初期(1-72日)および中期(39-94日)解析用に通常よりも還元が起こりにくいD-スクモを使用した。後期(115-226日)解析用には還元が起こりやすいT-スクモを使用した。発酵促進させる目的で、インド藍粉(LP)を0.1%添加した。発酵液はサンプリング時にpH、ORP(酸化還元電位)および染色し、インジゴ還元度合いを見積った。細菌叢の解析には発酵液からDNAを回収後、16S rDNA V3-V4領域をPCR増幅した。PCR産物を精製後、Illumina Miseqを用いたシーケンス解析を行いその結果をBLASTNにより細菌種同定をおこなった。

【結果・考察】 初期(1-72日)D-スクモおよびT-スク

モ(後期[115-226])発酵に対してLPを添加した結果、染色の開始に18-53日の差が見られた。一方、中期(39-94日)解析用のバッチでは、初期の染色の開始にLP添加とコントロールに明確な差は見られなかった。初期(1-72日)D-スクモのコントロールバッチでは5日目に*Bacillaceae*がLP添加バッチと比較してかなり菌叢中の比率が低下しており、*Proteivivaceae*が優先していた。10日目以降に*Bacillaceae*が約20%を占め、58日目に*Alkalihalobacillus hemicellulosilyticus*類似(98.1-99.7%相同性)細菌が優先(38.1%)し明瞭な染色が見られた。一方、LP添加バッチにおいては5日目には*Bacillaceae*が30%以上を占め25日目に染色が低下するが、その後*A. hemicellulosilyticus*および*Polygonibacillus indicireducens*類似(97.9%)細菌が優先し、再び明瞭な染色が見られた。以上の結果から、LP添加とコントロールに大きな差が見られたバッチにおいては発酵初日のpHが11.5以上であったことから、LP添加により、含まれるフラボノイドやポリフェノール等のファイトケミカルと低ORPとの相乗効果により、よりインジゴの還元の開始に有利な微生物が選択されたことが示唆される。LP無添加のバッチでは本来ORPの低下に貢献する酸素代謝能を持った*Bacillaceae*がpH11.5によって生育が阻害されるが、pH10前後ではORP低下に寄与することを示唆していた。PCoA解析の結果LP添加により、微生物叢の変化速度が増加した。また発酵25日前後までは、スクモ由来の比較的容易に利用可能な基質がインジゴ還元に関与している一方、25日以降はスクモ由来の分解しにくい基質がインジゴ還元のエネルギーとなっている可能性が示唆された。発酵5日目にLP添加により染色に明確な効果が見られたことから、メタゲノム予測をおこなったところ、Phosphotransferase system (PTS)がLP添加によりコントロールと比べ約5倍高く、糖質の取り込みがインジゴ還元のエネルギーであることを示唆していた。中期および後期解析用バッチにおいては*P. indicireducens*類似(97.7-98.6%)細菌の存在比がLP添加バッチでコントロールより多い等、微生物叢に差が見られ、染色強度は強く、検討した全期間を通じてLPの効果を確認する事が出来た。以上、インジゴ還元発酵液の仕込み時のLPの添加は発酵初期の確実なORPの低下を引き起こし、より確実にインジゴ還元が起こるために必要な微生物叢へと誘導することが明らかになった。

病原性細菌の毒素産生を阻害するプロバイオティクスの探索ならびにその作用機構の解明

野田正文

【目的】細菌感染症の治療において薬剤耐性菌の出現は深刻な問題であり、それに対処するための新戦略の策定が急務である。近年、薬剤耐性菌に対抗する新たな戦略として、細胞間情報伝達機構のひとつである Quorum sensing (QS) 機構の阻害が注目を集めている。QS 阻害剤は、従来の抗生物質とは異なり、殺菌・静菌作用を示さず、病原因子の産生のみを特異的に阻害する抗病原性物質として効果を発揮できるため、薬剤耐性菌の出現頻度を抑えることが期待できる。最近その構造が明らかになったシグナル分子 auto-inducer-3 (AI-3) のシグナル受容体として最初に発見された QseC 受容体は、少なくとも 25 種類の病原性細菌に存在するとされており、これまでに二成分制御系 QseBC 系を介した経路が機能している病原性細菌として、腸管出血性大腸菌や野兔病菌、腸炎ビブリオ、ネズミチフス菌などが知られている。当研究室における先行研究として、大腸菌の宿主・ベクター系を用いた AI-3 のシグナル伝達阻害物質のスクリーニング系を開発している (図 1)。本研究では、この系を利用して QS 阻害物質を産生する乳酸菌株を探索した。

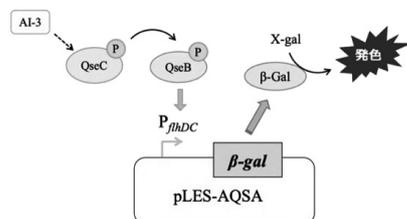


図 1 AI-3 を介した QseBC 系により制御される *flhDC* 遺伝子のプロモーターを利用したアッセイ法の模式図。

【方法】QseBC によって調節を受ける *flhDC* 遺伝子プロモーターの支配下に *β-gal* 遺伝子を配したアッセイ用プラスミド pLES-AQSA を保有する大腸菌株をスクリーニング用の菌株として用いた。スクリーニング対象となる各乳酸菌株の培養液上清を滅菌後、X-gal を含む LB 培地に添加してスクリーニング用の菌株を培養し、青色素産生阻害の有無によって QS 阻害の可能性を判断した。

次に、QS 阻害候補株が実際に活性を示すか調査すべく、QseBC 系がそのバイオフィーム形成を制御するとされる 2 種の菌周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* 及び *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に対し、実験を行った。また、同時に病原性関連遺伝子の発現状況の

違いについて、定量 PCR 法により解析した。

【結果・考察】研究室保存株ならびに新規に分離・同定した計 649 株を対象としたスクリーニングの結果、QS 阻害候補株として 28 株を見出すことができた。それらの株における、*P. gingivalis* 及び *A. actinomycetemcomitans* に対するバイオフィーム形成阻害能を調査したところ、No. 403 株 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) 及び No. 372 株 (*Enterococcus faecalis*) の培養液上清に、それぞれ強い阻害活性が観察された。なお、双方ともに生育への影響は認められていない。現在までのところ、両株の培養液上清からの活性物質の精製はできていないが、有機溶媒抽出によって得られた分画における阻害活性を比較する限りにおいては、No. 403 株では水～メタノールに溶解し易く、No. 372 株では有機溶媒層に移行しにくい物質が本体であると予測されている。

続いて、両株の抽出画分を用い、バイオフィーム形成阻害下における、両菌周病起因菌の遺伝子発現状況について調査した (図 2)。*P. gingivalis* では、阻害剤の添加によって *vimA* 遺伝子において顕著な低下がみられた。VimA は *P. gingivalis* の産生する毒素ジンジパインの活性化にも必要とされる多機能タンパク質で、本菌の病原性制御に関与するとされる。また、*A. actinomycetemcomitans* では、毒素タンパク質をコードする *cdtB* および *ltxA* 遺伝子の発現がやや低下している様子が観察された。これらの結果から、今回見出された 2 株には、病原性細菌の生育に影響を与えることなく、その毒素産生を抑制する活性が存在することが示唆された。

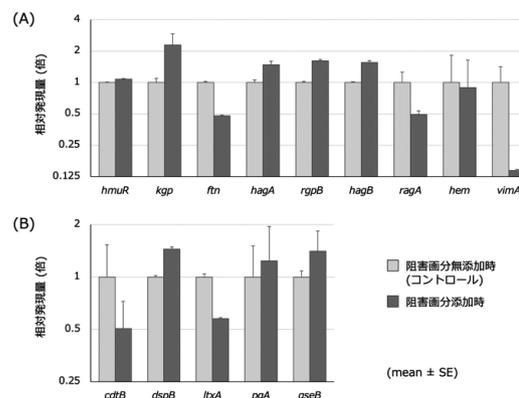


図 2 バイオフィーム形成阻害時における各遺伝子発現の変化。(A) *P. gingivalis*, (B) *A. actinomycetemcomitans*。

酵母 FLO assay を基盤とした真菌二次代謝産物からのエピジェネティック機能探索

杉山 圭一

【目的】申請者はヒト DNA methyltransferase (DNMT) 遺伝子形質転換酵母 (ヒト DNMT 酵母) が凝集性を獲得し、凝集遺伝子 *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルが亢進していることを明らかにしている。また、この凝集性はエピドラッグでもある DNMT 阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に可逆的に応答し、エピジェネティック制御下にあることも発見した。この酵母凝集性と *FLO1* 遺伝子発現を指標に、微生物ベースのエピ変異原検出系「FLO assay」を構築した (図1)。

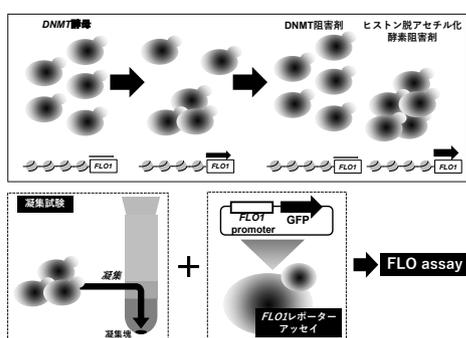


図1 DNMT酵母と FLO assay

エピ変異原により誘発されるエピジェネティック制御のかく乱は、DNAメチル化やヒストン修飾、またそれら修飾に連動するクロマチン構造に影響を与えると予想される。したがって、エピ変異原はプロモーション作用などを介して発がんを促進すると考えられている。実際に、真菌二次代謝産物のうち、発がん性など毒性を有する可能性のある化学物質はかび毒と総称されるが、申請者は、酵母凝集反応を指標に独自開発したエピジェネティック変異原検出系「FLO assay」により発がん性が懸念されるかび毒からエピジェネティック作用の検出に成功している。このような背景の元、本研究課題においては、FLO assay を技術的アドバンテージとして、エピドラッグ候補物質の探索を目的に真菌の二次代謝産物からエピジェネティック作用を示す化学物質の同定を試みた。

【方法】ヒト DNMT 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 株に同時形質転換した株を使用した。培養には SD 培地 (最少培地) を用い 30℃ にて培養した。凝集性の確認は定常期初期の培養液で行なった。 *FLO1* 遺伝子の転写レベ

ルは対数増殖期における培養液を用い Green fluorescent protein (GFP) の蛍光強度 (Excitation, 485 nm; Emission, 535 nm) を指標とした *FLO1* レポーターアッセイにより検討した。

【結果・考察】本研究では、まずは FLO assay の妥当性を検証することを目的に、かび毒フモニシン B1 のエピジェネティック作用について予備的な検討を行なった。その結果、培地中にフモニシン B1 を添加することで、酵母凝集性がフモニシン B1 の濃度依存的に促進される可能性を認めた。発がん性が懸念されるかび毒オクラトキシン A やシトリニンと同様に、フモニシン B1 についても毒性として発がん性が懸念されている。予備試験結果ではあるものの、フモニシン B1 の発がん性にエピジェネティック作用が関与する可能性と、FLO assay の妥当性を支持する結果が今回得られたと考える。

