

NUMBER 37

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2023

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 37



2 0 2 3

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	五十嵐泰夫 太田 寛行 笹川 千尋 園元 謙二 土屋 英子	大島 敏久 北本 勝ひこ 関 達治 武田 京子 中山 浩次

目 次

巻頭言	古川 謙介	1
■ 2021年度大型研究助成		
始原的呼吸経路を繋ぐ一酸化炭素酸化菌コレクションの構築とその応用基盤	吉田 天士	3
タイムラプス・シングルセル発現解析の開発による分裂酵母孢子の休眠と発芽の分子機構	佐藤 政充	19
比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出されたHost-jump現象の分子基盤の解明	田淵 光昭	25
遺伝子組換え大腸菌が生産する新規な膜小胞の解析と有用物質分泌生産への応用	尾島 由紘	43
新規分析法によるセリンラセマーゼ生産菌の網羅的探索とこのラセマーゼによるD-セリン高効率生産の研究	金内 誠	55
■ 2017年度寄付講座助成		
生物間相互作用解析を基軸にした糸状菌の潜在機能の開拓と利用		
生物間相互作用解析を基軸にした糸状菌の潜在機能の開拓と利用	萩原 大祐	67
糸状菌に感染するマイコウイルスの多様性解析	浦山 俊一, 萩原 大祐	75
マイコウイルスが宿主糸状菌にもたらす作用の網羅解析	浦山 俊一, 萩原 大祐	87
マイコウイルスによる糸状菌二次代謝の誘導	浦山 俊一, 萩原 大祐	101
糸状菌間相互作用による抗生物質ジフェニルエーテル類の産生誘導	浦山 俊一, 萩原 大祐	111

■ 2021年度一般研究助成

<i>Gallionellaceae</i> 科微好気性鉄酸化細菌の分離と特性の解明	渡邊 健史	125
深海底に沈む木材等をニッチとした深海生菌類の多様性解明	長野由梨子	126
土壌に特異的に優占する難培養細菌門アシドバクテリアの バイオリソース拡充	伊藤 英臣	127
各種胆汁酸分子の発芽誘導能を用いた難培養性腸内細菌の分離と 日本人腸内細菌叢カクテルの創製	中山 二郎	128
地衣類チャシブゴケ属の新しい分類体系構築に向けた試み	橋本 陽	129
土壌微生物が産生する揮発性有機化合物 (VOCs) の 網羅的解析による土壌の微生物性評価法の開発	池永 誠	130
ワイン発酵におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用展開	西村 明	131
病原細菌のインフラマソーム活性化因子の同定と応用	原 英樹	132
幅広い単細胞生物のイオンチャネルの構造と機能から 根源的な情報伝達手段であるイオン透過の成り立ちに迫る	入江 克雅	133
真核微生物の細胞表層糖鎖マーカーとしての 酸性糖鎖の選別機構と生理的役割の解明	竹川 薫	134
スピルリナ強光培養時に確認されたアルカリバチルス の出現メカニズムの解析	渡辺 智	135
ビフィズス菌のヒト腸管共生・相互作用因子の構造生物学的解析	伏信 進矢	136
環境メタゲノムから発見した新規な遺伝子発現調節機構の解明と 生理学的意義	末永 光	137
ストレス検知の場としてのオルガネラ膜： 細胞内膜の相分離を利用した細胞成長調節システムの分子基盤	松浦 彰	138
多細胞システムの機械受容シグナル伝達機構に関わる複数イオンの解明	森本 雄祐	139
出芽酵母可視化スクリーニングによる活性化ステロール 分布領域制御因子の特定と制御機構の解明	岸本 拓磨	140
グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明	千葉 志信	141
土壌中での環境適応を標的とした防除技術開発を指向した、 青枯病菌のシデロフォア産生機構の解明	曳地 康史	142
酵母の細胞質局在型センサーによる新奇高浸透圧感知機構の解明	館林 和夫	143

ビタミン B ₆ の生体内恒常性維持機構の解明	伊藤 智和	144
トリコテセン系かび毒生合成制御の分子機構	木村 真	145
細菌の宿主定着能獲得や病原性獲得への進化のメカニズムの解明	坂本 啓	146
分岐鎖アルコール認識機構とその生理的意義の解明	黒田 浩一	147
祖先型硫黄酸化経路の鍵となる未知酵素の同定	渡邊 友浩	148
ビスフェノール S 分解微生物系の人工構築と生物処理への応用	武尾 正弘	149
ATP-grasp リガーゼにより修飾される新規ペプチドの異宿主生産	小谷 真也	150
プラスチック廃棄物の微生物分解の効率化を目指した 生化学・工学的アプローチ	渡邊 崇人	151
病原微生物の侵襲進化の解明と新規天然物の探索	荒井 緑	152
ヒト病原性真菌の内在性ストレス応答機構を活用した 神経変性疾患治療薬開発のための新規戦略	小菅 康弘	153
細菌性血管新生因子 BafA の社会実装を目指した 高活性オルソログ探索ならびに活性部位の特定	塚本健太郎	154
黄麹菌における光遺伝学的手法を用いたメンブレンレスオルガネラ 形成による有用物質生産	樋口裕次郎	155
嫌気性ベンゼン分解菌の分解力を引き出す： 「本当に現場で分解する」菌を目指して	水口 千穂	156
ニトリルゴムのバイオリサイクル法の開発	杉森 大助	157
ポリエチレンテレフタレート分解微生物・酵素の探索	飯塚 怜	158
水環境中の多様な捕食性細菌による捕食特性の解明と その持続的なウキクサバイオマス高効率生産への応用	井上 大介	159
<i>Aureobasidium pullulans</i> の細胞壁構造から超高分子 β -グルカンの 分泌機構を学ぶ	東 雅之	160
α -アミノ酸の二量化による有用芳香族複素環化合物の創製	梶尾 俊介	161
腸内細菌が産生する芳香族アミノ酸による腸管病原菌の感染制御	西山 啓太	162
日本人の腸内に特有な酢酸生成菌の多様性解析および新規分離株の取得	山田 千早	163
国内における外生菌根性担子菌類 <i>Tomentella</i> 属の分類学的研究と 分離培養法の確立による菌株拡充	早乙女 梢	164

細菌のセカンダリータンパク質分泌モーター SecDF の 活性化状態構造の基盤	塚崎 智也	165
出芽酵母におけるリボソーム品質管理の分子機構	北畠 真	166
植物病原細菌が感染植物組織中に形成するバイオフィーム高次構造と 植物病原性との相関解析	別役 重之	167
氷河微生物の地球規模での地域比較と寒冷適応戦略の解明	瀬川 高弘	168
適応育種的変異を利用した酢酸菌セルロース合成酵素変異体の 作成とそのセルロース合成能の解析	松谷峰之介	169

■ 2021年度若手研究者助成

医療施設で分離される <i>P. putida</i> グループ新菌種の分類と サブグループ形成関連因子の検索	遠矢 真理	171
同型配偶子生殖を行う単細胞性緑藻クラミドモナスを用いた 葉緑体母性遺伝の分子機構の解析	小林 優介	172
遊離脂肪酸を介した細菌間コミュニケーションによる 環境応答機構の解明	神保 晴彦	173
地衣化菌が共生藻を認識する仕組みに関する研究	升本 宙	174
盗葉緑体生物群から探る葉緑体獲得進化の共通原理の解明	大沼 亮	175
植物病原細菌の感染プロセスに重要なホスファチジルコリン 生合成機構の構造基盤解明	渡邊 康紀	176
マウス腸内細菌におけるゲノム進化速度の解明	高安 伶奈	177

■ 2021年度学会・研究部会助成

日本微生物資源学会における微生物分類学に関する支援活動	大熊 盛也	179
公益社団法人 日本生物工学会 未培養微生物（微生物ダークマター） 資源工学研究部会の研究推進活動について	青柳 秀紀	183

巻 頭 言

古 川 謙 介*

発酵研究所（IFO）は1944年、12月、武田薬品(株)の附属機関として設立されました。来年で80周年を迎えます（IFOの歴史、活動内容は中濱理事長により生物工学会誌（2015年3号）に記述されています）。IFO Research Communicationは、本号で37巻になります。助成研究が始まったのが2003年、微生物の最先端の研究が多く掲載されるようになりました。助成研究報告会はコロナ禍でこの数年中止を余儀なくされ、また、オンラインでの開催となりましたが、本年は4年ぶりの対面開催となりました。この巻頭言の場をお借りして2つの提案をしたいと思います。一つは微生物を一般の人々、特に子供たちに正しく知ってもらうこと、もう一つは微生物の専門家がこれからの微生物学を大胆に展望することです。

一般の人々にとって微生物はペスト菌、コレラ菌、結核菌、チフス菌、O157大腸菌、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、そして新型コロナウイルスなどの病気を起こす悪しき“いきもの”を連想するようです。2019年12月年発生した新型コロナウイルス（COVID-19）による感染症は瞬く間に世界中に広まり、人口の10%近くが感染、七百万人以上の死者が出たと言われています。つまり微生物はバイ菌との認識であり、除菌、抗菌グッズも多く出回っています。

専門家の皆様には釈迦に説法ではありますが、微生物が演じている「ものづくり」と「環境浄化・保全」を世間にもっとPRする必要があります。特に小中学生、高校生を対象とした微生物教育が必要であろうと思います。クワガタ虫やカブト虫など昆虫の好きな子供は（大人も）沢山いますが、微生物をバイ菌として捉えている子供が大半でしょう。微生物を正しく理解するための絵本、漫画、アニメはあるのでしょうか。グーグルで調べてみると微生物図鑑など数冊は出版されているようです。記憶に残るのは20年ほど前に漫画「もやしもん」（石川雅之作）でしょう。これは肉眼で菌をみることのできる主人公を中心に菌・ウイルスに関わる農業大学の学園ドラマを描いたものです。発行部数は800万部を超えた人気漫画でした。久しぶりに本棚から引っ張り出して斜め読みをしました。日本酒製造などに関わる細菌、酵母、カビなどが全編を通して出てきますが、微生物が主役ではありません。漫画（アニメ）家と微生物専門家が共同して面白くてためになる子供向けの漫画、アニメを制作したら如何でしょうか。

一方で微生物を専門とする研究者は、自身の取り扱っている微生物についてはその形態、機能を詳細に明らかにすべく奮闘されています。しかし、自分の専門以外の微生物について

*古川謙介
別府大学客員教授・九州大学名誉教授、公益財団法人発酵研究所理事

は余り関心がないように思われます。1970年、日本万国博覧会（大阪）の一環として開催されたタイムカプセル EXPO'70 事業をご存じの方も多いかと思います。特殊ステンレス鋼を材料にした球状のカプセル容器（内径1m）に、2,098点の物品と記録が収納されました。その中には大腸菌、サルモネラ菌、枯草菌、アミノ酸発酵菌、抗生物質生産菌などの細菌、麹カビ、青カビ、椎茸の胞子、土壌中の雑菌など、そしてファージ、DNA、RNAが納められましたが、IFOもこの事業に関与しました。二つのカプセルが1971年、大阪城公園本丸跡の地下15mに埋設されました。一つ目のカプセルは2000年に開封されましたが、その後100年ごとに開封される予定です。二つ目のカプセルは5000年後の西暦6970年に開封される予定です。5000年後に人類が存在している保証はありませんが、夢多き事業だと思います。このタイムカプセル Expo'70 にあやかって、5000年はともかく、これからの80年間の微生物学の発展を予想してみませんか。そして、それを書き留めてIFOに保管し、80年後に開示し、検証しては如何でしょうか。

恥ずかしながら、浅学非才な筆者の微生物への妄想・希望を思いつくまま記しておきます。

- 微生物を主体とした食品がでまわる
- 病害菌の毒性を無くした有用菌が開発される
- 自然環境を模した培養系ができる
- 高性能光合成シアノバクテリアが開発される
- 微生物ゲノム上のほとんどの遺伝子機能がわかる
- 超好熱菌の好熱性のからくりが解明される
- 貧栄養細菌の貧栄養性のからくりが解明される
- 生物界の第4のドメインができる、あるいは生物界はシームレスとなる
- 化学合成により自立増殖できるバクテリアができる？これは神の領域としてできない方が
良いかもしれません。