次に、振とう培養から静置培養に変更した場合の FLO assay の感度を、*FLO1* レポーターアッセイを指標に検討したところ、静置培養において同等以上の感度が得られる可能性を認めた。本結果は、FLO assay の簡便さを高めハイスループット性の向上に繋がるものと期待できる。

真菌の二次代謝産物からエピジェネティック作用を示す化学物質の同定については、市販されている同代謝産物群を被検物質として、それらを FLO assay に供試しエピジェネティック作用のスクリーニングを行なった。スクリーニングには、FLO assay としてハイスループット性に優れている静置培養と *FLO1* 遺伝子発現を指標とした *FLO1* レポーター活性を用いた。その結果、供試した真菌の二次代謝産物 23 剤のうち、約 30% の 7 剤がエピジェネティック作用を示す可能性を認めた (図2)。

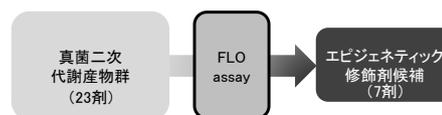


図2 FLO assay によるスクリーニング結果

以上、一連の研究から、FLO assay は真菌の二次代謝産物からエピジェネティック作用を示す化学物質をスクリーニングできる可能性があると考えられた。今後は、これら FLO assay 陽性物質のエピジェネティック作用を精査したうえで分子メカニズム解析を進め、エピドラッグとしての可能性を探りたい。

発酵食品中の微生物間相互作用を仲介する酵母プリオン様因子 [GAR⁺] の作用機序に関する研究

渡辺 大輔

【目的】 伝統的発酵食品の製造において、酵母と乳酸菌の共存が広く認められており、その際、酵母が推定上のプリオン [GAR⁺] の働きを介して炭素代謝プロファイルを変化させることが明らかにされている。その結果、毒性の高いエタノールの産生が抑えられ、酵母と乳酸菌の相利共生に貢献する。本研究では、本現象に関わる作用機序を分子レベルで理解し、発酵食品中の微生物間相互作用の新たな意義を探ることを目的とする。

【方法】 酵母プリオン様因子 [GAR⁺] の分子の実体に関する手掛かりを得るため、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* X2180 株を親株 (*[gar⁻]* 株) とし、[GAR⁺] を形成した株が選択的に生育可能となる YPGly+GlcN 寒天培地上で自発的にコロニーを形成した株 ([GAR⁺] 株) を解析に用いた。*[gar⁻]* 株および [GAR⁺] 株を、非発酵性炭素源であるグリセロールを単一炭素源とする YPGly 培地で対数増殖期まで生育させた後、グルコースアナログであるグルコサミンを終濃度 0.05% となるように添加し、3 時間培養した。グルコサミン添加前後の細胞からトータル RNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した。

【結果・考察】 *[gar⁻]* 株と [GAR⁺] 株の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、以下の 3 つの傾向が見出された。(I) 通常、酵母はグルコースにตอบสนองしてグルコース以外の炭素源の利用に関連する遺伝子の発現を抑制する (グルコース抑制)。本研究で用いた *[gar⁻]* 株においても、グルコースアナログの添加により、スクロースを分解するインペルターゼ *Suc2p*、マルトースを分解するマルターゼ *Mal32p*、エタノール産生に用いられるアルコールデヒドロゲナーゼ *Adh2p* などをコードする遺伝子の発現レベルが顕著に低下した。これに対し、[GAR⁺] 株ではグルコース抑制が部分的に解除されていた。(II) グルコースを細胞内に取り込むヘキソーストランスポーターのうち、*Hxt3p* や *Hxt4p* をコードする遺伝子はグルコースにより発現が誘導される。[GAR⁺] 株では、グルコースアナログの添加の有無に関わらず両遺伝子ともに高い発現レベルを示し、グルコース誘導性が失われていた。(III) *[gar⁻]* 株では、グルコースアナログの添加により、浸透圧ストレス応答のマスターレギュレーターである *Hog1p* プロテインキナーゼの下流遺伝子の発現レベルが上昇したが、[GAR⁺] 株ではこの遺伝子発現誘導

が抑制されていた。以上の結果から、[GAR⁺] により酵母のグルコースシグナル伝達の鍵を握る転写コリプレッサー複合体 *Cyc8p-Tup1p* 複合体の機能が欠損する可能性が示唆された。*Cyc8p-Tup1p* 複合体は、グルコース抑制を司る *Mig1p* や、ヘキソーストランスポーターの発現抑制に必須な *Rgt1p*、*Hog1p* 下流遺伝子の発現調節に関与する *Sko1p* などと相互作用し、グルコースにตอบสนองする遺伝子発現をグローバルに制御している。*Cyc8p* および *Tup1p* はいずれもプリオンの形成に必須な QN-リッチドメインを有することから、乳酸菌との共存によりこれらの酵母タンパク質がプリオンを形成し本来の転写調節機能を欠損するというモデルが考えられた (図 1)。*Cyc8p* または *Tup1p* の機能欠損によりアルコール発酵能力が低下したことからも、[GAR⁺] との関連が支持された。以上の結果を通して、酵母と乳酸菌の相利共生に関与する新規微生物間相互作用の標的因子の候補を明らかにすることができた。今後は、乳酸菌との共培養による酵母 *Cyc8p-Tup1p* 複合体の状態変化とその作用機序をさらに調べていく必要がある。*Tup1p* は、酵母からヒトに至るまで真核生物に広く保存されていることから、原核-真核生物間相互作用において中心的な役割を果たす重要な因子かもしれない。本研究結果は、我々の生活に深く根付いた発酵食品内の微生物間相互作用の分子メカニズムを解明するための重要な手掛かりになると期待される。

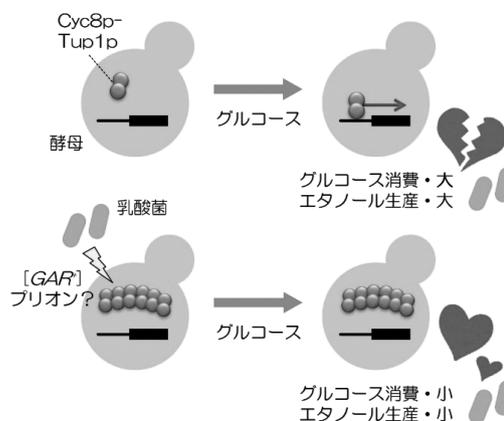


図 1 Cyc8p-Tup1p 複合体を介した酵母と乳酸菌の相利共生に関するモデル

柑橘類の優れた芳香族化合物生産能を利用した酵母による *trans*-ケイ皮酸の発酵生産

大橋 貴生

【目的】油性担子菌酵母 *Rhodotorula toruloides* は、乾燥菌体重量辺り 70% 近くの中性脂肪を貯める油性酵母として知られており、バイオディーゼル生産、バイオプラスチック生産、カロテノイドなどの有用物質の生産宿主として、近年多くの研究成果が報告されている。遺伝子工学技術も拡充しつつあり、2017年には簡便な形質転換技術も開発された。*trans*-ケイ皮酸 (tCA) は最も高耐熱なバイオプラスチックであるポリイミドモノマーの前駆体として、またフラボノイド生合成前駆体として非常に有用である。そこで高い脂溶性化合物生産ポテンシャルに着目し、油性酵母 *R. toruloides* を tCA の発酵生産宿主として利用することにした。

フラボノイドを多量に蓄積する柑橘系植物は tCA を合成する酵素としてフェニルアラニンアンモニアラーゼ (PAL) の高生産活性を持つことが期待される。本研究では、柑橘系植物であるオレンジ (*Citrus sinensis*) 由来の PAL 遺伝子を *R. toruloides* に異種発現させて、tCA を生産することを試みた。

【方法】3種類のオレンジ由来 PAL 遺伝子 (*CsPAL1*, *CsPAL3*, *CsPAL4*)、高活性が報告されている放線菌由来 *SmEncP* 遺伝子を *R. toruloides* 由来高発現プロモーターの下流に連結し、酵母発現ベクターを構築した。*R. toruloides* NBRC0559 株にこれらの PAL 遺伝子発現カセットを導入し、PAL 発現形質転換体を作成した。形質転換体を YM 培地で培養し、菌の増殖に依存しない休止菌体を調製し、L-フェニルアラニン (Phe) を含有する MinRL3 培地で培養し、tCA 生産を行った。懸濁培養液を採取し、等量のメタノールを添加して反応を停止させた。反応停止後に遠心分離を行って得た上清を用いて、逆相 HPLC 分析を行い、tCA の定量を行った。

【結果・考察】*R. toruloides* において、1kb 以上の遺伝子を過剰発現させる際に、イントロンを含まない cDNA を用いるとほとんど発現されないことが分かっていた。一方で、イントロン除去に関わるスプライシング機構は生物種により少しずつ異なるため、柑橘系植物のゲノム由来配列を用いた場合に、効率的にイントロンが除去されない懸念があった。そこで、本研究ではプロモーター領域にイントロンを持つ高発現プロモーターの下流に PAL 遺伝子を連結し、異種発現させることにした。

Shble 遺伝子、*Shble* 遺伝子を連結した *SmEncP*、

CsPAL1、*CsPAL3* および *CsPAL4* 遺伝子断片を PCR 増幅した調製した遺伝子断片を酢酸リチウム法により NBRC0559 株に導入し、PAL 遺伝子過剰発現形質転換体を得た。本形質転換法では、遺伝子断片が非相同末端結合により、酵母染色体上にランダムに挿入される。そのため、遺伝子断片が挿入された染色体上の位置により、遺伝子発現に影響がでることが予想されたため、酵母コロニー PCR により、各断片が導入された形質転換体を 5 株ずつ単離し、以降の tCA 生産実験に用いた。各形質転換体を YM 培地で培養し、1 日後に菌体を回収し、tCA 生産量を調査した (図 1 左)。PAL 過剰発現株群では、コントロール株である *Shble* 導入株と比較して約 3 倍程度生産量が増加していたものの、0.40 mg/L であった。

さらに tCA 生産量を亢進するため、菌の生育に依存しない休止菌体を生体触媒として用いた tCA 生産を試みた。休止菌体と Phe を混合し反応させたところ、tCA 生産量は大幅に亢進され、PAL 遺伝子発現株において 29–34 mg/mL の生産量を示した (図 1 右)。*Shble* 導入株と各 PAL 遺伝子発現株の平均での比較においても、PAL 遺伝子発現株において、tCA 生産量はそれぞれ 4.6–5.3 倍の上昇が見られた (図 1)。PAL 遺伝子発現静止菌体と Phe 含有脂質生産用 MinRL3 培地を用いることで YM 培地の場合の 80–172 倍の生産量を達成することができた。

油性酵母 *R. toruloides* に異種 PAL 遺伝子を過剰発現させることにより、最大 34 mg/L の tCA 生産を達成することに成功した。この成果は、本酵母の tCA 生産宿主としてのポテンシャルを証明しており、今後の本酵母を利用したフラボノイドやポリイミドモノマー生産のための基盤となる。

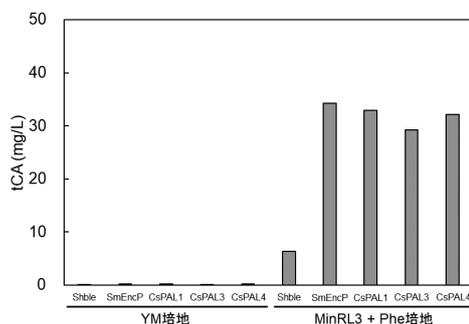


図 1 PAL 遺伝子発現株の tCA 生産量

Nrf2/SKN-1 制御系を活性化する乳酸菌体成分の探索と長寿機構の解明

小村 智美

【目的】 我が国は長寿大国であるものの高齢化に伴い認知症など加齢性疾患の罹患数が増加の一途を辿り、老化に関する課題も多い。そこで当研究室では、乳酸菌など食品微生物を介して老化や加齢性疾患を制御できる可能性に着目している。動物実験を行う場合、一般的にマウスやラットを用いるものの長期の実験期間を要し、動物愛護の観点から代替法を考慮した実験が望まれる。

そこで本研究はモデル生物の一種 *Caenorhabditis elegans* (線虫) を用いて、乳酸菌投与が宿主の寿命に及ぼす影響と寿命制御機構の一端を解明することを目的とした。

特に、宿主の抗炎症や抗酸化、解毒代謝に関わるストレス応答性転写因子 SKN-1 (哺乳類では Nrf2 に対応) に着目し、SKN-1 が線虫の寿命延長に関わるのか否か検証を行った。また乳酸菌の有効な菌体成分の探索を試みた。さらに哺乳細胞を用いて乳酸菌における Nrf2 活性化を検証することで、哺乳類へ応用できる可能性を探ることとした。

【方法】 まず乳酸菌を与えた野生型線虫における生存分析と運動性、化学走性を調べた。運動性は4段階(A~D)評価し、経日的に観察した。Aは自発運動を行っていた線虫、Bは自発運動できないが線虫用ピッカーで尾部をつつくと前後に動き出す線虫、Cはピッカーで尾部をつついても動き出すことなく頭部あるいは尾部のみ動かす線虫、Dは死亡と判定した線虫、以上4評価に分けて記録した。化学走性は、線虫が好む匂いの方へ寄り付く行動のことをいう。線虫飼育培地に線虫が好む芳香族アルデヒドまたは、その溶媒のエタノールをスポットした。そして培地中央に線虫をおき、芳香族アルデヒドへ誘引される線虫の割合を評価した。

乳酸菌摂取における線虫の作用機序解明のために、*skn-1* を欠如させた変異型線虫を用いて、上記同様の生存分析および化学走性を実施した。寿命制御に寄与する菌体成分の探索は、乳酸菌の菌体成分の抽出を行い、線虫の寿命に与える影響を調べた。また乳酸菌にトランスポゾン挿入した変異株の作製とアッセイ系の開発を試みた。

哺乳細胞を用いた乳酸菌における Nrf2 活性化有無は、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 用いた Nrf2 制御遺伝子 HO-1 の発現量を測定した。

【結果・考察】 乳酸菌を線虫に与えると、線虫の寿命が有意に延長した。また加齢に伴う運動機能低下抑制 (図1) や化学走性低下抑制を有意に示した。これらの作用機序の一端を解明するために、*skn-1* 変異型線虫を用いて解析したところ、*skn-1* 変異型線虫に乳酸菌を与えると寿命延長が消失し、化学走性低下の改善も認められなかった。これらのことから、乳酸菌を摂取した線虫は、*skn-1* を介して寿命延長や化学走性低下を抑制することが示唆された。

乳酸菌が産生する菌体外多糖は、免疫賦活作用や抗肥満効果などの機能性を有している。そこで乳酸菌から菌体外多糖を抽出し、リポソームを用いて線虫に経口投与し生存分析を実施した。生存分析3回の p 値は 0.422, 0.054, 0.009 であり、菌体給餌時よりも寿命延長率は低く菌体外多糖以外の成分も寿命制御に関与することが考えられる。そこで乳酸菌の有効成分を網羅的に探索するため、乳酸菌にトランスポゾン挿入したランダム変異株を作製し、線虫を用いたレポーターアッセイを試みたが、現在のところ寿命制御する変異株の同定には至っていない。今後も変異株を用いて探索を続ける予定である。

マウスマクロファージ様細胞株に乳酸菌または菌体外多糖を処理すると、Nrf2 標的遺伝子 HO-1 の発現上昇が認められた。

以上のことから乳酸菌および菌体外多糖は、宿主の Nrf2 を活性化することで、長寿や抗老化作用に関与することが考えられる。

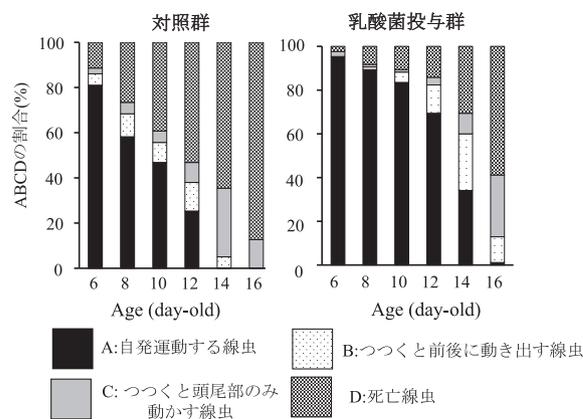


図1 線虫の加齢に伴う運動性

進化解析に基づく高機能PET加水分解酵素の創出

吉田 昭介

【目的】 ペットボトルや繊維などに利用されるポリエチレンテレフタレート (PET) は生分解性が低いため、環境中に蓄積し、生態系や景観の破壊を引き起こしている。申請者らは、PET分解・代謝細菌 *Ideonella sakaiensis* を発見し、本菌が有するユニークなPET加水分解酵素PETaseを同定した (Yoshida *et al.*, Science, 2016)。細菌由来のPET加水分解性酵素 (PHE) は系統的に3つのグループに分かれる (図1)。Type IIbに属するPETaseはType I酵素と比べ、高い分解活性と基質特異性を示す一方で、耐熱性が低く、利用への障害となっている。本研究では、Type I酵素の安定骨格にPETase由来アミノ酸を導入することで、高活性と高安定性を併せ持つ酵素の創出を目指した。

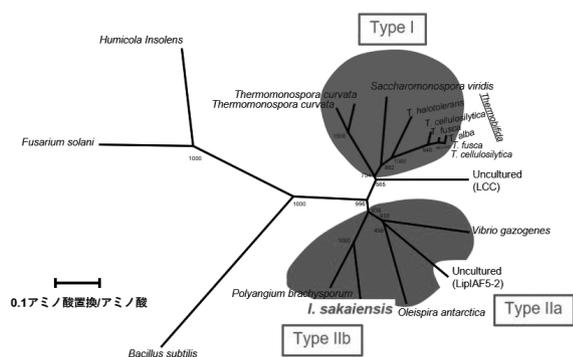


図1 PHEの進化系統樹
葉部分は酵素の由来生物を示す。

【方法】 Type IIb酵素とType I酵素のアライメントおよび結晶構造の重ね合わせにより見いだされる活性部位周辺の4つの非相同なアミノ酸残基 (PETaseにおいて、W159, S238, C203, C239) に着目した。これら4つのアミノ酸をPET加水分解能を有する耐熱性クチナーゼLCC (Type I) の相同部位に単独、複数置換導入した変異体を作成した。また、LCCにおける同部位のアミノ酸をPETaseにも置換導入した。これら変異体のPET分解活性、脂肪酸エステル分解活性、耐熱性を調べた。タンパク質の分子内ジスルフィド結合は、DTT存在/非存在下で熱処理し、SDS-PAGEで分離することで調べた。

【結果・考察】 PETaseにLCC由来アミノ酸を導入した変異体は総じて、PET分解活性が低下した (図2a)。一方で、脂肪酸エステルに対する分解活性は、C203A/

C239A変異を含む変異体を除き、野生型と同等であった (図2b)。LCCにPETase由来アミノ酸を導入した変異体のうち、F243S変異体 (L-F243S) は、PET加水分解活性が野生型と比べ3.5倍、PET特異性が4.1倍向上した (図2c)。4残基すべてを置換したLCC変異体 (L-H164W/A207C/A244C/F243S) は、PET加水分解活性は54%まで低下したが、PET特異性は62倍と顕著に増加した。いずれもわずかな耐熱性の低下が認められた。また、L-A207C/A244C変異体と比べ、L-H164W/A207C/A244C/F243S変異体で顕著な分子内ジスルフィド結合の増加が認められたことから、A207C-A244C間のジスルフィド結合はH164W/F243S変異により促進されたと考えられた。以上の結果から、PETaseの活性部位周辺に認められる固有のアミノ酸が高いPET加水分解活性やPET基質特異性に貢献していることが明らかとなった。これを利用し、耐熱性Type I酵素に高いPET分解活性とPET特異性を付与しうることが示された。

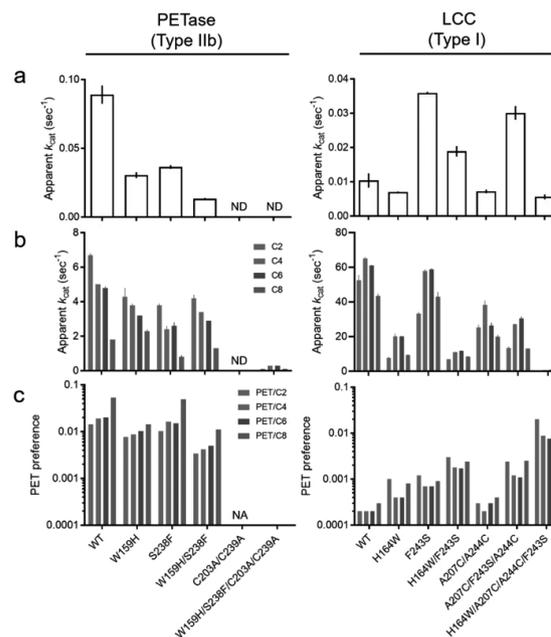


図2 PETase, LCC, およびそれらの変異体のPET加水分解活性と特異性. (a) PET加水分解活性 (b) パラニトロフェノール (pNP)-脂肪酸エステルに対する加水分解活性 C2, pNP-acetate; C4, pNP-butryrate; C6, pNP-caproate; C8, pNP-caprylate (c) aとbの値の比をPET加水分解特異性として算出した。