80年後、予想した人の何人の方が生存しているか？？ですが、記録は残り、21世紀の微生物学がどのように展開されたか、検証されることでしょう。

2021 年度大型研究助成の研究報告

助成期間：2021 年 4 月～2023 年 3 月

始原的呼吸経路を繋ぐ一酸化炭素酸化菌コレクションの構築とその応用基盤

吉 田 天 士

京都大学農学研究科

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Construction of culture collection and application base of carbon monoxide-oxidizing bacteria that have inherited primitive respiratory pathways

Takashi Yoshida

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo, Kyoto 606-8502

Hydrogenogenic carbon monoxide (CO)-oxidizing bacteria (hereafter referred to as CO-oxidizing bacteria) conserve energy using an anaerobic CO dehydrogenase containing Ni (Ni-CODH) and hydrogen-producing hydrogenase (ECH). In this study, we promoted the exploration and isolation of undescribed microbial species by using the established enrichment culture method in which the gas phase is replaced by CO to expand the culture strain collection as a genetic resource. *Parageobacillus* sp. strain G301 was successfully isolated from the sediment of Unagi-ike Lake in Kagoshima Prefecture, Japan, and closely related to *Parageobacillus toebii*, which lacks CODH/ECH. Furthermore, the genome of strain G301 encoded a gene cluster for aerobic CODH containing Mo (Mo-CODH). Culture experiments demonstrated that the strain enabled both hydrogenic anaerobic and aerobic CO oxidation, which had not been previously reported. We also obtained a CO oxidizing bacterial isolate of *Thermolongibacillus altinsuensis* which has not been reported to be capable of CO oxidation, from a sediment sample from the bottom of Lake Biwa. A comprehensive search in public metagenomes showed that Ni-CODH was distributed in a wide range of prokaryotes spanning 55 bacterial and 11 archaeal phyla. Although Ni-CODH is a universal enzyme that exists in a wide variety of microbiome, including aquatic environments such as oceans, artificial environments, and mammalian microflora including humans, Ni-CODH responsible for hydrogenogenic CO oxidation was rarely found in the metagenomic data, suggesting the importance of the isolation and cultivation. We also found an acetyl CoA production pathway, in which Ni-CODH is a key enzyme, in heterotrophic, human gut-derived enterobacteria, and expanded the genomic database of potential aerobic marine CO-oxidizing bacteria in the ocean. These results in this study could expand our knowledge on Ni-CODH and CO oxidizers and are expected to provide a basis not only for utilization as a genetic resource, but also for elucidating unprecedented metabolisms of CO-oxidizing bacteria and their ecological functions on the surrounding environment.

Key words: hydrogenogenic carbon monoxide-oxidizing bacteria, carbon monoxide dehydrogenase, *Parageobacillus*, enrichment culture, metagenome

緒 言

一酸化炭素 (CO) は、人間や微生物を含むさまざまな生物にとって有毒なガスである。大気中における CO 濃度は 0.06 ~ 0.15 ppm と微量であるが、その総排出量

は、年間 2000 ~ 3000 Tg に達し、その半分は人為起源である (Khalil & Rasmussen, 1990)。残りの半分は、火山、淡水、海洋、陸域での自然の化学プロセス (例: 有機物の光化学的および熱化学的分解) および生物学的プロセス (例: 微生物、葉、根、動物による生成) による (Fukuyama *et al.*, 2020)。一方、CO/CO₂ 間の酸化還元反応は、生物圏で利用可能な無機化合物の反応の中で最も酸化還元電位が低い反応の 1 つである ($E^0 = 520 \text{ mV}$, $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$)。そのため CO 酸化は、フェ

E-mail: yoshida.takashi.7a@kyoto-u.ac.jp

共同研究者: 神川龍馬 (京都大学農学研究科)

井上真男 (立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構)

レドキシンのような電子伝達体を含むさまざまな電子受容体の還元と共役できる (CO 代謝). 1991 年にロシアのグループにより, CO を酸化し水素を生産する好熱性偏性嫌気性菌 (以下 CO 酸化菌とする) が初めて分離され, 以来 37 株 (5 門, 20 属, 32 種) が記載されている (Fukuyama *et al.*, 2020). CO は有毒ガスであり, 水素は無酸素環境における多くの微生物にとって重要なエネルギー源であるため, 環境中の CO 酸化菌は重要な「CO スカベンジャー」であるとともに一次生産者であると考えられている (Fukuyama *et al.*, 2020). その CO 代謝において, 鍵酵素であるニッケル含有 CO デヒドロゲナーゼ (Ni-CODH) が中心的な役割を担っており, Ni-CODH はその種類によって呼吸や炭酸固定と多岐に渡る代謝に寄与する. 多くの場合, CO 酸化菌は複数の Ni-CODH 遺伝子を保有し, その一つと同一遺伝子クラスター上にコードされるヒドロゲナーゼ (ECH) が複合体を形成し, CO 酸化と水素生成を共役させることでエネルギー獲得を行う. Ni-CODH/ECH 複合体は, NAD(P)H を電子伝達体として利用せず, 最終電子受容体として水さえあればよいから, そのエネルギー保存様式は電子伝達系のような他のエネルギー保存メカニズムと比較して非常に単純で始原的である (Fukuyama *et al.*, 2020).

水素は石油や天然ガスと比べてエネルギー効率がよく, 次世代エネルギーとして期待されている. 現在, 水素は天然ガスやバイオマス等を希少金属触媒下で約 900°C でガス化することで生じる CO を含む合成ガスから生産されるが (Ragauskas *et al.*, 2006), CO により金属触媒が劣化する問題点を有する. CO 酸化菌が有する Ni-CODH は熱安定性が高く (~70°C), CO 酸化反応の速度定数 k_{cat} は ~40,000 s⁻¹ と非常に大きく, k_{cat}/K_m も ~10⁹ M⁻¹s⁻¹ と拡散律速に近い. そのため CO 酸化菌は CO を除去し高効率に水素を生成する微生物触媒となりうる. 一方, CO はエネルギーとして利用可能なメタノールやメタンといった C1 化合物を合成するための重要な前駆物質でもある (Ragauskas *et al.*, 2006). 現在, CO₂ の還元による CO 生産手法として $CO_2 + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons CO + H_2O$ の可逆反応を行なう Ni-CODH が新規触媒として注目されている. Ni-CODH が触媒する CO₂ 還元反応は熱力学的な障壁があるため, Ni-CODH を酸化チタン等で光触媒化することで光エネルギーを利用して CO₂ を還元するモデル研究が行われてきた (Parkin *et al.*, 2007; Woolerton *et al.*, 2010).

このような背景のもと, 申請者らは気相を CO に置換した独立栄養培地を用いて海洋熱水環境試料を集積培養することにより複数の CO 酸化菌を探索してきた. その結果, トカラ列島鬼界カルデラの海底コアサンプルより新属新種の *Calderihabitans maritimus* KKC1 株 (以下,

KKC1 株) (Yoneda *et al.*, 2013) を, 鹿児島県鰻温泉より新種 *Carboxydotherrmus pertinax* Ug1 株 (以下 Ug1 株) (Yoneda *et al.*, 2012) を分離することに成功した. これらの環境における密度は低く, CO 酸化菌が中温環境で活動するかどうかは不明のままである. 一方, 以前の研究で示されているように CO 酸化菌分離株の多くは Bacillota に属し, 内生孢子形成能が本門細菌の広範な分布に寄与している可能性が指摘されている (Fukuyama *et al.*, 2020). 事実, 申請者らは鹿児島県錦江湾底泥より通性嫌気性, CO 酸化菌 *Parageobacillus thermoglucosidasius* TG4 (以下 TG4 株) を分離することに成功した (Inoue *et al.*, 2019b). このように CO 酸化菌の分布は, これまで考えられていたよりも広い可能性がある. さらに重要なことは, ほとんどの原核生物分離株では CO 酸化能力が検査されておらず, CO 酸化菌の多様性は過小評価されている可能性があり, CO 酸化菌の多様性と進化を理解するにはさらなる分離の取り組みが必要である. 本研究では, 世界的に先行する CO 集積培養法によって未記載種の分離探索を推進し, オミックス解析によって新規 CO 代謝を解明することで, 遺伝子資源としての培養株コレクションを拡充することを目的とした. さらに, Ni-CODH 大量発現系および通性嫌気性 CO 酸化菌における Ni-CODH ノックアウト技術を用いた水素生産微生物触媒の開発に向け, メタゲノムデータベース上の未利用 Ni-CODH 遺伝子の多様性解析を行った.

実験方法

サンプリング

淡水堆積物試料は, 静岡県慈雲寺温泉 (34°38'54"N, 138°52'00"E) にて 2015 年 1 月に, 鹿児島県鰻温泉 (31°13'41"N, 130°36'47"E) にて 2012 年 12 月に, 琵琶湖調査定点 Ie-1 (35°12'58"N, 135°59'55"E) にて 2021 年 10 月に採取した. 特に, 琵琶湖では水深約 70m における湖底堆積物を琵琶湖調査船「はす」から不攪乱柱状採泥器にて採取した.

集積培養

CO 酸化菌の集積培養を目指し, 以下の通り行った. 培養には 180mm×18mm スクリューキャップ試験管 (IWAKI) を用い, 液相を 5mL, 気相を 26mL とした. 慈雲寺温泉堆積物および間隙水試料を 10% CO 90% N₂ 雰囲気下にて 65°C で静置した. 鰻温泉堆積物試料と琵琶湖堆積物試料は, B 培地 (Yoneda *et al.*, 2012), 20% CO 80% N₂ 雰囲気下にて, 65°C で静置した. 静置培養後の気相は熱伝導度型検出器付ガスクロマトグラフ (GC-2014 gas chromatograph, 島津製作所, 京都),

ShinCarbon ST packed column (信和化工, 京都) を用いて検査し, CO の減少と水素生成が検出されるまで集積培養を継続した。

分離

鰻温泉堆積物集積培養後の試料は, ポリペプトン, 酵母エキスおよび硫酸マグネシウム7水和物を主成分とした NBRC 802 寒天プレート培地 (Hachisuka *et al.*, 2022) にて塗抹培養に供し, 好氣的に 65°C で一晚静置培養した。形成された単一コロニーの分離により分離株 G301 を得て, 気相分析により CO 酸化能を確認した。16S rRNA 遺伝子の部分配列を標的とした BLASTn 検索により種を推定した。琵琶湖堆積物集積培養後の試料は, TGP 寒天プレート培地 (Cripps *et al.*, 2009) にて行い, 他の条件および作業内容は G301 株と同様とした。

メタゲノム解析

慈恩寺温泉集積培養試料からの DNA 抽出は, Extrap Soil DNA Kit Plus V2 (新日鐵住金, 東京) を用いて行った。300bp 長のペアエンドリードは MiSeq を用いたゲノムシーケンスにより得た。リードのアダプター除去とクオリティーフィルタリングは fastp V 0.20.1 (Chen *et al.*, 2018) を用いた。アッセンブルは MEGAHIT V 1.2.9 (Li *et al.*, 2016) を用いた。Burrows-Wheeler Aligner (BWA) V 0.7.17 (Li & Durbin, 2010) を用いてリードをアッセンブル配列にマップし, ピニングとその評価には MetaBAT2 V 2.12.1 (Kang *et al.*, 2019) と CheckM V 1.13 (Parks *et al.*, 2015) を用いた。アノテーションには DFAST v. 1.2.6 (Tanizawa *et al.*, 2018) を用いた。近縁ゲノムとの平均ゲノム相同性は pyani V 0.2.10 (Pritchard *et al.*, 2015) を用いて算出した。16S rRNA 遺伝子またはゲノムを用いた分子系統解析には MEGA-X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10 (Sudhir *et al.*, 2018) と GTDB-tk V1.7.0 (Chaumeil *et al.*, 2020) をそれぞれ用いた。

分離株のゲノム解析

G301 株のゲノム DNA は DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出した後, 解析に供した。300bp 長のメイトペアエンドリードは MiSeq を用いたゲノムシーケンスにより得た。リードのアダプター除去とクオリティーフィルタリングは Trimmomatic v. 0.3.6 (Bolger *et al.*, 2014) と NxTrim v. 0.4.1 (O'Connell *et al.*, 2015) を用いた。アッセンブルとその評価は SPAdes v. 3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012), Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v. 0.7.17 (Li & Durbin, 2010), SAMtools v. 0.1.19 (Li *et al.*, 2009), NxRepair

v. 0.13 (Murphy *et al.*, 2015) を用いた。アノテーションには DFAST v. 1.2.6 (Tanizawa *et al.*, 2018) を用いた。muscle v.3.8.31 (Edgar, 2004) および trimAl v. 1.4.1 (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) をもちいて, アラインメントデータを作成し, 分子系統解析は IQTREE v. 1.6.12 (Nguyen *et al.*, 2015) にて行った。PATRIC (Wattam *et al.*, 2017) を用いて代謝を予測し, Orthofinder (Emms & Kelly, 2019) を用いて同属細菌とゲノム中の遺伝子組成を比較した。

B1-1 株のゲノム DNA 抽出は G301 株と同様に行った。200bp 長ペアエンドリードは DNBSEQ-G400 (MGI Tech Co., Ltd.) によるゲノムシーケンスにより得た。リードのアダプター除去とクオリティーフィルタリングは Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014) にて行った。アッセンブルとアノテーションはそれぞれ SPAdes v3.15.4 (Bankevich *et al.*, 2012) と DFAST server v1.2.18 (Tanizawa *et al.*, 2018) を用いて行った。近縁ゲノムとの平均ゲノム相同性は JSpeciesWS (Richter *et al.*, 2016) を用いて算出した。

分離株の増殖生理実験

酸素および硝酸が存在しない条件下 (プロトン以外に電子受容体が存在しない) における, G301 株の CO の酸化能を調べるため, G301 株を硝酸非存在下の B 培地 (Yoneda *et al.*, 2012) を用い, N₂:CO (80:20) の雰囲気下にて 65°C で培養した。また, 硝酸存在下で同様に嫌氣的に培養し, CO の酸化能を調べた。加えて, 空気:CO (80:20) 雰囲気下にて同様に培養することで好氣的な CO の酸化能を調べた。いずれの場合も, コントロールとして CO を N₂ で置換した条件でも培養した。細胞収量および増殖速度の比較は Welch *t* 検定にて行った。硝酸存在下における嫌氣的な CO の酸化に関わる CODH を推定するため, Ni-CODH のみを有する *Parageobacillus thermoglucosidasius* NBRC 107763 株を上記と同様に培養し, CO の酸化能を調べた。

メタゲノムデータベース解析

相同性検索によって, MGnify メタゲノム由来タンパク質データベース (Richardson *et al.*, 2023) および NCBI データベース (Sayers *et al.*, 2022) から Ni-CODH 様配列を収集した。MGnify データベースには, 約 175,000 のサンプルを含む 3,500 以上のプロジェクトの解析データが含まれている (Richardson *et al.*, 2023)。90% のアミノ酸配列相同性でクラスタリングを行い, 分子系統解析を行った。これらの配列クラスターについて, MGnify から生物圏情報, ゲノムアセンブリから Ni-CODH の周辺遺伝子情報, さらに GTDB (Parks *et al.*, 2022) から

ゲノム情報に基づく分類群のアノテーションを行い、分子系統樹にこれら全ての情報を統合した。

ヒト腸内 CO 酸化菌の詳細な解析については、原核生物ゲノムデータベース HumGut より、上記と同様の手法で CODH 様配列を保持するゲノムを収集した。これらゲノムの宿主細菌の系統的特徴およびその CO 代謝経路を予測するために、GTDB-tk v2.1.1 および Mashree v1.2.0 (Katz *et al.*, 2019) を用いた系統解析、eggNOG-mapper v2.1.5 (Cantalapiedra *et al.*, 2021) による遺伝子アノテーション、および METABOLIC v4.0 (Zhou *et al.*, 2022) を用いた代謝解析を行った。

好氣的 CO 酸化菌の探索については、Ni-CODH と異なる系統に属し、酸素、硝酸、過塩素酸と共役した CO 酸化に用いられる Mo-CODH (King & Weber, 2007) を、NCBI RefSeq および海洋原核生物ゲノム (the OceanDNA MAG Catalog) (Nishimura & Yoshizawa, 2022) から相同性検索により収集し、アミノ酸配列相同性 90% でクラスタリングした。CO 酸化菌をゲノム相同性 95% でクラスタリングし、GTDB-tk v2.1.1 を用いて系統を予測した。

結果および考察

集積培養における新規 CO 酸化菌のゲノム解析

新規な CO 酸化菌の探索を目的とし、環境試料に CO を添加した集積培養とそれらに対するメタゲノム解析を行った。静岡県慈雲寺温泉から採取された堆積物試料に 10% CO を封入し、65°C で 5 日間静置培養した試料から抽出した DNA をメタゲノムシーケンスに供した後、metagenome assembled genomes (MAGs) を構築した結果、32 のクオリティーの高い MAG が得られた。そのうち 5 つの MAG から Ni-CODH 遺伝子が検出され、これらには CO 酸化菌に由来する MAG が含まれている可能性が考えられた (Table 1)。これら 5 つの CO 酸化菌候補 MAG のうち、2 つの MAG は、ゲノム配列が未報

告であるが一部の種から CO 酸化能が報告されている *Thermolithobacter* 属真正細菌であることが、両 MAG の 16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析によって明らかになった。別の 2 つの CO 酸化菌候補 MAG の 16S rRNA 遺伝子は、炭酸固定に関わる Ni-CODH を有することが知られる古細菌 *Geoglobus acetivorans* SBH6 と相同性 98.9% であったため、本種に近縁であると考えられた。一方で、これら 2 つの MAG と本種ゲノムとの ANI 値 (ゲノム間の相同性を示す) は、76 から 78% と種の閾値 95% よりも低く、*G. acetivorans* SBH6 と近縁な新規 CO 酸化菌であると考えられた。5 つ目の CO 酸化菌候補 MAG には 16S rRNA 遺伝子が含まれていなかったものの、CO 酸化能が報告されている真正細菌 *Desulfotomaculum kuznetsovii* DSM 6115 と ANI 値 が 96% 以上と種の閾値よりも高かったため、本種由来 MAG と考えられた。

特に、2 つの *Thermolithobacter* 属由来 MAG に含まれる Ni-CODH 遺伝子はそれぞれ 4 つの遺伝子クラスターを形成していた (Fig. 1)。遺伝子クラスターの一つは Ni-CODH の成熟因子遺伝子やヒドロゲナーゼ遺伝子を含んでおり、CO 酸化能を有すると考えられた。別の遺伝子クラスターは、アセチル CoA 合成酵素遺伝子を含んでいたため、炭酸固定に関与すると考えられた。その他 2 つの遺伝子クラスターにはそれぞれ、フェレドキシン様タンパク質遺伝子と NAD(P)H-亜硝酸還元酵素大サブユニット遺伝子、そしてシステイン合成酵素遺伝子とタウリン輸送 ATPase 遺伝子が含まれていたが、これらの生理学的機能は不明であった。他の MAG には、CO 酸化に関わる遺伝子クラスターが検出されなかった。

本研究により、CO 雰囲気下での集積培養により極めてクオリティーが高い CO 酸化菌 MAG の構築に成功した。すなわち本集積系は CO 酸化菌の選択培養に非常に効果的であり、分離培養株の確立に至らなくとも MAG を構築することでその系統や性状を明らかにすることが可能な基盤技術として極めて有用であることが示された。

Table 1 The obtained MAGs containing Ni-CODH genes

No.	Completeness ^{*1}	Contamination ^{*1}	# of Ni-CODH	Taxonomic assignments ^{*2}
1	88.6 %	6.1 %	3	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>
2	91.5 %	0.0 %	2	<i>Geoglobus</i> sp.
3	99.4 %	1.1 %	5	<i>Thermolithobacter</i> sp.
4	95.4 %	1.3 %	2	<i>Geoglobus</i> sp.
5	100 %	0.8 %	4	<i>Thermolithobacter</i> sp.

*1: estimated by checkM, *2: inferred from rRNA-based or genome-based phylogenetic analyses

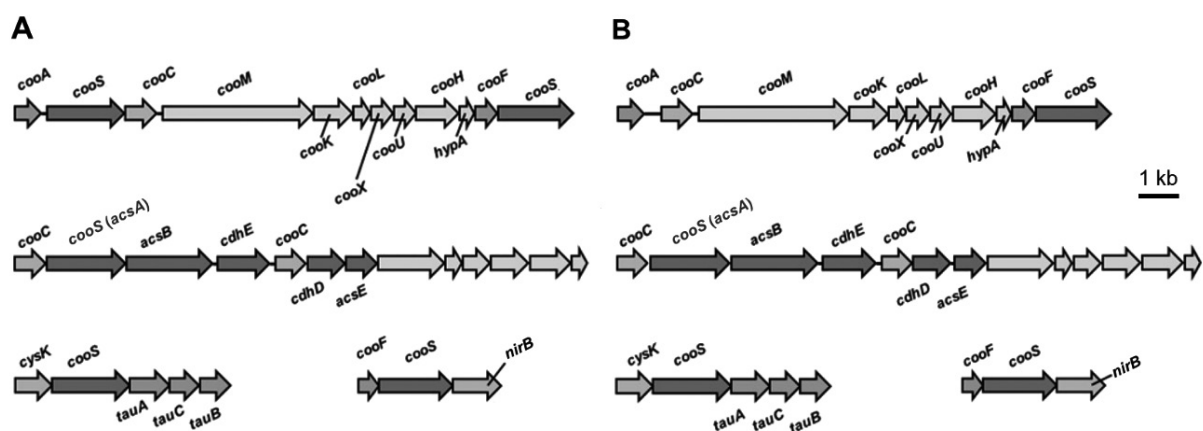


Fig. 1 Ni-CODH gene clusters in *Thermolithobacter*-derived MAGs.

Arrows show coding regions and their directions. (A) Gene clusters of the MAG no. 3. (B) Gene clusters of the MAG no. 5. See Table 1 for MAG numbers.