乳酸菌が産生する菌体外多糖の免疫増強活性に寄与する酵素の構造基盤の解明

松崎千秋

【目的】 プロバイオティクスとは、ヒトが摂取した際に身体に有益な影響を与えてくれる生きた微生物であり、高齢で低下する免疫力を増強するプロバイオティクスの利用は、高齢化社会に直面している現在、医薬・食品産業から高い注目を集めている。しかしながら社会的ニーズの高まりにも関わらず、これらプロバイオティクス乳酸菌の免疫誘導成分の分子レベルでの知見は乏しく、産業応用への妨げとなっている。乳酸菌の産生する菌体外多糖には粘膜免疫を増強する効果が知られているが、多糖のどのような物理化学的構造が活性に寄与しているのか、詳細な解明はなされていなかった。我々はこれまでに、乳酸菌の持つ糖質加水分解酵素ファミリー70 (GH70) に属する酵素グルコシルトランスフェラーゼによって合成されたグルコース鎖が、粘膜を病原体から保護する役割をもつ免疫イムノグロブリンA (IgA) の産生誘導に寄与していることを見出している。そこで本研究では、グルコース鎖のどのような構成成分がIgAの誘導に寄与しているのか明らかにすることを目的とした。

【方法】 比較に用いたグルコシルトランスフェラーゼは、IgA産生誘導能の高い菌体外多糖を産生する乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048株由来のGtf1とGtf2、*L. mesenteroides* 基準株JCM6124^T由来のLEUM1752とLEUM1747、*L. mesenteroides* NRRL B-512F由来のDsrS、*L. mesenteroides* NRRL B-1335由来のアルタナン合成酵素ASRである。各グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を乳酸菌ゲノムからクローニングし、大腸菌による組み換え酵素発現系を構築し、各酵素の発現と酵素精製を行った。得られた6種の精製酵素からグルコース鎖を合成し、GC-MSおよび¹H-NMRによる構造解析を行うとともに、マウスパイエル板細胞およびマウス生体を用いてIgA産生誘導能を検証した。

【結果・考察】 合成される多糖の構造が明らかになっている11種類のグルコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列を用いて、本研究に用いた6種の酵素の系統樹解析を行った。その結果Gtf2、LEUM1752そして α -1,6/1,3結合グルコース鎖を合成する酵素DsrT5の間に高い相関性が認められ、Gtf2およびLEUM1752は α -1,6結合に α -1,3結合側鎖を有するグルコース鎖を合成することが予測された。またGtf1、LEUM1747そして α -1,6結合グルコース鎖を合成する酵素DsrSとの間にも高い相関性が認められ、Gtf1およびLEUM1747は、 α -1,6結合グルコース鎖を合成することが予測された。

大腸菌発現系にて精製した6種の組換え酵素から、スクロースを基質にグルコース鎖を合成して、その多糖構

造を解析した。その結果、アミノ酸配列から予測されたとおり、Gtf2およびLEUM1752は α -1,6結合に α -1,3結合側鎖を有するグルコース鎖を合成し、Gtf1およびLEUM1747は α -1,6結合グルコース鎖を合成した(表1)。

表1 酵素合成多糖の糖鎖結合様式の割合

酵素名(多糖名*)	グルコース鎖結合様式(%)**			
	T-Glcp-(1→	→3-Glcp-(1→	→6-Glcp-(1→	→3,6-Glcp-(1→
Gtf1 (Gtf1-S)	9	-	81	10
LEUM1747 (LEUM1747-S)	8	-	80	12
DsrS (DsrS-S)	7	3	77	13
Gtf2 (Gtf2-S)	8	43	45	4
Gtf2 (Gtf2-P)	6	44	39	11
LEUM1752 (LEUM1752-S)	13	32	49	6
LEUM1752 (LEUM1752-P)	8	51	36	5
ASR (ASR-S)	13	30	45	12

*S(上清画分)P(沈殿画分), **-, not present

IgA産生誘導能の高いことが報告されているNTM048株由来の菌体外多糖と、得られた酵素合成多糖について、マウスパイエル板細胞からのIgA産生誘導能を比較した。その結果、 α -1,6結合に α -1,3結合側鎖を有するグルコース鎖で、 α -1,6結合と α -1,3結合の比が約1:1の糖鎖(Gtf2-SおよびLEUM1752-S)が強くIgA産生量を増強した(図1)。また α -1,6と α -1,3の2糖繰り返し構造を有するアルタナンASR-Sには強い誘導は見られなかったことから、 α -1,6および α -1,3の連続した結合の重要性が明らかとなった。

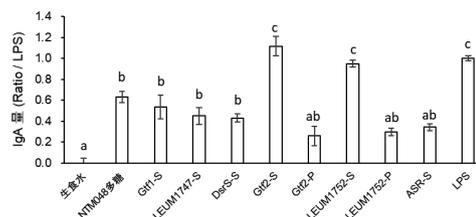


図1 菌体外多糖 (NTM048多糖) および酵素合成多糖の、IgA産生誘導能の比較。生食水: ネガティブコントロール。LPS: リポ多糖 (ポジティブコントロール)。異なるアルファベット間で有意差あり (P<0.05)。

最も高いIgA産生誘導能を有していたGtf2-Sについて、病原体に対する感染防御効果の高い、抗原特異的IgA誘導能を評価した。オボアルブミン抗原を用いたマウス経鼻感作モデルにて、粘膜上の抗原特異的IgA量を測定した結果、下気道および鼻粘膜上に誘導を確認した。病原体に対する感染防御効果のある機能性食品素材としての利用と共に、医療分野では粘膜ワクチンの効果を高める免疫増強剤としての利用が期待できる結果であった。

共生微生物によるダイズ黒根腐病防除機構の解明

岡崎 伸

【目的】 ダイズ黒根腐病は我が国の大豆栽培において最も深刻な病害の一つである。発病した場合、ダイズの生育が抑制され、深刻な場合は生育途中で枯死し、大豆収量が大きく低下する。これまでのところ本病害に有効な農薬はなく、効果的な防除法はない状況である。そこで本研究では、黒根腐病菌の増殖を抑えるダイズ共生微生物に着目し、共生微生物によるダイズ黒根腐病菌の生育抑制力の評価、およびダイズ栽培時における病害抑制効果の解析を行った。

【方法】

(1) 寒天培地上でのダイズ黒根腐病菌の生育抑制

AG平板培地の下側半分には種々の細菌株を塗布して28℃暗黒条件下で3日間培養後、PDA培地で培養したダイズ黒根腐病菌を培地上側に置き、28℃で10日間培養した。黒根腐病菌の生育の差を比較することで各細菌株による阻害を比較した。

(2) 共生微生物によるダイズ黒根腐病防除効果の評価

共生微生物の接種により黒根腐病が防除できるかどうかを、ポット試験で検討した。ふすま培地で1週間培養した黒根腐病菌2gを滅菌土壌200mlと混和して汚染土壌とし、これを小型プラスチックポット（250ml容）に充填し、ダイズ品種タチナガハの種子を播種し、同時に拮抗微生物を接種した。栽培は温度28℃、湿度70%で行なった。播種後20日時点での発病指数（0：無発病、1：根部・地際部の褐変、2：主根、地際部全体の褐変、3：主根の腐朽、4：枯死）と発病頻度を判定し、これにより共生微生物による黒根腐病防除効果の評価した。

【結果・考察】

(1) 寒天培地上でのダイズ黒根腐病菌の生育抑制

各種細菌によるダイズ黒根腐病菌抑制効果を検討した結果、大腸菌、根粒菌、アグロバクテリウムでは黒根腐病菌の生育は抑制されなかったが、イネの共生微生物である *Bacillus pumilus* TUAT1株でもっとも強い生育阻害が認められた（図1）。

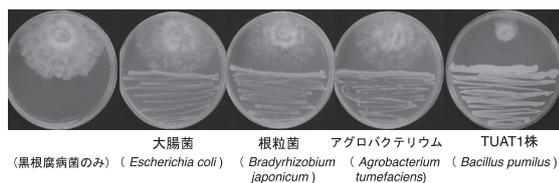


図1 各細菌によるダイズ黒根腐病菌抑制効果

次に、農業生物資源ジーンバンクから日本各地の黒根腐病菌株を入手し、TUAT1株による生育抑制が採取地の異なる黒根腐病菌でも認められるかを検討した結果、生育阻害効果には菌株間差があったものの、試験した8株全てにおいてTUAT1株による生育阻害効果が認められた。以上の結果から、TUAT1株は日本各地で分離された黒根腐病菌株の生育を抑えることが明らかとなった。

(2) TUAT1株によるダイズ黒根腐病防除効果の評価

次に、TUAT1株により実際に黒根腐病が防除できるかどうかを、ポット試験で検討した。その結果、病原菌のみの接種では発病頻度が75%であったが、TUAT1株を接種した場合は発病頻度が25%～33%に低下した。この結果からTUAT1株が実際にダイズに感染する黒根腐病菌を抑制できることが示唆された。次に、日本各地から分離された黒根腐病菌を用いて同様の試験を行った結果、菌株によって発病度とTUAT1株による抑制程度に差があることが判明した（図2）。

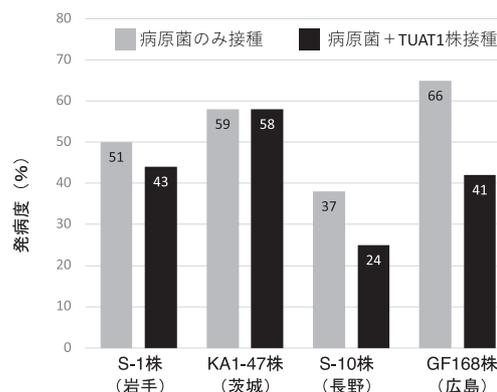


図2 TUAT1株接種時の発病頻度の比較

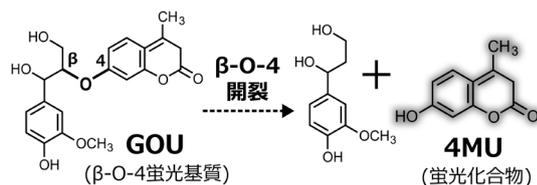
S-1株、S-10株、GF168株などではTUAT1株による抑制効果が見られ、特に長野県分離株S-10、広島県分離株GF168株に対しては、TUAT1株が発病頻度がそれぞれ顕著に低下しており、TUAT1株の抑制効果が高いことが明らかとなった。一方、茨城県分離株KA1-47株についてはTUAT1株の有無により発病頻度が変化しなかった。菌株によってTUAT1株による抑制程度に差がある原因については今後解析する必要があるが、TUAT1株の効果をより明確にするような接種方法を検討する必要性が考えられた。