鰻池からの新規CO酸化菌の分離と性状解析

新規CO酸化菌の培養株を得るため嫌気的なCO雰囲気下での集積培養に供した鰻池の堆積物サンプルにおいて、CO消費と水素生成がガスクロマトグラフィーによって検出された。そこで集積培養液を好気的なプレート培養に供したところ、コロニー形成が観察され、そのうちの1コロニーを単離することで培養株G301を確立した。本培養株を集積培養と同様の手法で培養したところ、CO消費と水素生成が検出されたことから、G301株がCO酸化菌の培養株であることが確認された。コア遺伝子に基づく系統樹において、G301株は*Parageobacillus toebii*, *Parageobacillus yumthangensis*, *Parageobacillus galactosidasius* および5株の未分類*Geobacillus*属細菌と単系統群を形成した。これらの株との間のANI値は種の閾値である95% (Jain *et al.*, 2018)を上回った。G301株はNi-CODHとそのアクセサリー遺伝子、およびヒドロゲナーゼ遺伝子からなる遺伝子クラスター (*coo-ech* 遺伝子クラスター)を有した (Fig.2A)。Ni-CODHに加えて、COデヒドロゲナーゼ (CODH)にはモリブデン含有CODH (Mo-CODH)がある。Mo-CODHは、モリブデンと銅からなる活性中心を持ち (Dobbek *et al.*, 1999)、酸素、硝酸塩、過塩素酸塩といった末端電子受容体をCO酸化と共役させる (King & Weber, 2007; Myers & King, 2017)。Ni-CODHとは異なり、Mo-CODHを持つ菌は好気性菌に偏在する (King & Weber, 2007)。本菌は、Ni-CODHに加えてMo-CODHをコードする*cox*遺伝子群も有した。*cox*およびその成熟因子は遺伝子クラスターを形成し、*cox*の上流にはシトクローム*bd*オキシダーゼ遺伝子 (*cyd*) (Winstedt *et al.*, 1998)が存在

した (*cyd-cox* 領域) (Fig.2A)。ここから、G301株は水素生成および酸素の還元とCOの酸化を共役する可能性が示唆された。G301株は好気呼吸鎖の他に、硝酸レダクターゼ遺伝子 (*nar*) (Stolz & Basu, 2002)を有し、硝酸還元もCOの酸化と共役すると考えられた (Fig.2B)。

coo-ech 遺伝子クラスターはG301株および全ての*P. thermoglucosidasius*に、*cyd-cox*領域は*Parageobacillus* genomsp. 1 NUB3621, *Saccharococcus thermophilus* DSM 4749, *P. toebii* DSM 14590, *Geobacillus* sp. 44C, *Geobacillus* sp. NFOSA3, および*P. galactosidasius* DSM 18751に存在した (Fig.2B)。NCBI RefSeq/GenBank (Sayers *et al.*, 2022)に登録されている原核生物の中で、Ni-CODHとMo-CODHの両方を有した分離株はG301株のみであった。

*codh*の在・不在と対応するゲノムの違いがあるか調べるために、*Parageobacillus*属細菌のゲノムを比較した。まず、高いANI値 (>95%)を示したが、*codh*の在・不在が異なったG301株、*P. toebii* DSM 14590, および*Geobacillus* sp. WCH70のゲノムを比較した。その結果、ゲノム全体のシntenニーは保存されていた。*codh*を持つゲノムと持たないゲノムの間で*codh*の周辺領域を比較した。その結果、*coo-ech* 遺伝子クラスター、*cyd-cox*領域いずれについても遺伝子クラスター内のシntenニーおよび周辺の遺伝子領域は保存されており、両ゲノム領域は周囲のゲノム領域の変化を伴わずに挿入または欠失していると示唆された。*codh*を持つゲノムと持たないゲノムの間で遺伝子の在・不在を比較した。その結果、*coo-ech* 遺伝子クラスターを有するゲノムのみが存在した遺伝子は13個存在した。このうち12遺伝子が*coo-ech*

遺伝子クラスターに含まれた。1 遺伝子は細胞壁合成に関与するアンデカプニルジホスファターゼ (El Ghachi *et al.*, 2004) をコードした。 *cyd-cox* 領域保有ゲノムのみが存在する遺伝子は3個あり、全て *cyd-cox* 領域に含まれた。 *codh* の獲得、欠失はゲノムおよび CO 酸化以外の細胞機能にほとんど影響しないと示唆された。

G301 株の CO 酸化能を培養実験によって調べた結果、CO が存在する全ての培養条件で CO の酸化が生じた (Fig. 3A, 3D, 3G)。酸素も硝酸も存在しない培養では、対数増殖後期以降に CO の酸化が観察され (Fig. 3A, 3C)、CO 消費量、H₂ 生成量および気相への CO₂ 放出量のモル比は 1.00:1.03:0.47 であった。細胞収量は CO 存在下の培養で CO 非存在下よりも 3.07 倍大きかった (Fig. 3C)。酸素存在下および硝酸存在下では、定常期に CO の酸化が生じた (Fig. 3D, 3F, 3G, 3I)。酸素存在下では、CO 消費量、酸素消費量および気相への CO₂ 放出量のモル比は 1.00:0.95:0.60 であった。酸素消費量および気相への CO₂ 放出量は、CO 存在下で CO 非存在下の 1.46 倍と 2.80 倍であった。硝酸存在下では、CO 消費量、硝酸消費量、気相への CO₂ 放出量および亜硝酸生成量のモル比は 1.00:1.79:0.60:1.63 であった。硝酸消費量、気相への CO₂ 放出量および亜硝酸生成量は、CO 存在下で CO 非存在下の 1.85 倍、3.20 倍、および 1.67 倍であった。酸素存在下、硝酸存在下いずれも CO 存在下と非存在下の間で細胞収量と増殖速度に有意な差は確認されなかった (Fig. 3F, 3I)。硝酸存在下で CO の酸化に寄与する CODH を調べるために、G301 株とアミノ酸配列相同性 70% 以上の Ni-CODH を持ち、Mo-CODH を持たない *P. thermoglucosidasius* NBRC 107763 株を同様の条件下で培養した。その結果、*P. thermoglucosidasius* は硝酸存在下で CO の酸化を行わなかったため、G301 株は硝酸存在下では Mo-CODH を用いた CO の酸化を行うと推察された。

微生物による CO 酸化は、多くの生物にとって有毒な CO の除去剤として機能することに加えて地球規模の炭素循環に寄与するため、CO 酸化菌は生態において重要な微生物群と認識されてきた。真正細菌と古細菌のいずれにおいても、CO 酸化菌は属レベルの単系統グループであっても非 CO 酸化菌と姉妹関係を示す。本研究では、新規分離株である *Parageobacillus* sp. G301 株が、これまで報告されていなかった嫌氣的 (水素生成型) および好氣的な CO の酸化のいずれも可能であることを実証した。CO 代謝において多機能性を有する新規分離株の発見は、多様な CO 代謝を有する CO 酸化菌の研究を加速させ、微生物の多様性についての理解を広げることになると期待される。比較ゲノム解析では、*Parageobacillus* 属において CO 酸化遺伝子がアクセサリ-遺伝子である

ことを示唆しており、系統樹において属レベルの単系統群であっても、CO 酸化菌が点状分布を形成する要因となっていることを示している。

琵琶湖湖底からの新規 CO 酸化菌の分離と性状解析

さらに分離培養株を得るため、水深 70m の琵琶湖湖底堆積物サンプルを嫌氣的 CO 雰囲気下で集積培養した結果、CO 消費と水素生成が検出された。そこで本集積培養液を好氣的にプレート培養し、形成されたコロニーの単離により培養株を確立した。本培養株 B1-1 株は CO 酸化能と水素生成能が検出された。16S rRNA 遺伝子部分配列相同性に基づく、本培養株は CO 酸化能の報告がない *Thermolongibacillus altinsuensis* と相同性が 99% 以上であった。本属は好気性、好熱性、内生孢子形成能を有する桿菌である。本培養株から抽出した DNA を用いてゲノム解読を行った結果、352 配列のスキップフォルドから成る全長 2.9Mbp のゲノムが得られ、*T. altinsuensis* DSM24979 (GCA_004341205.1) との ANI 値は 99% 以上であった。そのため B1-1 株は本種と同定された。B1-1 株のゲノムの GC 含量は 41.3% であり、CDS 数は 2,933 であった。B1-1 株は、Ni-CODH 遺伝子群を含む *coo-ech* 遺伝子クラスターを 1 組のみ有していたため (Fig. 4)、本遺伝子群が B1-1 株の CO 酸化能に寄与すると考えられた。

以上の結果は、既報の非 CO 酸化菌と同種であったとしても、その中には CO 酸化能を有する個体群が存在する可能性があることを示している。本研究により、これまで見落とされてきた CO 酸化菌の多様性が現在も環境試料中やデータベース中に埋没している可能性が示唆されている。本培養株以外にも京都大学理学部植物園内の淡水池堆積物からも CO 酸化能を有する新属候補培養株が、そして琵琶湖湖底堆積物試料より *P. thermoglucosidasius* の分離株が得られており、現在それらのゲノム性状と生理性状解析を進めている。

嫌氣的 CO 酸化の鍵酵素 Ni-CODH の細菌分類群・環境における分布

CO は大気中に微量ガスとして存在するが、嫌氣的環境下における CO の発生源については謎が多く、火山性熱水環境における著者らの研究例 (Omae *et al.*, 2021, 2019; Yoneda *et al.*, 2015) を除き、環境における分布をはじめとする嫌氣性 CO 酸化菌の生態は未解明であった。そこで、公共メタゲノムにおける Ni-CODH の網羅的探索を介して、Ni-CODH 系統 (Inoue *et al.*, 2019a) とゲノム分類群、生物圏分布などの多次元情報を統合し、大規模かつ高深度なバイオインフォマティクス解析を行った。

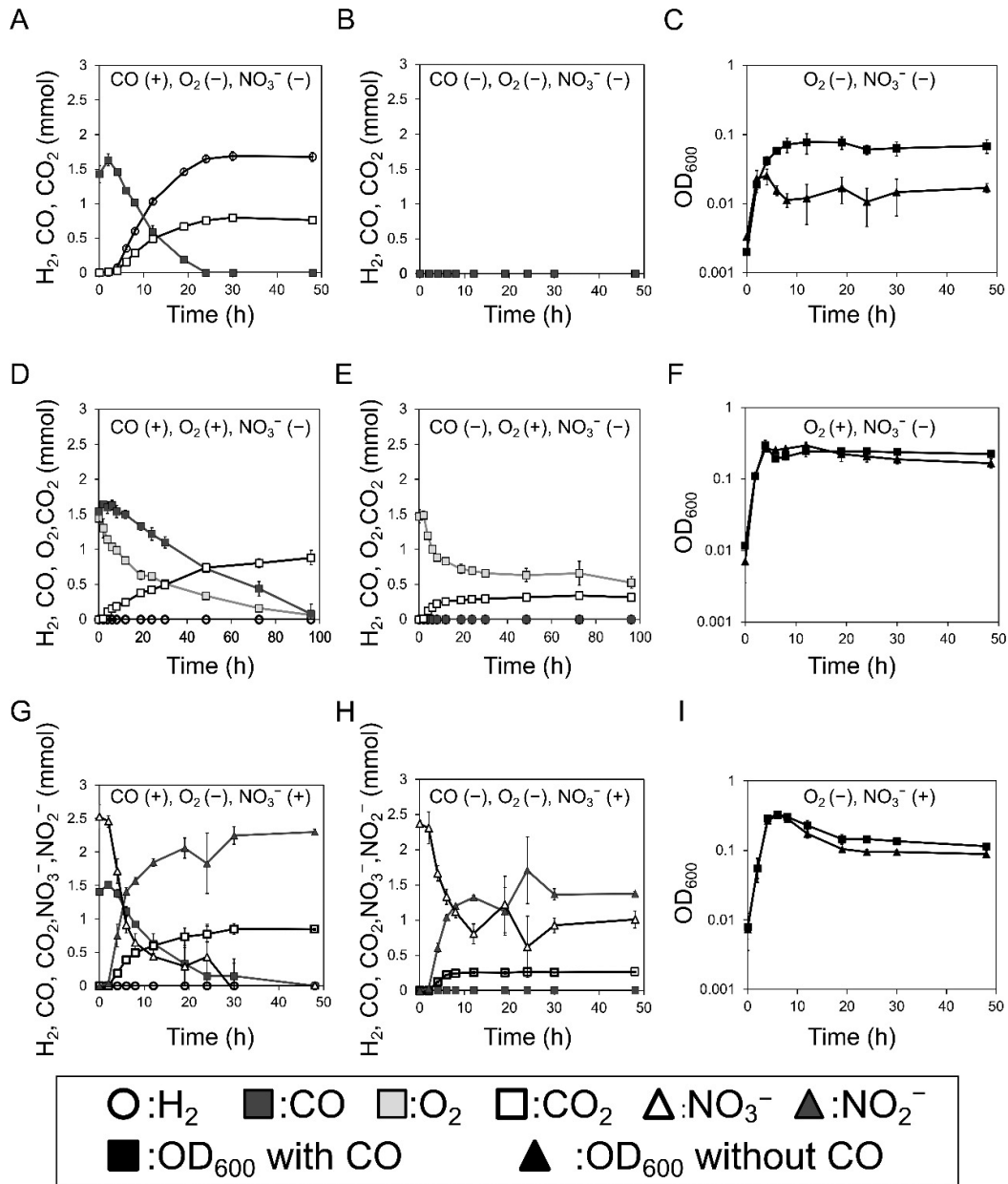


Fig. 3 Cultivation of G301 and *Parageobacillus thermoglucosidarius*

The presence and absence of CO, O₂, and nitrate under the initial conditions are shown in parentheses in each panel. Plus (+) and minus (-) symbols indicate presence and absence of the indicated substrates, respectively. (A) Amount of H₂, CO, and CO₂ in the culture with CO but without O₂ and nitrate for CO oxidation. (B) Amount of H₂, CO, and CO₂ in the culture without CO, O₂, and nitrate as the control for (A). (C) Growth of G301 under the conditions described in (A) and (B). (D) Amount of O₂, CO, and CO₂ in the culture with CO and O₂ but without nitrate for coupling of reduction of O₂ and oxidation of CO. (E) Amount of O₂, CO, and CO₂ in the culture with O₂ but without CO and nitrate for the control of (D). (F) Growth of G301 under the conditions described in (D) and (E). (G) Amount of CO, CO₂, nitrate, and nitrite in the culture with CO and nitrate but without O₂ for coupling of reduction of nitrate and oxidation of CO. (H) Amount of CO, CO₂, nitrate, and nitrite in the culture with nitrate but without CO and O₂ for the control of (G). (I) Growth of G301 under the conditions described in (H) and (I). Plots represent the means of three biological replicates. Thin vertical lines represent standard deviations.