リグニンの主要結合を開裂する微生物の探索とリグニンからの ポリマー原料生産への応用

上村直史

【目的】木質成分のリグニンは年間200億トン生産され、プラスチック製品の化石代替原料として十分な賦存量を有します。現在、リグニンの利用方法として、化学触媒を用いた低分子化処理とこれにより生成する芳香族モノマー・オリゴマーからのポリマー原料化合物の発酵生産が期待されています。リグニンはヘテロ高分子ですが、その約50%は β -アリアルエーテル(β -O-4)結合で連結しています。 β -O-4結合の開裂酵素は、リグニン由来化合物分解菌の *Sphingobium* sp. SYK-6 株を含む α -プロテオバクテリアにしかほとんど例がなく、いずれもグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)です。本研究ではリグニンからのポリマー原料生産に有益な新規または高活性の β -O-4結合開裂酵素の発見を狙い、 β -O-4結合開裂細菌の探索と解析を行いました。

【方法】 β -O-4結合開裂菌のスクリーニングのため、本結合の開裂により蛍光物質である4-メチルウンベリフェロン(4MU)を生成する蛍光基質(GOU)を合成しました(図1)。細菌において重要なリグニン代謝中間体として知られるバニリン酸とシリング酸を単一炭素源として生育する菌株を単離し、96ウェルプレートにてGOUを含むバニリン酸またはシリング酸で培養し、蛍光プレートリーダーにより4MUに由来する蛍光をモニターしました。 β -O-4結合開裂能の調査は、バニリン酸またはシリング酸で培養した菌体の休止細胞を β -O-4結合のモデル二量体化合物である guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether (GGE) とインキュベートし、反応産物を液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析することで行いました。菌株の同定は16S rRNA 遺伝子配列を基にした系統解析により行いました。 β -O-4開裂酵素のグルタチオン要求性は、超音波破碎により調製した細胞抽出液をグルタチオン存在下、非存在下でGGEのCa位酸化物であるMPHPVとインキュベートし、MPHPVの変換をHPLCにより分析することで調べました。



【結果・考察】ハイスループットな β -O-4結合開裂細菌のスクリーニング方法構築のため、 β -O-4結合を有する蛍光基質のGOUを合成しました(図1)。環境試料からバニリン酸またはシリング酸で生育できるバクテリアを918株単離し、GOUを基質とした β -O-4結合開裂能のスクリーニングにより β -O-4結合開裂能を有する候補株を45株獲得しました。これらのうち10株がGGEを基質とした場合でも β -O-4結合開裂能を示しました。各株においてGGEはCa位の酸化を受けてMPHPVに変換された後に β -O-4結合開裂を受けることが示唆されました。16S rRNA 遺伝子配列の解析から各株は α -プロテオバクテリアの *Sphingobium* 属と *Novosphingobium* 属、 β -プロテオバクテリアの *Delftia* 属等であることが同定されました。これらのうち、*Sphingobium* sp. AzN-1 株、*Sphingobium* sp. G14-4 株、*Novosphingobium* sp. G26-1 株、*Delftia* sp. NB13-2 株のゲノムシーケンス解析を行い、 β -O-4結合開裂に関わると推定される酵素遺伝子の保存性を調査しました。その結果、*Sphingobium* sp. AzN-1 株、*Sphingobium* sp. G14-4 株、及び *Novosphingobium* sp. G26-1 株はいずれも既知のCa-dehydrogenase および β -O-4結合開裂を担うGSTと75%以上のアミノ酸配列相同性を示す遺伝子を保持していました。また、これらの株は β -O-4結合開裂以降の代謝経路を担う酵素遺伝子を全て保持していました。AzN-1株とG14-4株は、既知のリグニン由来化合物分解菌の *Sphingobium* sp. SYK-6 株よりも β -O-4開裂能に優れており、かつバニリン酸、シリング酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸等の様々なリグニン由来芳香族化合物に加えてSYK-6株が利用できないグルコースで生育できたことから、リグニンからの有価物生産の宿主として期待されます。一方、 β -プロテオバクテリアのNB13-2株は β -O-4開裂反応においてグルタチオン要求性が見られたことから、本株の β -O-4開裂酵素は既知と同様にGSTであることが強く示唆されました。しかしながら、NB13-2株のゲノムには既知の β -O-4結合開裂GSTとの相同遺伝子は見出されず、新しいタイプの β -O-4結合開裂GSTの存在が示唆されました。*Delftia* 属の細菌における β -O-4結合開裂能の発見は本研究が初めてであり、NB13-2株の β -O-4結合開裂GSTを同定・機能解明することにより、自然界におけるリグニン分解への理解を深めることができると期待されます。

単一の細胞が精巧で微小な構造物を構築する原理の解明

野村 真未

【目的】 単細胞生物の有殻アメーバは実に精巧な母細胞と同型の被殻を細胞外の鋳型のない空間に構築することが知られている。しかし、現在有殻アメーバの利用可能な培養株は世界中でたった6株しか存在せず、被殻構築様式の研究は進んでいない。そこで、本研究では有殻アメーバの培養株を確立し、その被殻構築様式を形態学・分子生物学的に解析することで、共通する細胞行動や遺伝子発現から被殻構築の基本原則を明らかにすることを目的とした。

【方法】 各地で採集を行い、マイクロピペット法により単一細胞を洗浄、単離を行った。また、カナダ Dalhousie 大学の Eglit 氏から有殻アメーバ *Paulinella* sp. を含む粗培養株を提供していただいた。走査型電子顕微鏡を用いた形態観察により、確立した培養株の分類を行った。また、被殻構築に関与する遺伝子を特定するため、total RNA および単細胞 RNA シーケンスを行った。単細胞 RNA シーケンスの手法の一つである SMART-seq2 法を改良し、増幅した cDNA を定量 PCR 法で確認した。

【結果・考察】 本研究において新たに4株の培養株を確立することに成功した。Eglit 氏が確立したクルード培養株には *Paulinella* sp. の他、バクテリアとストラモノパイルに属すると思われる鞭毛虫が混在していたため、マイクロピペット法により真核生物が *Paulinella* sp. 単一のクローンとなるように単離を行い、培養株 YE-3 および YF-1 株を作成した。YE-3 および YF-1 株の被殻を走査型電子顕微鏡により観察した結果、鱗片の形態的特徴からどちらの株も *Paulinella indentata* であることが明らかとなった(図1)。*P. indentata* の被殻は縦長の楕円体であり、20~30枚程の鱗片から構築されている。被殻の中間層に位置する鱗片は長方形で、長辺の中央は凹んでいるのに対し、長辺側部は張り出していた。また、凸凹のない部分の鱗片表面には小さな孔が空いていた。開口部を構成する鱗片の凹凸はほとんどない一方で、細胞後方の鱗片は鱗片長辺の出っ張りが激しく棘状になっている。この棘状の鱗片は光学顕微鏡でははっきりと観察ができず、電子顕微鏡レベルの特徴と言える。本研究において、有殻アメーバのなかでは分子情報が豊富な独立栄養性の *Paulinella chromatophora* と *Paulinella micropora* と同属の培養株を確立できた。本株を用いた研究によって、被殻構築解明だけではなく、光合成オルガネラ獲得

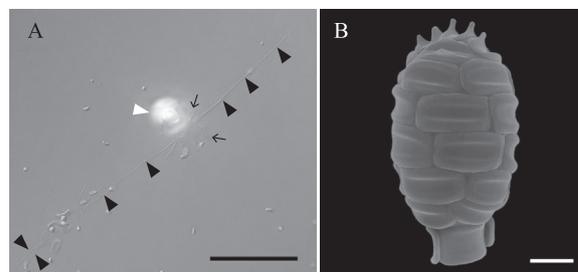


図1 *Paulinella indentata* の被殻

A. 光学顕微鏡像。開口部付近に葉状の仮足(矢印)と、細胞体(白矢頭)から遠く離れ長く伸びる糸状の仮足(矢頭)が観察された。

scale bar: 20 μ m

B. 走査型電子顕微鏡像。細胞後方の特徴的な棘状の鱗片が観察された。 scale bar: 2 μ m

に至る進化を明らかにするために重要な手がかりを得たと言える。

そこで、次に YE-3 株を用いて、比較 RNA シーケンスによる被殻構築関連遺伝子の探索に着手した。今回確立された培養株は増殖速度が非常に遅く、細胞が密に増えることがないため、単細胞 RNA シーケンスによる遺伝子発現解析が必要であると考えた。そこで、まずは基盤となるデータベースを構築するため、total RNA を抽出し RNA シーケンス解析を行った。Blast 検索により 18S rRNA 遺伝子配列を収集し、近縁の有殻アメーバの配列とともに系統解析を行った結果、*P. indentata* 由来の配列が取得できていることを確認した。次に、単細胞 RNA シーケンスを行う際に、硬い被殻をもつ有殻アメーバから RNA を抽出するため、目的の細胞をマイクロピペット法により界面活性剤の入った細胞溶解バッファーに単離し、液体窒素による凍結と 98 $^{\circ}$ C に温めたヒートブロックによる融解を 3 回繰り返した。改良 SMART-seq2 法により増幅した cDNA を定量 PCR で確認したところ、単離した 11 細胞すべてから RNA の抽出および cDNA の増幅ができていたことがわかった。cDNA の増幅が確認できたサンプルについてシーケンスを行った結果、3 サンプルのうち 2 サンプルで良好にシーケンスを行うことができた。今後、独立栄養性 *Paulinella* との発現比較を行っていきたい。

2019年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2019年4月～2022年3月

彩雪をもたらす氷雪性緑藻の種の全世界的な解明： 培養株の多面的解析と野外サンプルとの比較分子解析

松 崎 令

【目的】極域や山岳地域において、融雪期に雪原や氷河が緑色や赤色などに色付く「彩雪」現象は、雪氷環境に適応した微細藻類（氷雪藻）が雪氷中でブルームを形成することによって主に引き起こされる。彩雪中には氷雪藻だけでなく、従属栄養性の原生生物や微小動物、菌類やバクテリアなどもみられるため、氷雪藻を生産者とする食物網が形成されていると考えられている。寒冷かつ貧栄養な雪氷環境における生態系は生物学的に非常に興味深く、また、彩雪は鉱物粒子や黒色炭素などと同様に氷河や雪原の融解を促進しているという近年の研究により、氷雪藻は注目を集めている。彩雪サンプルのアンブリコン解析は多様な氷雪藻の存在を示唆しているが、その実体はほとんど分かっていない。そこで本研究では、氷雪藻の種多様性と系統を全世界的に解明することを目的とし、新規培養株と世界各地のカルチャーコレクションが保有する培養株、並びに野外サンプル中の接合子を用いて、申請者が近年確立した形態と分子情報を結合した種レベルの分類学的同定手法を実施した。

【方法】融雪期（4月中旬～6月上旬）に八甲田山（青森県）、月山（山形県）、尾瀬国立公園（群馬県側）、および立山（富山県）において採集した彩雪サンプルから、ピペット洗浄法を用いて氷雪藻の新規培養株を確立した。海外での野外調査は新型コロナウイルスの感染拡大により実施できなかった。また、国内外のカルチャーコレクションから氷雪藻の未同定培養株を購入し、比較形態解析と分子系統に供した。野外サンプルと培養株は5℃、明期：暗期＝14h：10h、光量子束密度35-90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で保存された。DNA抽出、塩基配列のシーケンス、および分子系統解析はMatsuzaki *et al.*の手法と同様に実施された。

【結果・考察】彩雪の主要な原因藻類である緑藻クロモナス属（*Chloromonas*）の培養株を日本の彩雪サンプルから約60株確立し、国内外のカルチャーコレクションから購入した日本、北米、北極域、および南極産の未同定株約10株とともに分子系統解析を行った。その結果、13の新規系統が明らかとなった。残念ながら全ての系統の分類学的研究を助成期間内に完結させることはできなかったが、*Chloromonas* sp. NIES未公開株（日本産）、および*Chloromonas* cf. *granulata* CCCryo 281-06株（南極産）は栄養細胞と無性生殖の比較形態解析、並びに分

子解析の結果から、それぞれ未記載種であると考えられた。また、氷雪性クロモナス属において実験的に有性生殖を誘導して接合子を形成させることは*C. tughillensis*でしか成功していなかったが、手法の改良と新規培養株の利用により、新たに3種で有性生殖を誘導して接合子を形成させることに成功した。分子同定した野外サンプル中の接合子と比較した結果、培養株由来の接合子の形態は、天然で形成されたものと同様であることが示唆された。

続いて、日本を含む北半球とオーストラリアの彩雪から繰り返し報告されていた雪氷微生物 *Chionaster nivalis* の分子解析を実施した。本種は単細胞性で、細胞壁にみられる3-5の突起により星型の形状をとる（図1）。細胞が無色であることから非光合成の藻類もしくは菌類とされてきたが、培養株や分子データの報告はなく、科以上の分類学的位置は記載から100年以上経っても不明なままだった。本種の分離培養は成功しなかったが、キャピラリーピペットを用いて日本産彩雪サンプルから本種と同定できる細胞を200以上回収・洗浄し、それらから抽出したDNAを用いることで、本種のリボソームDNAの配列データを得ることに成功した。分子系統解析の結果、本種は担子菌門に位置すること、およびハラタケ亜門内で独立した系統をなす *Bartheletia paradoxa*（バルテレティア綱）の姉妹系統であることが明らかとなった（図1）。また、GenBankに登録されていた彩雪のアンブリコン解析データを調査した結果、北半球の複数の地点だけでなく、これまで*C. nivalis*の報告がなかった南極からも本種のものと考えられる配列が検出され、本種の広域分布が分子データからも支持された。



図1 担子菌門における *Chionaster nivalis* の位置

2020年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2020年4月～2022年3月

少数細菌の検出を可能とする深層化 16S メタゲノム解析法の開発

後藤 愛那

【目的】地球上の多種多様の細菌は、「細菌叢」という複雑な一群を成し、自然環境や共生生物などに重要な影響を及ぼす。これら細菌叢解析には、細菌ゲノム中の 16S rDNA 配列を PCR 増幅し、次世代シーケンサー (NGS) で解析する 16S メタゲノム解析が一般に用いられている。本手法の解析可能最大リード数は 10^{10} リード程度であるため、腸内や土壌に存在する 10^{13} /g 個を超える細菌の一部を抜き出し、菌叢中の優勢種にフォーカスして全体像をとらえるアプローチとしてたいへん強力である。その一方、存在比が低い種が菌叢全体に影響を及ぼす事例も複数報告されている。本研究は、菌叢をより深く正確に把握すべく、希少種に焦点を絞った新規 16S メタゲノム解析手法 DRIP (Deeper Resolution using an Inhibitory Primer) の開発を目的とするものである。

【方法】DRIP では、現行の NGS 解析手法をベースに、ライブラリ作成段階で主要菌由来アンプリコンを除くことで、希少種由来のアンプリコンの検出頻度を上昇させる。検討モデルとして *Bifidobacterium* が優勢となる乳児の腸内細菌叢の解析を実施した。

まず、*Bifidobacterium* 属細菌の 16S rDNA 特異的な配列を持つ、ビオチン付加阻害プライマーを設計した。Mock (14 菌種精製ゲノムの混合) および乳児糞便由来 DNA をテンプレートとして V3-V4 領域を増幅する 1st PCR を、通常条件 (Control) と本阻害プライマー添加条件 (DRIP) で行った。アビジンでビオチン付加 *Bifidobacterium* 属由来アンプリコンのみを除いた後、Miseq 解析用バーコードタグ付きプライマーを用いた 2nd PCR を行った。Miseq platform に基づき、NGS 解析、QIIME2 を用いてクラスタリングと分類分析、次いで統計解析を行った。

総細菌数および *Faecalibacterium prausnitzii* の rRNA 遺伝子数は、それぞれユニバーサル配列あるいは種特異配列プライマーを用いた qPCR により測定した。

【結果・考察】Mock を用いた予備検討では、除外対象である *Bifidobacterium* 属 3 種の存在比が減少し (19.0% → 2.3%)、阻害ターゲット特異的にアンプリコンを除去可能であることが示された。

11 人の乳児糞便由来ゲノムについても同様の方法で解析したところ、*Bifidobacterium* 属のアンプリコンシーケンスバリエーション (ASV) が大幅に減少した (図 1)。それに伴い、検出種数は DRIP により 6 乳児で増加、4

乳児で減少した。個別別でみると、DRIP で新たに出現したのは 7 種 (中央値) であった。また、元の *Bifidobacterium* 属比率が多いほど DRIP での検出種数増加が多くなる傾向であり、除去された *Bifidobacterium* 属アンプリコン分が他菌種検出に宛がわれたと考えられる。このとき、Control と DRIP 間の Bray-Curtis 非類似係数は 0.049 と低値であることから、除外ターゲット以外の菌叢組成を保った結果が得られていることが確認された。また、DRIP により新たに検出された菌種のひとつである *F. prausnitzii* を一例に、MGS メタゲノム解析と qPCR それぞれによって算出された菌数を比較した。その結果、qPCR 定量 *F. prausnitzii* 菌数は、Control (NGS) とは相関していなかったが ($r = -0.158, p = 0.64$)、DRIP (NGS) とは正相関していた ($r = 0.987, p = 1.8 \times 10^{-8}$) (図 2)。従来の方法では、希少菌種数の

定量性が低いことが懸念・指摘されてきたが、DRIP はそれを解決可能であることを強く示唆している。

以上より、

DRIP はこれまで検出頻度自体や正確な定量に課題があるとされてきた希少菌種にフォーカスした分析を実現可能であることが示された。本方法の重要な意義は、(1) 従来の NGS メタゲノム解析フロー (基本的手法、機器、ソフトウェア) の中で実施可能であること、(2) DRIP で得られた情報は、従来の解析方法と組み合わせる、すなわちターゲット菌除去前の菌叢情報を再反映することで初めて「真の細菌叢」に近づけることができるという 2 点である。今後、技術面で残された課題 (特異性等) を解決することで、環境細菌叢理解に幅広く応用されることを期待する。

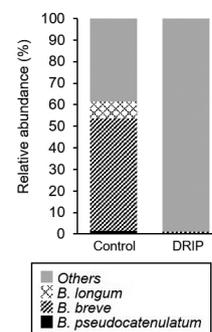


図 1 乳児糞便由来ゲノムにおける DRIP 適用例

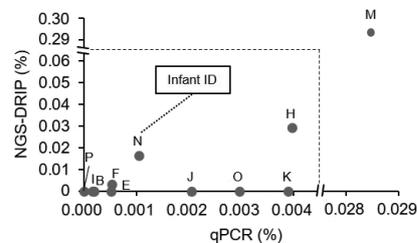


図 2 *F. prausnitzii* 菌数測定結果比較

グラム陰性菌外膜タンパク質アセンブリー機構の解析

塩田 拓也

【目的】 グラム陰性菌は、外膜というバリアを持つため抗菌薬が効きにくいという性質を持つ。外膜は、タンパク質が50%以上を占める硬いバリアを形成する。グラム陰性菌の外膜タンパク質は、ほとんど全てが β バレル型膜タンパク質である。 β バレルの複雑な立体構造形成と外膜への組込み（アセンブリー）を行っているのが、BAM複合体である。BAM複合体は、外膜の弱体化という観点から魅力的な薬剤標的である。本研究では、BAM複合体と輸送するタンパク質（基質）の相互作用部分を標的とした薬剤開発のための基盤研究として、BAM複合体が認識する配列の決定を目指した。

【方法】 ①BAM複合体が認識する基質の配列を決定するために、基質を断片化したペプチドライブラリーを用いた競合阻害実験を行なった。具体的には、大腸菌で最も多い外膜タンパク質であるOmpCをモデル基質としこれらを17残基ずつのペプチドとして合成した。これらを個別に、我々が開発した*in vitro*再構築実験系「EMMアセンブリーアッセイ」に添加し、BAM複合体を介したアセンブリーへの影響を調べた。EMMアセンブリーアッセイは、大腸菌の高比重膜画分（*E. coli* Microsomal Membrane: EMM）に放射性ラベルした基質タンパク質を添加することで、ラジオイメージングによりアセンブリーを追跡できる手法である。

②シグナル部分に変異を加えたOmpCを大腸菌内で発現し、そのアセンブリーをBN-PAGEで解析した。また、抗菌薬を加えストレス条件で培養し、バリアの堅牢性を調べた。

【結果・考察】 OmpCペプチドとの競合阻害に用いる基質には、腸内出血性大腸菌の毒素タンパク質EspPを用いた。EspPは、BAM複合体を介して外膜にアセンブリーされると自己切断を起こし分子量が低下する。切断型（m）の量からペプチドの阻害効率を見積もった。その結果、4, 10, 17, 18, 21, 23番目のペプチドがEspPのアセンブリーを阻害した（図1A）。23番目は既知のシグナルである β シグナルを含む領域であり、アッセイが正しく競合阻害を評価できていることを確認できた。阻害効果が大きかった18, 21番は、配列が23番目と類似しており、また立体構造上で β ストランドの配向が同じであった（図1B, C）。すなわち、同様の構造・配列が複数回続いていることが明らかになった。変異解析から、この18番21番のペプチド領域にはアセンブリーに必要

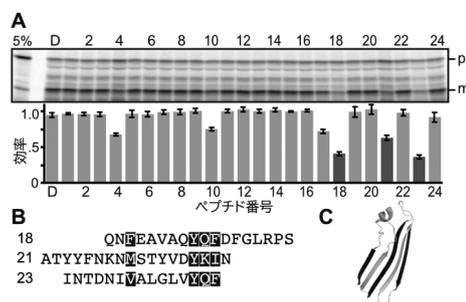


図1 A. 阻害ペプチドによる親和性領域探索. B. 有効阻害ペプチドの配列と、類似部分. C. 阻害ペプチドを有する β ストランドの配向性。黒色と灰色はそれぞれ同じ配向を示す。