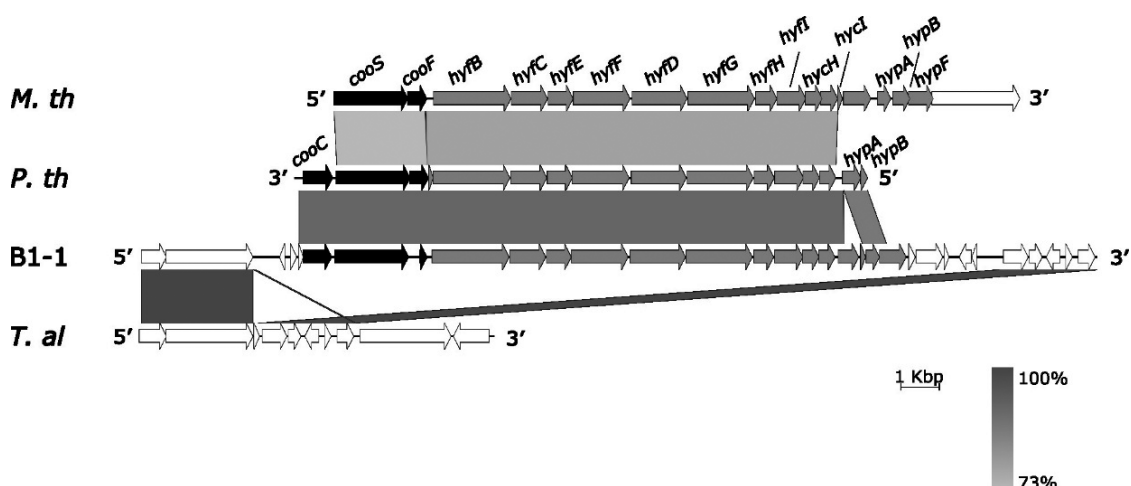


Fig. 4 Comparison of Ni-CODH gene clusters and their flanking regions in *Thermomongibacillus altinsuensis* and other bacteria.

Arrows show coding regions and their directions. Vertical blocks between given two genomes represent genomic regions with nucleotide identity higher than 70%. *M. th*, *P. th*, and *T. al* represent *Moorella thermoacetica* Hama-1, *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM2542, and *T. altinsuensis* DSM24979, respectively.

MGnify タンパク質データベースと NCBI データベースを用いて Ni-CODH 様配列を収集し、90% のアミノ酸配列相同性にて配列クラスタリングを行った。得られた 2,462 個の Ni-CODH 配列クラスターは、分子系統解析によって 1 つの新たな系統群を含む 8 つのサブグループに分類することができた (Fig. 5A)。これらのうち 1,653 個の Ni-CODH 配列クラスターはゲノム情報に紐付けられ、バクテリア 55 門・アーキア 11 門 (GTDB による分類群) に渡る幅広い原核生物に由来した。さらに、1,424 個の Ni-CODH 配列クラスターには約 27,000 ものメタゲノム由来配列が含まれており、全クラスターの 60% がメタゲノムアセンブリに見出された。これらの配列はいずれも海洋などの水圏環境、バイオリアクタなどの人工環境、ヒトを含む哺乳動物の微生物叢由来のものであり、CO を利用した代謝経路が火山性環境などの CO 発生源の存在に関わらず普遍的に存在することを示唆した。水圏環境及び人工環境中では幅広い Ni-CODH 系統が見出されたが、ヒト微生物叢では特定の系統に限定されていた (Fig. 5B)。ヒト微生物叢における Ni-CODH 所有微生物の 70% が Firmicutes_A 門 (GTDB による分類群) であり、水圏環境および人工環境に比べて分類群の多様性が低かった (Fig. 5C)。一方で、Ni-CODH 遺伝子近傍のゲノムコンテキストから予測される関連代謝経路の分布は生物圏に関わらず類似していた。これらの結果は、Ni-CODH が多様な微生物叢に存在する普遍的な酵素であるが、その系統は生物圏によって偏っており、

Ni-CODH 系統は代謝経路ではなく微生物叢の組成によって決定されることを示唆した。ごく最近、様々な土壌環境中において嫌氣的な CO の酸化活性が検出されることが報告され (DePoy & King, 2023)、著者らの大規模解析が示す Ni-CODH 遺伝子の遍在性が他の環境においても実験的に確認されつつある。

以上の研究成果は、Ni-CODH に関する情報資源を大幅に拡張し、遺伝子資源として活用していくための基盤となると期待される。本成果をまとめた論文は、MGnify データベース論文 (Richardson *et al.*, 2023) 内において、メタゲノム情報を利用した立体構造予測 AI である AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) やメタゲノム由来 PET 分解酵素 (Eiamthong *et al.*, 2022) とともに紹介されるなど国際的に高い評価を受けている。

一方、本解析を通して、CO 酸化菌のマーカーとなるヒドロゲナーゼと共起する Ni-CODH はメタゲノムデータ中にはほとんど見つからなかった。このことは熱水環境における著者らの過去の研究例 (Omae *et al.*, 2019, 2021) とも一致しており、多くの環境で CO 酸化菌が “rare biosphere” として存在することを示唆する。ビッグデータが示すこれらの事実は、奇しくも本研究課題の核である独自の技術による CO 酸化菌の分離・培養の重要性を浮き彫りにし、上述した新奇 CO 酸化菌分離株コレクションの構築や集積培養系を利用したゲノム再構築が極めてオリジナリティの高い研究成果であることを裏付けるものであった。

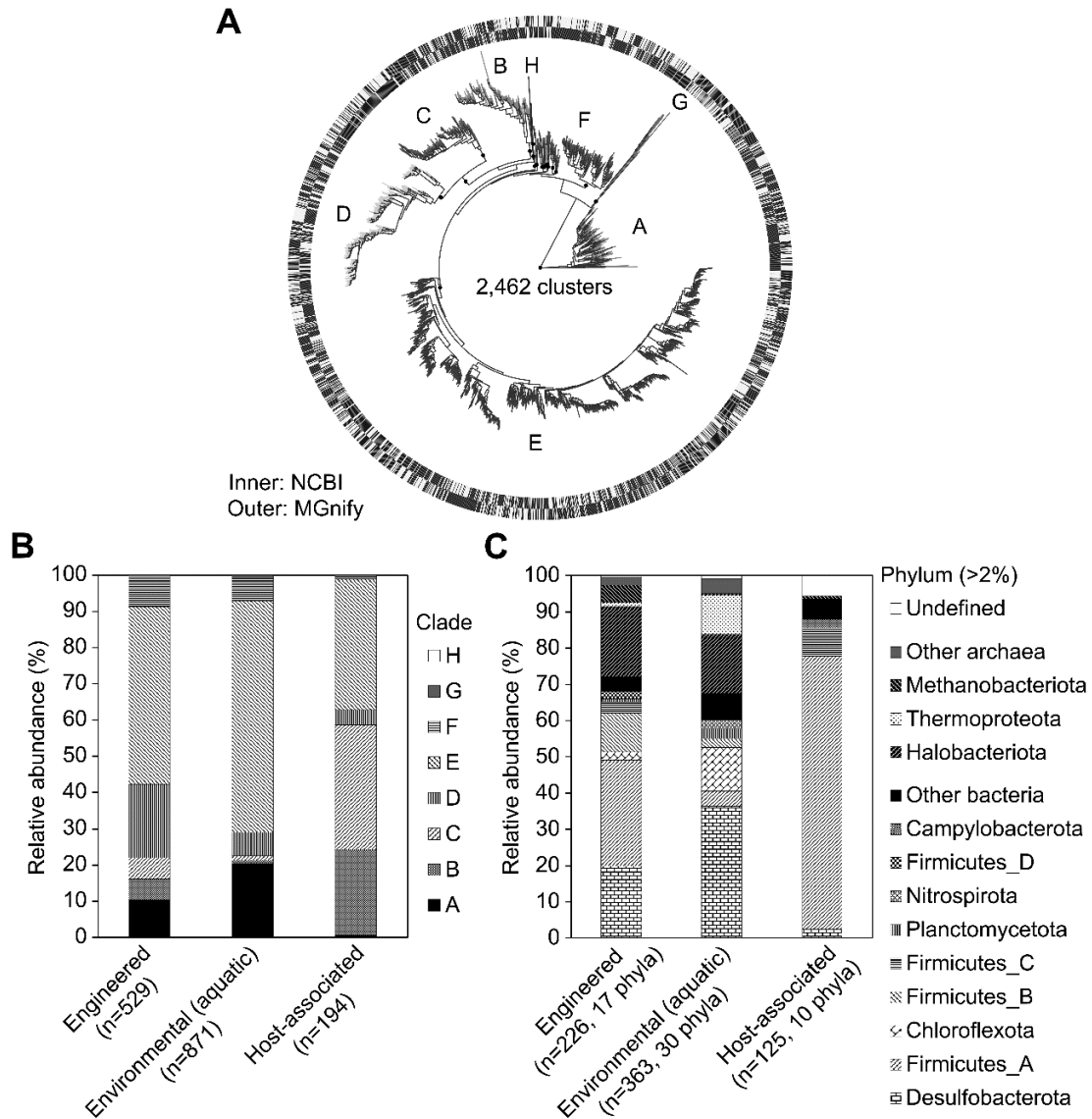


Fig. 5 Biome-specific distribution of Ni-CODH and its owner.

(A) A phylogenetic tree of Ni-CODH clusters mapped along the two circles showing the presence of MGnify (outer) and NCBI RefSeq/GenBank (inner) sequences in each cluster. An unrooted phylogenetic tree was constructed using an alignment of centroid sequences from the 2,462 Ni-CODH clusters on 90% amino acid sequence identity. The major clades A to H are designated. The black circles on the branches separating the major clades or subclades indicate their bootstrap value of >0.95 support). (B) Clade compositions of Ni-CODH clusters in the three major biome categories: “engineered”, “environmental (aquatic)”, and “host-associated”. (C) Compositions of phylum-level taxonomies in three major biome categories annotated by co-occurrence of biome and genome information.