なシグナルとして機能していることが明らかになった。

次に、これらのシグナルが*in vivo*でアセンブリーにどのように影響しているかを調べるため、大腸菌でシグナル変異体を発現した。シグナル領域で重要な残基として、Phe280とTyr286がある。これらを個別、もしくは両方同時にアラニンに置換したところ、二重変異体はアセンブリー効率が低下した（図2A）。次に、シグナル変異体発現が、外膜のバリア機能に与える影響を調べるため、細胞壁の合成阻害剤、バンコマイシン（VCN）を添加して生育を比較した。VCNは、分子量が大きく通常は外膜を透過できず生育を阻害しないが、外膜の堅牢性が低下すると作用できる。二重変異体を発現した株では、VCNに対する感受性が増加していた（図2B）。我々は、別の解析から、新規シグナルの変異体が、BAM複合体で詰まってしまうことを見出している。すなわち、新規シグナルは、迅速なアセンブリーを実現し、基質の停滞を防ぐことで、外膜のバリア形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。

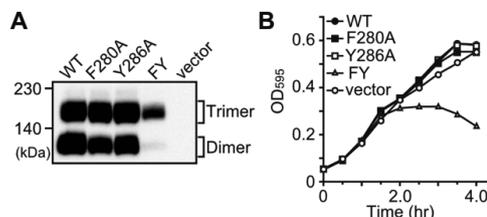


図2 A. *in vivo*での新規シグナルの変異体のアセンブリーのBN-PAGEでの比較. B. シグナル変異体をVCN存在下で培養した際の生育比較. FYは二重変異体を示す。

原核微生物が持つエピジェネティクスの理解に向けた 海洋細菌群集の DNA メチル化修飾の系統網羅的解析

平岡 聡 史

【目的】細菌や古細菌、二本鎖 DNA ウィルスは、ヒトなどの真核生物と同様に、生体内でゲノム DNA に化学修飾が起きることが知られており、生理学的に重要な役割を担うと考えられている。そのため微生物の生理生態を理解する上で、ゲノム情報や遺伝子情報とあわせてエピゲノム情報を取得しその機能を明らかにしていくことは重要である。しかしながら DNA 化学修飾を観測する技術的な難しさのために、エピゲノムの研究例はごく一部の分離培養株に限られており、他の大半の分離培養株はもとより、環境中の微生物叢の大半を占める未培養系統が持つエピゲノムについては研究が進んでいない。本研究ではメタゲノム解析とエピゲノム解析を組み合わせた「メタエピゲノム解析」と呼ばれる非培養的手法を利用し、未培養系統が優占する海洋環境を対象に、微生物叢が持つ DNA 化学修飾を大規模に解析した (図 1)。

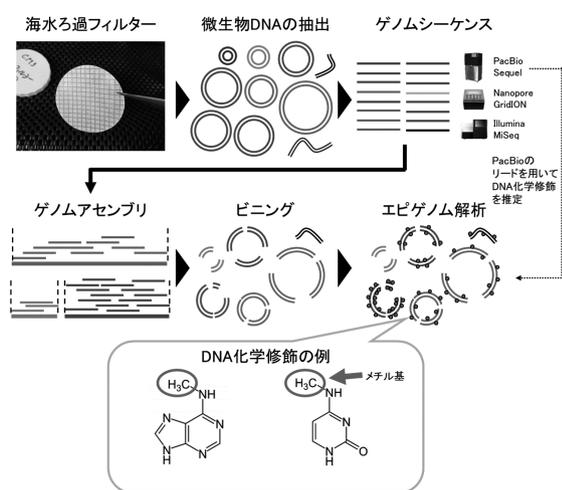


図 1 メタエピゲノム解析の概要。画像素材として、Togo Picture Gallery (© 2016 DBCLS TogoTV) を利用。

【方法】2019年9月、海洋研究開発機構の海底広域研究船「かいめい」を用いて房総半島沖合50kmの海域から大量採水とフィルター濾過を行い、表層5mから深層300mに至る4層の微生物試料を採取した。この試料を対象に、PacBio Sequel, Nanopore GridION, Illumina MiSeqの3種類のシーケンサーを用いたショットガンシーケンスを行い、配列データを取得した。そして各種のバイオインフォマティクス解析から233の原核生物の

ドラフトゲノム (P-MAG) と 163 の二本鎖 DNA ウィルスのドラフトゲノム (V-MAG) を取得し、PacBio のリードを利用してこれらゲノム上の DNA 化学修飾の検出と修飾モチーフの予測を行った。さらに DNA 化学修飾酵素遺伝子を探索し、モチーフと酵素の対応関係を予想した。特に新規性が高いと予想された酵素については、人工遺伝子合成と大腸菌を用いた異種発現系と、制限酵素を用いた認識モチーフのアッセイ系から、酵素活性の性質を測定した。

【結果・考察】微生物ゲノム上から、新規のものを数多く含む計 220 の多様な修飾モチーフを発見した。興味深いことに、系統的に近いゲノム間でも大きく異なるエピゲノムを持つ場合もあれば、比較的遠い系統内でも高度に類似したエピゲノムを持つ系統群、DNA 化学修飾が全く検出されない系統群など、さまざまなパターンが観察された。この結果は、各微生物系統群においてエピゲノムが持つ役割が異なっており、エピゲノムが生理生態と密接にリンクしていることを予想させるものである。

次に DNA メチル化修飾に着目して解析したところ、計 276 の DNA メチル化酵素 (MTase) 遺伝子が予測された。そして大腸菌を用いた *in vivo* の実験や、分離精製した酵素を用いた *in vitro* の実験などから、5つの新規モチーフを特異的に認識する酵素を含む、計 11 の MTase 酵素を新規に同定した。

さらに海洋中に最も多く存在する微生物系統群である Alphaproteobacteria 綱に着目してより詳細なゲノム解析を行ったところ、この系統群では進化の途中で DNA メチル化酵素の認識モチーフが変化し、その変化にあわせてゲノム全体の塩基出現パターンも変化していることを見出した。このことはエピゲノムとゲノムが共進化してきたことを示唆する、興味深い結果である。

本研究は今日まで解析対象とされてこなかった海洋細菌叢・ウィルス叢が持つエピゲノムを大規模に解析し、多様な未知の DNA 化学修飾モチーフの存在を明らかにしたとともに、エピゲノムが海洋微生物の生態や進化に広範な影響を与えている可能性を示した初の成果である。今後、深海堆積物や陸上環境などの幅広い微生物叢を対象に解析を実施し知見を積み重ねていくことで、微生物が持つエピゲノムへの理解が深まることが期待される。(Hiraoka *et al.*, *Nucleic Acids Research.*, 2022)

病原性染色体による宿主特異性の決定・分化機構の解明

鮎川 侑

【目的】 土壌病原菌 *Fusarium oxysporum* は、100 種以上の植物に対して病原性を示すものの、菌株によって宿主が異なるため、各菌株は宿主植物に基づいて分化型に区別される。いくつかの分化型から、生存に必須でないが病原性に必要な染色体（病原性染色体）が特定され、病原性染色体が宿主決定に関与すると考えられている。しかしながら、病原性染色体に座乗する宿主決定遺伝子は特定されていない。本研究では、シロイヌナズナに病原性を示す分化型であるキャベツ萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*) Cong:1-1 の病原性染色体、および宿主決定遺伝子の特定を試みた。

【方法】 Cong:1-1 野生株 (WT) から作出されたハイグロマイシン B 耐性の *SIX4* 破壊株 ($\Delta SIX4$) に、紡錘糸形成阻害剤ベノミルを処理することで染色体異常を誘導後、ハイグロマイシン B 感受性株を選抜し、病原性染色体喪失候補株とした。病原性染色体喪失候補株のゲノムシーケンスを行い、得られたリードを WT のゲノムにマッピングし、喪失したゲノム領域を特定した。病原性染色体喪失候補株の病原性を調査するために、シロイヌナズナ Col-0 WT および、アブラナ科植物特有のトリプトファン由来の生体防御物質を合成できない *cyp79b2/b3* 二重変異株に接種した。病原性染色体喪失候補株が欠失したゲノム領域上のエフェクター候補遺伝子の発現を確認するために、シロイヌナズナ感染時の遺伝子発現解析を行った。喪失したゲノム領域に座乗するエフェクター候補遺伝子の中から、感染時に高発現した遺伝子を、病原性染色体喪失候補株に導入し病原性が復帰するか調査した。

【結果・考察】 $\Delta SIX4$ にベノミルを処理し、ハイグロマイシン B 感受性株 HS5 を得た。HS5 の全ゲノムシーケンスを行い、得られたリードを WT のゲノムにマッピングしたところ、いくつかのゲノム領域が喪失していることを確認した。HS5 の病原性を調査するために、シロイヌナズナを用いた接種試験を行った。その結果、HS5 のシロイヌナズナに対する病原性は、親株と比較して低下した (図 1a)。一方で、*cyp79b2/b3* 二重変異株を用いて接種試験を行ったところ、HS5 は病原性を示した (図 1b)。これらの結果から、HS5 が失ったゲノム領域には CYP79B2/B3 依存的な免疫抑制に必要な遺伝子が存在することが示唆された。HS5 が失ったゲノム領域から病原性遺伝子を特定するために、シロイヌナズナ感染時

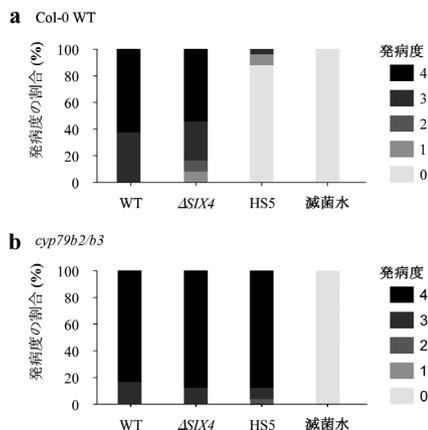


図 1 シロイヌナズナに対する HS5 の病原性

のトランスクリプトーム解析を行い、HS5 が失ったゲノム領域上で高発現する 2 つのエフェクター候補遺伝子を見出した。2 つのエフェクター候補遺伝子のうちの 1 つはトマトに感染する分化型から同定された *SIX8* の相動遺伝子であった。もう一方の遺伝子は未知遺伝子 (*PSE1* と命名) であり、Cong:1-1 のゲノム塩基配列上で *SIX8* の近傍に位置した (図 2a)。そこで、両遺伝子を HS5 に導入した形質転換体 HS5+*SIX8*-*PSE1* を作出した。当該形質転換体をシロイヌナズナに接種したところ、シロイヌナズナに対して病原性を示した (図 2b)。*SIX8* または *PSE1* いずれかの導入では、HS5 の病原性は復帰しなかった (図 2b)。以上より、キャベツ萎黄病菌の宿主決定には、*SIX8* および *PSE1* による、CYP79B2/B3 を介した宿主免疫の抑圧を要することが示唆された。

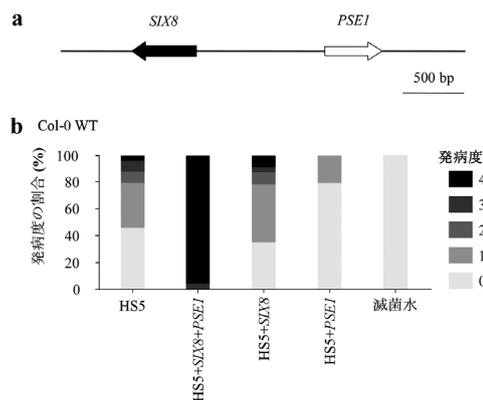


図 2 *SIX8*-*PSE1* 導入による HS5 の病原性への影響

大腸菌の外膜品質管理に関わる2機能性タンパク質 BepA の 基質認識・選別機構の解明

宮崎 亮次

【目的】 グラム陰性細菌の外膜は、抗生物質や化学物質等に対する防御障壁として細胞生存に重要な役割を持つ。大腸菌の BepA は、外膜機能維持に関与する2機能性のプロテアーゼであり、生育に必須の外膜タンパク質 LptD の分解だけでなく外膜へのアセンブリーに働く。LptD は、外膜に輸送されたリポ多糖の組込みに関わる因子である。BepA は外膜タンパク質の膜組込み装置 BAM 複合体近傍で、成熟途上の LptD と相互作用し、通常時は分子シャペロン様機能により LptD 成熟化（フォールディングとアセンブリー）を促進する一方で、成熟化過程で蓄積した異常な LptD 成熟中間体は分解・除去する（図1）。しかしながら、BepA が正常な LptD と異常な LptD のそれぞれを認識し、選別する機構は明らかではない。本研究では、その分子機構の解明を目的とする。

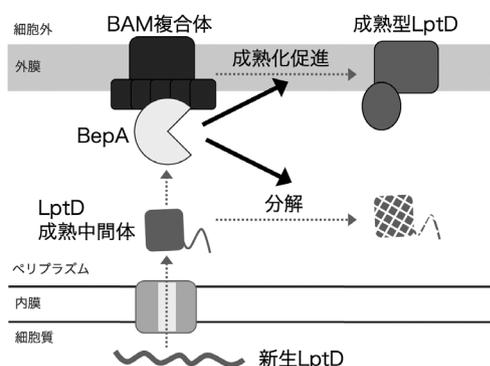


図1 LptD 成熟化促進と分解に働く BepA プロテアーゼ

【方法】 BepA による LptD の成熟化促進・分解における基質認識・選別には、そのプロテアーゼ活性部位領域が関与することが示唆される。一方、BepA 結晶構造では、この領域は通常は分子内部に深く埋もれており、基質を認識するには露出される必要がある。また、LptD は BepA よりも大きな最終構造を取るため、BepA 活性部位に提示される際には、部分的にそれとは異なる「中間体構造」を取ると推測される。それらを検証し、BepA が基質を認識し、選択的に異なる経路へと導く機構を明らかにするために、*in vivo* 光架橋解析を中心とした解析により細胞内での BepA と LptD 成熟中間体の相互作用様式をアミノ酸レベルの高空間分解能で解析した。

【結果・考察】 最初に、BepA の LptD 認識部位の同定を

試みた。BepA のプロテアーゼ活性部位近傍の分子内部には、edge-strand と呼ばれる保存された β -strand 領域がある。この領域に着目した変異解析により、この領域が LptD の分解だけでなく成熟化促進にも重要な役割を果たすことを見出した。加えて、光架橋解析により、この領域が LptD と直接相互作用することを示した。これらの結果から、BepA の edge-strand が LptD の選別に重要な役割を果たすことが示された。

また、BepA と相互作用する際の LptD 成熟中間体の構造状態を明らかにするために、LptD 全領域を対象とした系統的な光架橋解析を行なった。その結果、LptD の β バレルドメインの N 末端側領域に BepA の近接部位が集中していること、その一部が BepA の edge-strand と直接相互作用することを見出した。同定した LptD の BepA 相互作用部位を、成熟後の LptD β バレル構造にマップすると、それらはバレル構造の内側、外側の両方に向いていたことから、BepA と相互作用する際には、そのような高次構造を形成していないと推測される。

さらに、詳細な架橋解析から、LptD 成熟中間体が BepA と相互作用すると同時に、 β バレルドメインの C 末端側領域が BAM 複合体の基質認識に関わる構成因子 BamA、BamD と相互作用することを示した。この結果は、BepA が BAM 複合体上で外膜に組み込まれている途上の LptD 成熟中間体と相互作用することを強く示唆する（図2）。このように BepA が外膜に組み込み途上の LptD 成熟中間体と相互作用することで、LptD は以降の成熟化に適した構造状態が安定化され、その結果として BepA は LptD の成熟化を促進しているのかもしれない。また、このステップで BAM 複合体上に異常停滞した LptD は BepA により分解・除去されると考えられる。

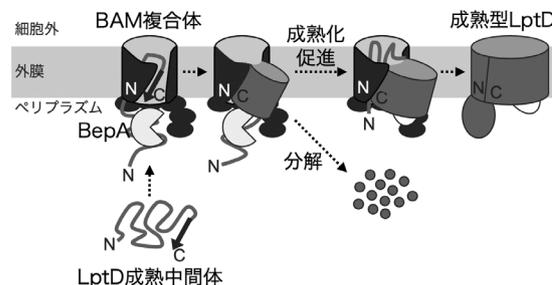


図2 BepA と LptD 成熟中間体の相互作用モデル

DPANN 群に属する新奇アーキアの共生機構の解明

酒井博之

【目的】近年、培養を介さないメタゲノム DNA 解析により、DPANN 群と呼ばれる未知のアーキアが、水圏から動物の体内まで、極めて多様な自然環境中に生息することが明らかとなった。DPANN 群は、地球上のアーキア多様性の約半分を占める生物群であり、進化的に最も古い起源を持つアーキアであることが示唆されている。最大の特徴は、細胞およびゲノムが非常に小さく、中央代謝に関わる多くの遺伝子を持たない点である（例：TCA 回路/解糖系/糖新生など）。そのため DPANN アーキアは、他種微生物（宿主）の代謝に依存して増殖する寄生性アーキアだと考えられている。また、DPANN アーキアは宿主の活動・代謝に影響を与えることで生物地球化学的物質循環にも大きく寄与する可能性が示唆されている。以上のことは、DPANN アーキアの生理生態を理解することが、地球規模での微生物生態系、生物の初期進化、更には生物地球化学的物質循環を理解する上で重要な要素であることを示している。しかし、培養成功例が数例しかないため、本群の生理生態はほとんど未知である。報告者は、本群に属する新奇アーキア（ARM-1 株）を、単一の宿主（*Metallosphaera* sp. AS-7 株）と共に培養することに成功した。本研究では、ARM-1 株の共生機構を理解するため、培養実験に基づく増殖特性の解析、蛍光顕微鏡観察、電子顕微鏡観察、及びゲノム解析を実施した。

【方法】宿主 *Metallosphaera* sp. AS-7 株との共培養下における ARM-1 株の増殖特性（生育温度・pH 範囲、炭素源利用性、独立栄養性など）を定量 PCR 法により明らかにした。共培養液から抽出した DNA を Illumina MiSeq および PacBio RS II シークエンサーに供し、ショットガンゲノムシークエンシングを実施した。塩基配列断片データを Unicycler によりアセンブリ後、PROKKA、DFAST、及び RAST を用いて遺伝子情報を付与した。全遺伝子情報に基づき ARM-1 株の代謝経路を推定した。蛍光顕微鏡観察、透過型及び走査型電子顕微鏡観察により、ARM-1 株の細胞形態を明らかにすると共に、宿主との細胞間相互作用について調査した。

【結果・考察】ARM-1 株の生育温度範囲は 50–75℃、生育 pH 範囲は 1.5–4.5 であった。本株は炭素源として酵母エキス、ペプトン、トリプトン、カザミノ酸、グルコース、またはスクロースを含む有機培地、更には有機物の代わりに元素硫黄や黄鉄鉱を加えた無機培地でも増殖した。ARM-1 株の増殖は宿主の増殖後に遅れて開始し、

多くの場合、宿主の増殖が停止すると ARM-1 株も増殖を停止した。このことは、活発に増殖している宿主細胞が ARM-1 株の増殖に重要であることを強く示唆している。純粋培養系と共培養系における宿主の増殖を比較すると、共培養系では誘導期が 1 日長く、最終細胞密度も約 2 分の 1 となった。ARM-1 株は 814,439 bp のゲノムを有し、完全な TCA 回路を持つ一方で解糖系/糖新生、核酸/アミノ酸/ビタミンの生合成に関わる多くの遺伝子を欠如していた。そのため ARM-1 株は、これらの代謝を宿主に依存して増殖していると考えられた。蛍光顕微鏡観察の結果、ARM-1 株は直径 0.5 μm 未満の極小細胞を持ち、直径 1–2 μm の宿主細胞とは明確に区別された。対数期には多くの ARM-1 細胞が宿主細胞に張り付いていた一方で（図 1）、定常期には多くの ARM-1 細胞が宿主から離れていた。このことから ARM-1 株は、宿主細胞に張り付いている際に栄養素を受け取り増殖し、増殖後には宿主細胞から離れる生活環を持つことが示唆された。電子顕微鏡観察の結果、ARM-1 株と宿主の細胞間に繊維状構造物が確認され（図 1）、この構造物を利用して物質の授受を行っている可能性が示唆された。また、メンブレンベシクル（MV）様の構造物も確認された（図 1）。好熱好酸性アーキアが産生する MV にはタンパク質や DNA が含まれており、窒素・炭素源となる可能性が報告されている。そのため、この MV 様構造物が、アミノ酸、核酸、窒素源、及び炭素源等の供給源となっている可能性が示唆された。本研究により、ARM-1 株の増殖には活発に増殖する宿主細胞が重要であること、ARM-1 株は解糖系/糖新生、及び核酸/アミノ酸/ビタミンの生合成を宿主に依存していること、繊維状構造物を用いて物質の授受を行っている可能性があること、MV 様構造物がアミノ酸、核酸、窒素源、及び炭素源等の供給源となっている可能性があることが確認された。

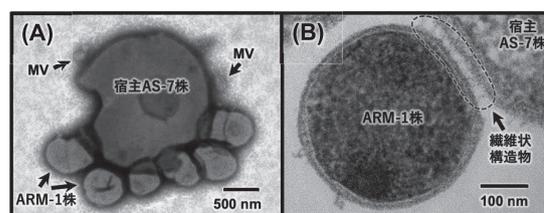


図 1 ARM-1 株の電子顕微鏡写真。A: ネガティブ染色法、B: 超薄切片法、MV: メンブレンベシクル様構造物。

発酵研究所助成研究報告集 第36号【非売品】

2022年12月10日 印刷

2022年12月20日 発行

編集委員長 左子芳彦
編集委員 松下一信, 原山重明, 古川謙介
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