ヒト腸内および海洋表層マイクロバイオームにおけるCO酸化菌

上述の通りさまざまな生物圏微生物叢においてNi-CODHの普遍性が明らかとなったが、環境や宿主生物におけるCO酸化菌とそのCO代謝の機能理解は限定的である。ヒトはヘム分解の副産物として自身に有毒な

COを恒常的に生産するが (Ryter & Choi, 2009), ヒト体内におけるCO消費能は十分に調べられていない。ここでは、ヒト腸内細菌叢においてCOを利用する菌 (CO菌) の存在有無を確かめるため、ヒト腸内原核生物ゲノムデータベース HumGut (Hiseni *et al.*, 2021) においてNi-CODH保有菌の多様性と予測される代謝を調査した。

その結果、30,609の代表ゲノムのうち1,302ゲノムがNi-CODHを1個以上保持し、それらゲノムは腸内特異的な細菌系統である *Firmicutes* 門 *Oscillospirales* 目 (31.6%), *Lachnospirales* 目 (29.1%), および腸内や口腔で見られる *Veillonellales* 目 (26.3%) 等に属することが明らかとなった (Fig.6A). これは、一部の腸内細菌がCO利用能を保持し、ヒト体内のCO消費に寄与していることを示唆する。さらに、代謝解析によってNi-CODH保有腸内細菌がユニークなCO代謝経路を保持する可能性が示された。例えば、667/1,302のゲノムはNi-CODHを反応の鍵酵素とする炭素固定経路(WLP, Wood Ljungdahl Pathway)を保存したが、このうち635ゲノムは、CO₂の還元によりギ酸を生成するギ酸脱水素酵素を欠損しており、本酵素はWLPにおけるメチル基合成に重要である。しかし、例えば、*Lachnospirales* 目 WLP保有ゲノムはギ酸脱水素酵素を欠損しているが、本ギ酸生成経路の代替としてピルビン酸からギ酸を生成するピルビン酸：ギ酸リアーゼを保存し、解糖系を通じて生成したピルビン酸を利用していると考えられた。これは、本来独立栄養経路であるWLPが、一部の腸内細菌において従属栄養におけるアセチル CoA 生成経路として利用されていることを示唆する (Fig.6B)。また、*Veillonella* 目等において、既知のものとは異なる

Ni-CODH 遺伝子近傍のゲノムコンテキストを保有する細菌系統が存在し、COの利用経路について培養株を用いた生理学的研究が必要である。総じて、ヒト腸内細菌叢のCO利用菌は腸内において有毒なCOの蓄積を防ぐと共に、独自のCO代謝経路を発達させた可能性がある。CO菌の理解が我々の身近な健康への理解に繋がることが期待される。

海洋表層では藻類への光照射および有機物の分解によってCOが生成し、その量は年間30TgCとも試算される (Conte *et al.*, 2019)。海洋表層では、Mo-CODHを保有する好気性微生物群によってCOが利用されていると考えられる。海洋から5種の分離株において、COの酸化能が知られている。一方、近年のメタゲノム解析の発展により、海洋より8門98属166種のメタゲノム由来ゲノム(MAG)にMo-CODH遺伝子が見いだされている。ただし、探索されたMAG数は十分でない。加えて、Mo-CODH遺伝子の類似遺伝子の扱いなどの課題も残され (Lappan *et al.*, 2022)、海洋のCO菌の多様性が正確に判断されていなかった。そこで、海洋CO菌の多様性を明らかにするため、50,000個以上の高品質MAGが登録されたthe OceanDNA MAG Catalog (Ocean_MAGs)からCO菌を探索した。CO菌の探索に用いるマーカー遺伝子を精査するために、RefSeqに登録されたCoxLの

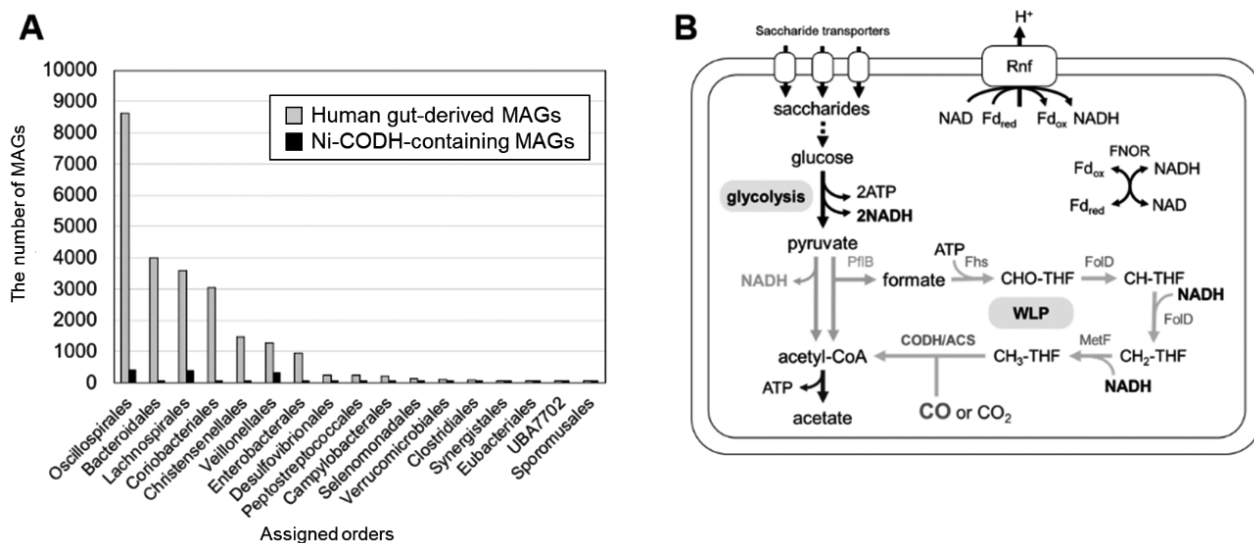


Fig. 6 Distribution of Ni-CODH gene and a Ni-CODH-mediated divergent metabolism in the human gut microbial MAGs.

(A) The total numbers of MAGs and Ni-CODH-encoded MAGs. The number of MAGs were shown for all the orders from which Ni-CODH-encoded MAGs were derived. (B) A divergent Wood Ljungdahl Pathway (WLP) estimated from human gut MAGs. The MAGs lack the gene for Formate dehydrogenase, which contributes to the conversion of CO₂ to formate for the methyl branch formation in WLP. Instead, the MAGs carry the genes for Pyruvate formate lyase (Pfl), which supplies formate converted from the end product of glycolysis, pyruvate.

系統と活性中心を調べた。相同性検索により、1,796のCoxLが検出され、これらは291のクラスターに分かれた。CoxLは大きく5群に分かれたため、これらをクレード1-5とした (Fig.7)。各クラスターの代表配列について、代表配列のクレードと代表配列を有したゲノムの系統は対応しており (Fig.7)、これは先行研究の報告と矛盾しない (Cordero *et al.*, 2019)。クレード1 CoxLは *Halobacteriota* 門古細菌、クレード2は *Actinomycetota* 門細菌、クレード3は *Actinomycetota* 門細菌および *Myxococcota* 門細菌、クレード4は9門の細菌および古

細菌、クレード5は *Pseudomonadota* 門細菌のゲノムに存在した。既報のCoxL活性中心モチーフ (AYXCSFR) (King & Weber, 2007) の類似モチーフを探索した結果、7種類の活性中心が確認された。活性中心もCoxLの系統ごとにまとまる傾向が見られた (Fig.7)。そこで、Ocean_MAGsから、7種類の活性中心いずれかを含むform I CoxLを持つCO菌ゲノムを探索した。その結果、52,325ゲノムのうち1,792ゲノムがCO菌であった。これらの海洋由来CoxLの活性中心グループは3種類 (AYRCSFR, AYACSFR, SYRCSFR) のみ確認された。

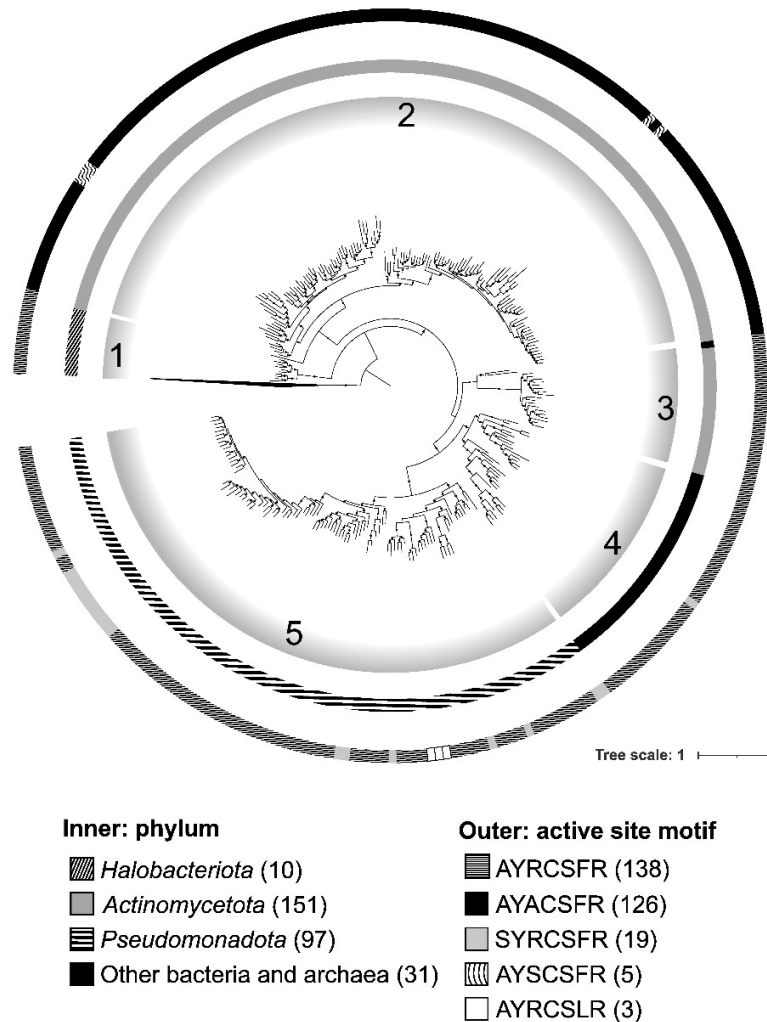


Fig. 7 Phylogenetic relationships of Mo-CODHs found from NCBI RefSeq. The midpoint-rooted tree is constructed using an alignment of 887 centroids of proteins which are homologous to Mo-CODH. The clades 1 through 5 of Mo-CODH are highlighted in grey. The inner circle is colored according to the phylum classification of the genome which encodes the centroids. Phyla containing less than 10 genomes are shown as "Other bacteria and archaea". The number of genomes in each phylum is shown in parentheses. The outer circle is colored according to the active site motifs of the centroids. The number of centroids with each active site is shown in parentheses. The clades of the proteins without sequence motifs similar to the active site motifs of Mo-CODHs are collapsed.

Ocean_MAGs から検出された CO 菌と既知海洋 CO 菌ゲノム (以下, 非 Ocean_MAGs) は, 397 種に分かれた. 231 種は Ocean_MAGs にのみ, 122 種は非 Ocean_MAGs にのみ, 44 種は Ocean_MAGs と非 Ocean_MAGs の両方に含まれた. CO 菌は 10 門 185 属 397 種に分かれ, 本研究により新たに 2 門, 87 属, 231 種の潜在的海洋 CO 酸化菌のデータベースを拡張した. これにより海洋における CO 酸化菌の系統や分布が明らかとなり, ゲノム情報から CO 酸化菌の代謝と周囲に及ぼす生態学的機能の解明に向けた基礎となる.

要 約

CO 酸化菌は, Ni-CODH と ECH を用いてエネルギー保存を行う. そのため CO 酸化菌は CO を除去し高効率に水素を生成する微生物触媒としての利用が期待されている. 本研究では, 確立した気相を CO に置換した集積培養法を用い, 未記載種の分離探索を推進し, 遺伝子資源としての培養株コレクションを拡充することを目的とした. さらに, メタゲノムデータベース上の未利用 CODH 遺伝子の多様性解析を行った. まず, CO 雰囲気下での集積培養により高品質な CO 酸化菌 MAG の構築に成功した. すなわち本培養系により CO 酸化菌が効果的に集積され, 分離培養株の確立に至らなくとも, 遺伝情報をえてその系統や性状を明らかにすることが可能な基盤技術として極めて有用であることが示された. 鹿児島県鰻池湖底堆積物より水素生成型 CO 酸化能を有する *Parageobacillus* 属細菌 G301 株の分離に成功した. G301 株は *Parageobacillus toebii* と同種と判断されたが, G301 株のみが CODH/ECH を有した. さらに G301 株ゲノムには好気型 CODH の遺伝子群がコードされており, 嫌気型および好気型 CODH の両方を有した. 培養実験により, これまで報告されていなかった嫌氣的 (水素生成型) および好氣的な CO の酸化のいずれも可能であることを実証した. また, 水深 70m の琵琶湖湖底堆積物サンプルより CO 酸化能の報告がない *Thermolongibacillus altinsuensis* とゲノム相同性が 99% 以上で, CO 酸化能を有する分離株を得た. 本株は, Ni-CODH 遺伝子群を含む *coo-ech* 遺伝子クラスターを保有し, CO 酸化菌が含まれる細菌分類群を拡張した.

一方, 公共メタゲノムにおける網羅的探索により Ni-CODH がバクテリア 55 門・アーキア 11 門に渡る幅広い原核生物に分布した. 海洋などの水圏環境, バイオリアクタなどの人工環境, ヒトを含む哺乳動物の微生物叢など多様な微生物叢に存在する普遍的な酵素であるが, 水素生成型 Ni-CODH はメタゲノムデータ中にはほとんど見つからなかった. CO 酸化菌は極めて少なく奇

しくも本研究課題の核である独自の技術による CO 酸化菌の分離・培養の重要性を浮き彫りにした. また腸内細菌における Ni-CODH を反応の鍵酵素とする従属栄養におけるアセチル CoA 生成経路を見出し, 海洋における好氣的な潜在的海洋 CO 菌のデータベースを拡張した. 以上の研究成果は, Ni-CODH に関する情報資源を大幅に拡張し, 遺伝子資源として活用するだけでなく, CO 酸化菌の代謝と周囲に及ぼす生態学的機能の解明に向けた基礎となると期待される.

本助成で得られた研究結果の報告

口頭発表

- 1) 今浦由就, 足立夕花, 岡元俊輔, 日野太貴, 井上真男, 神川龍馬, 左子芳彦, 吉田天士. 2021. 一酸化炭素利用能を持つ新規 *Parageobacillus* 属細菌分離株の生理・ゲノム性状解析. 日本微生物生態学会第34回大会 (2021年10月30日-11月2日, オンライン)
- 2) 井上真男, 大前公保, 神川龍馬, 吉田天士, 左子芳彦. 2021. CO デヒドロゲナーゼは生物圏によって異なる系統分布を示す. 第22回極限環境生物学会年会 (2021年11月20日, オンライン)
- 3) 今浦由就, 足立夕花, 岡元俊輔, 日野太貴, 井上真男, 神川龍馬, 左子芳彦, 吉田天士. 2021. 常温湖底堆積物より分離された好熱性 *Parageobacillus* 属細菌の一酸化炭素利用能分析. 令和3年度日本水産学会近畿支部例会 (2021年12月5日, オンライン)
- 4) 今浦由就, 西門航平, 藤原健太郎, 山本圭吾, 神川龍馬, 吉田天士. 2022. 海洋表層の炭素, エネルギー循環を駆動する好気的一酸化炭素酸化菌の探索. 日本微生物生態学会第35回大会. (2022年10月31日-11月3日, 札幌市)
- 5) 今浦由就, 神川龍馬, 吉田天士. 2023. “一酸化炭素を食べる” 海洋原核生物の系統および分布. 令和5年度日本水産学会大会春季大会. (2023年3月28日-3月31日, 品川区)

原著論文

- 1) Inoue, M., Omae, K., Nakamoto, I., Kamikawa, R., Yoshida, T., Sako, Y. 2022. Biome-specific distribution of Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Extremophiles* **26**: 9.
- 2) Imaura, Y., Okamoto, S., Hino, T., Ogami, Y., Katayama, A.Y., Tanimura, A., Inoue, M., Kamikawa, R., Yoshida, T., Sako, Y. 2023. Isolation, genomic sequence and physiological characterization of *Parageobacillus* sp. G301, an isolate capable of both hydrogenogenic and aerobic carbon monoxide oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **89**: e00185-23.
- 3) Suzuki, J., Imaura, Y., Nishida, S., Kamikawa, K., Yoshida, T. 2023. Draft genome sequence of *Thermolongibacillus altinsuensis* strain B1-1: A novel hydrogenogenic CO oxidizer isolated from a sediment of Lake Biwa in Japan. *Microbiol. Resour. Announc.* **12**: e00334-23.
- 4) Nishida, S., Omae, K., Inoue, M., Sako, Y., Kamikawa, R., Yoshida, T. 2023. Construction of multiple metagenome assembled genomes containing carbon monoxide dehydrogenases from anaerobic carbon monoxide enrichment cultures. *Arch. Microbiol.* **205**: 292.

その他

- 1) 今高里莉, 今浦由就, 鈴木晟太, 西田志保, 神川龍馬, 吉田天士. 2022. 琵琶湖第二湖盆底泥における潜在的CO酸化活性能をもつ微生物の探索. 日本微生物生態学会第35回大会. (2022年10月31日-11月3日, 札幌市)
- 2) 西田志穂, 大前公保, 井上真男, 左子芳彦, 今高里莉, 神川龍馬, 吉田天士. 2022. 水圏環境中に潜在する水素生成型一酸化炭素酸化菌の探索とゲノム特性の解明. 日本微生物生態学会第35回大会. (2022年10月31日-11月3日, 札幌市)
- 3) 鈴木晟太, 今浦由就, 今高里莉, 西田志穂, 神川龍馬, 吉田天士. 2022. 淡水低湿環境からの水素 (H₂) 生成型一酸化炭素 (CO) 酸化菌の分離及び性状解析. 日本微生物生態学会第35回大会. (2022年10月31日-11月3日, 札幌市)
- 4) Yuka Adachi Katayama, Ryoma Kamikawa, Takashi Yoshida. 2022. Comprehensive genomic analysis uncovered CO-utilizing pathways in human gut microbiome. International Human Microbiome Consortium The 9th International Human Microbiome Consortium Congress 2022. (2022年11月9日, 神戸市)

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御礼申し上げます。また, 京都大学海洋分子微生物学研究室の学生諸子に感謝の意を表します。

文 献

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. & Pevzner, P.A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**:455-477.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**:2114-2120.
- Cantalapiedra, C.P., Hernández-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.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M. & Gabaldón, T. 2009. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**:1972-1973.
- Chaumeil, P.A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P. & Parks, D.H. 2020. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* **36**:1925-1927.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. 2018. fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**:i884-i890.
- Conte, L., Szopa, S., Séférian, R. & Bopp, L. 2019. The oceanic cycle of carbon monoxide and its emissions to the atmosphere. *Biogeosciences* **16**:881-902.
- Cordero, P.R.F., Bayly, K., Man Leung, P., Huang, C., Islam, Z.F., Schittenhelm, R.B., King, G.M. & Greening, C. 2019. Atmospheric carbon monoxide oxidation is a widespread mechanism supporting microbial survival. *ISME J.* **13**:2868-2881.
- Cripps, R.E., Eley, K., Leak, D.J., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., Boakes, S., Martin, S. & Atkinson, T. 2009. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metab. Eng.* **11**:398-408.
- DePoy, A.N., & King G.M. 2023. Distribution and diversity of anaerobic thermophiles and putative anaerobic nickel-dependent carbon monoxide-oxidizing thermophiles in mesothermal soils and sediments. *Front. Microbiol.* **13**:1096186.
- Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. & Huber, R. 1999. Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:8884-8889.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**:1792-1797.
- Eiamthong, B., Meesawat, P., Wongsatit, T., Jitdee, J., Sangsri, R., Patchsung, M., Aphicho, K., Suraritdechachai, S., Huguenin-Dezot, N., Tang, S., Suginta, W., Paosawatyanong, B., Babu, M.M., Chin, J.W., Pakotitrapha, D., Bhanthumnavin, W. & Uttamapinant, C. 2022. Discovery and genetic code expansion of a polyethylene terephthalate (PET) hydrolase from the human saliva metagenome for the degradation and bio-functionalization of PET. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **61**:e202203061.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D. & Mengin-Lecreulx, D. 2004. The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* **279**:30106-30113.
- Emms, D.M., & Kelly, S. 2019. OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol.* **20**:238.
- Fukuyama, Y., Inoue, M., Omae, K., Yoshida, T., & Sako, Y. 2020. Chapter Three-Anaerobic and hydrogenogenic carbon monoxide-oxidizing prokaryotes: Versatile microbial conversion of a toxic gas into an available energy. *In* G.M. Gadd & S. Sariaslani (eds.), *Adv. Appl. Microbiol.* (Vol. 110, p. 99-148). Academic Press.
- Hachisuka, S., Chong, J.F., Fujiwara, T., Takayama, A., Kawakami, Y. & Yoshida, S. 2022. Ethylene glycol metabolism in the poly(ethylene terephthalate)-degrading bacterium *Ideonella sakaiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**:7867-7878.
- Hiseni, P., Rudi, K., Wilson, R.C., Hegge, F.T. & Snipen, L. 2021. HumGut: A comprehensive human gut prokaryotic genomes collection filtered by metagenome data. *Microbiome*. **9**:165.
- Inoue, M., Nakamoto, I., Omae, K., Oguro, T., Ogata, H., Yoshida, T. & Sako, Y. 2019a. Structural and phylogenetic diversity of anaerobic carbon-monoxide dehydrogenases. *Front. Microbiol.* **9**:3353.
- Inoue, M., Tanimura, A., Ogami, Y., Hino, T., Okunishi, S., Maeda, H., Yoshida, T. & Sako, Y. 2019b. Draft genome sequence of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strain TG4, a hydrogenogenic carboxydophilic bacterium isolated from a marine sediment. *Microbiol. Resour. Announc.* **8**:e01666-18.
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T. & Aluru, S. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* **9**:5114.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstern, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. & Hassabis, D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**:583–589.
- Kang, D.D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H. & Wang, Z. 2019. MetaBAT 2: An adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* **7**:e7359.
- Katz, L.S., Griswold, T., Morrison, S.S., Caravas, J.A., Zhang, S., den Bakker, H.C., Deng, X. & Carleton, H.A. 2019. Mashtree: A rapid comparison of whole genome sequence files. *J. Open Source Softw.* **4**:1762.
- Khalil, M.A.K. & Rasmussen, R.A. 1990. The global cycle of carbon monoxide: Trends and mass balance. *Chemosphere* **20**:227–242.
- King, G.M. & Weber, C.F. 2007. Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:107–118.
- Lappan, R., Shelley, G., Islam, Z.F., Leung, P.M., Lockwood, S., Nauer, P.A., Jirapanjawat, T., Ni, G., Chen, Y.J., Kessler, A.J., Williams, T.J., Cavicchioli, R., Baltar, F., Cook, P.L.M., Morales, S.E. & Greening, C. 2023. Molecular hydrogen in seawater supports growth of diverse marine bacteria. *Nat. Microbiol.* **8**:581–595.
- Li, D., Luo, R., Liu, C.M., Leung, C.M., Ting, H.F., Sadakane, K., Yamashita, H. & Lam, T.W. 2016. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods* **102**:3–11.
- Li, H. & Durbin, R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**:589–595.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**:2078–2079.
- Murphy, R.R., O'Connell, J., Cox, A.J. & Schulz-Trieglaff, O. 2015. NxRepair: Error correction in de novo sequence assembly using Nextera mate pairs. *PeerJ* **3**:e996.
- Myers, M. & King, G.M. 2017. Perchlorate-coupled carbon monoxide (CO) oxidation: evidence for a plausible microbe-mediated reaction in Martian brines. *Front. Microbiol.* **8**:2571.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A. & Minh, B.Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**:268–274.
- Nishimura, Y. & Yoshizawa, S. 2022. The OceanDNA MAG catalog contains over 50,000 prokaryotic genomes originated from various marine environments. *Sci. Data* **9**:305.
- O'Connell, J., Schulz-Trieglaff, O., Carlson, E., Hims, M.M., Gormley, N.A. & Cox, A. J. 2015. NxTrim: Optimized trimming of Illumina mate pair reads. *Bioinformatics* **31**:2035–2037.
- Omae, K., Fukuyama, Y., Yasuda, H., Mise, K., Yoshida, T. & Sako, Y. 2019. Diversity and distribution of thermophilic hydrogenogenic carboxydrotrophs revealed by microbial community analysis in sediments from multiple hydrothermal environments in Japan. *Arch. Microbiol.* **201**:969–982.
- Omae, K., Oguro, T., Inoue, M., Fukuyama, Y., Yoshida, T. & Sako, Y. 2021. Diversity analysis of thermophilic hydrogenogenic carboxydrotrophs by carbon monoxide dehydrogenase amplicon sequencing using new primers. *Extremophiles* **25**:61–76.
- Parkin, A., Seravalli, J., Vincent, K.A., Ragsdale, S.W. & Armstrong, F.A. 2007. Rapid and efficient electrocatalytic CO₂/CO interconversions by *Carboxydothermus hydrogenoformans* CO dehydrogenase I on an electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **129**:10328–10329.
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A.J., Chaumeil, P.A. & Hugenholtz, P. 2022. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Res.* **50**:D785–D794.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. 2015. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **25**:1043–1055.
- Pritchard, L., Glover, R.H., Humphris, S., Elphinstone, J.G. & Toth, I.K. 2015. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* **8**:12–24.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R. & Tschaplinski, T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* **311**:484–489.
- Richardson, L., Allen, B., Baldi, G., Beracochea, M., Bileschi, M.L., Burdett, T., Burgin, J., Caballero-Pérez, J., Cochrane, G., Colwell, L.J., Curtis, T., Escobar-Zepeda, A., Gurbich, T.A., Kale, V., Korobeynikov, A., Raj, S., Rogers, A.B., Sakharova, E., Sanchez, S., Wilkinson, D.J. & Finn, R.D. 2023. MGnify: The microbiome sequence data analysis resource in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**:D753–D759.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F. & Peplies, J. 2016. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* **32**:929–931.
- Ryter, S.W. & Choi, A.M. 2009. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**:251–260
- Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Farrell, C.M., Feldgarden, M., Fine, A.M., Funk, K., Hatcher, E., Kannan, S., Kelly, C., Kim, S., Klimke, W., Landrum, M.J., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T.L., Malheiro, A., Marchler-Bauer, A., Murphy, T.D., Phan, L., Pujar, S., Rangwala, S.H., Schneider, V.A., Tse, T., Wang, J., Ye, J., Trawick, B.W., Pruitt K.D. & Sherry, S.T. 2022. Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**:D29–D38.
- Stolz, J.F. & Basu, P. 2002. Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. *ChemBiochem* **3**:198–206.
- Sudhir, K., Glen, S., Michael, L., Christina, K. & Koichiro, T. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**:1547–1549.

- Tanizawa, Y., Fujisawa, T. & Nakamura, Y. 2018. DFAST: A flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* **34**:1037–1039.
- Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H. & Stevens, R.L. 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* **45**:D535–D542.
- Winstedt, L., Yoshida, K.I., Fujita, Y. & von Wachenfeldt, C. 1998. Cytochrome *bd* biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the *cydABCD* operon. *J. Bacteriol.* **180**:6571–6580.
- Woolerton, T.W., Sheard, S., Reisner, E., Pierce, E., Ragsdale, S.W. & Armstrong, F.A. 2010. Efficient and clean photoreduction of CO₂ to CO by enzyme-modified TiO₂ nanoparticles using visible light. *J. Am. Chem. Soc.* **132**:2132–2133.
- Yoneda, Y., Kano, S.I., Yoshida, T., Ikeda, E., Fukuyama, Y., Omae, K., Kimura-Sakai, S., Daifuku, T., Watanabe, T. & Sako, Y. 2015. Detection of anaerobic carbon monoxide-oxidizing thermophiles in hydrothermal environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**:fiv093.
- Yoneda, Y., Yoshida, T., Kawaichi, S., Daifuku, T., Takabe, K. & Sako, Y. 2012. *Carboxydothemus pertinax* sp. Nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe(III)-reducing, sulfur-reducing carboxydrotrophic bacterium from an acidic hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**:1692–1697.
- Yoneda, Y., Yoshida, T., Yasuda, H., Imada, C. & Sako, Y. 2013. A thermophilic, hydrogenogenic and carboxydrotrophic bacterium, *Calderihabitans maritimus* gen. Nov., sp. Nov., from a marine sediment core of an undersea caldera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**:3602–3608.
- Zhou, Z., Tran, P.Q., Breister, A.M., Liu, Y., Kieft, K., Cowley, E.S., Karaoz, U. & Anantharaman, K. 2022. METABOLIC: High-throughput profiling of microbial genomes for functional traits, metabolism, biogeochemistry, and community-scale functional networks. *Microbiome* **10**:33.

タイムラプス・シングルセル発現解析の開発による 分裂酵母胞子の休眠と発芽の分子機構

佐藤 政 充

早稲田大学理工学術院（先進理工学部生命医科学科）

〒162-0056 東京都新宿区若松町2-2 早稲田大学先端生命医科学センター

Dormancy breaking of fission yeast spores revealed by establishment of timelapse single cell RNA-seq analyses

Masamitsu Sato

Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University
2-2 Wakamatsucho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0056

How cells wake up from dormancy remains enigmatic, although it has long been known that *Schizosaccharomyces pombe* spores break dormancy in response to glucose uptake from their environment. Expression profiling upon dormancy breaking must be a clue for the question. As RNA-seq profiles made from bulk spores may not display sufficient temporal resolution, we established a system to perform single cell RNA-seq (scRNA-seq) to capture the transcriptional landscape of a single spore upon dormancy breaking. scRNA-seq was performed over 64 single spores in dormancy or germination, and each single-cell transcriptome was mutually compared to predict how transcriptomes changed over time upon dormancy breaking. Thus, each transcriptome was aligned along the 'Virtual Timeline' and a histone H3 gene was highlighted as a differentially expressed gene upon dormancy breaking. The data highlighted a possibility that chromatin dramatically change in accordance with progression of germination.

Key words: fission yeast, dormancy, germination, single-cell RNA-seq, histone

緒 言

真核細胞は周囲の環境における栄養などを認識して、休眠と増殖を適宜選択する生存戦略をとっている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は通常一倍体で生育し、栄養源が豊富な環境下では体細胞分裂周期によって増殖を行うが、培地中の栄養源が枯渇すると、増殖を停止して性分化を開始する。性分化の過程では増殖を停止した2個の細胞が接合して二倍体を形成した後、減数分裂を経て、一倍体の胞子を形成する。胞子は栄養源が枯渇した状態で休眠した状態で存在し、生存を維持する。ふたたび環境中に栄養源が与えられると、胞子は休眠を

打破して、体細胞分裂周期に突入する。この休眠打破のステップを発芽と呼ぶ。これまで多くの基礎研究は細胞の増殖過程や性分化の過程に焦点を当てて解析がなされ、その結果、多くの分子機構が働いていることが明確にされてきた。

また、性分化からの脱却にあたる、胞子の発芽に関する形態学的な観察は以前よりおこなわれている。分裂酵母の胞子は明視野顕微鏡下で輝度の高い球形の形態を示すが、顕微鏡下で視認できる最初の発芽の兆候は、細胞の輝度が落ち暗化することであり、次に胞子サイズの増大、その後、特徴的な「芽」すなわち発芽突起の形成によってそれまでの完全な球形から対称性を失った形状へと変化する (Padilla *et al.*, 1975; Johnke & Padilla, 1979; Hatanaka & Shimoda, 2001) (Fig. 1)。また、栄養源を与えて発芽を誘導すると、やがてRNAやタンパク質の量が増加することが生化学的に示されている (Nurse & Thuriaux, 1977)。

このような形態変化は以前より知られているものの、

E-mail: masasato@waseda.jp

共同研究者：露崎 隼, 正垣佑樹 (早稲田大学大学院先進理工学研究所),

角井康貢 (早稲田大学高等研究所)

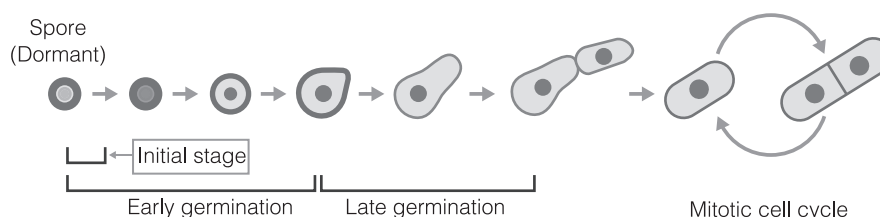


Fig. 1 From dormancy breaking of fission yeast to germination, which leads to entry into mitotic cycles
 When dormant spores break dormancy, they accompany several morphological changes, although there are almost no changes at the initial stage of germination. In early stages of germination, spores get darkened in appearance, followed by an increase of the cell size. In late stages of germination, germination projection is formed to break the morphological symmetry and eventually enter mitotic cell cycles.

細胞の内部でどのような現象が起きているのか、発芽はどのような分子の働きで起きるのか、発芽を促す分子機構については知見が大きく不足している。分子機構について先行する知見が不足している現状において、これを解明するためには、休眠から発芽し始めた時期の細胞を集めてトランスクリプトームなどの遺伝子発現プロファイルを作成することが一つの突破口となると思われる。しかし、培地に栄養源を与えることで胞子の発芽を人為的に誘導しても発芽のタイミングは個々の細胞で異なる個体差があるため、質の良いトランスクリプトームを作成するためには多数の細胞を同調的に発芽させるという困難な問題に直面した。そこで本研究では1細胞単位でのRNAシーケンシング（以下、scRNA-seq; single-cell RNA-seq）を実施した。そこから得られた実験結果をもとに、さらに、休眠および発芽期の胞子におけるクロマチン状態を可視化するためのATAC-seq（Assay for Transposase-Accessible Chromatin-sequencing）解析手法を確立し、発芽の分子機構に迫ることを目指した。

実験方法

分裂酵母胞子の単離と scRNA-seq 手法の確立

細川正人博士・竹山春子博士との共同研究をおこない実施した。詳細な実験手法は Tsuyuzaki *et al.* (2020) に記載した。簡潔にまとめると、分裂酵母（972, 975 由来株）における胞子壁の合成酵素である β グルカンシンターゼ Bgs2 (Liu *et al.*, 2000) の変異体を作製し (Pnmt41-bgs2 株)、これを野生型のかわりに使用した。シングルセルの単離は、顕微鏡下で視認しながらマイクロニードルで吸い取り、直後にマイクロチューブ内に移し、細胞破碎に続いて RNA 採取へと進んだ。RNA 採取後に、オリゴ dT 配列を利用した RT-PCR 反応をおこなった。この増幅の様子をキャピラリー型電気泳動装置によって確認し、増幅が一定量認められるかどうかで判断して品質管

理を実施した。基準を満たしたものに対して NGS 解析すなわち scRNA-seq を実施した。発芽誘導前・誘導後あわせて 64 個の胞子を 1 細胞ごとに単離した。

タイムラプス・シングルセル発現解析法

本解析は、産総研オープン・イノベーション・ラボラトリーとの共同研究として実施した。詳細な実験手法は Tsuyuzaki *et al.*, 2020 に記載した。簡潔にまとめると、64 個それぞれからトランスクリプトームを作成し、次元削減解析（Monocle 解析）(Trapnell *et al.*, 2014) にかけて、これらの 1 細胞トランスクリプトームを 2 次元平面上にプロットした。

ヒストン H3 遺伝子の遺伝子破壊・GFP による可視化

分裂酵母が有するヒストン H3 遺伝子 *hht1*, *hht2*, *hht3* の 3 種類をそれぞれ破壊した *hht1Δ*, *hht2Δ*, *hht3Δ* 株を作製した。遺伝子破壊株の作製は一般的な方法に準拠した (Bähler *et al.*, 1998)。G418 耐性遺伝子 *kan^R* を *hht1* など各遺伝子のコード領域に相同組換えを利用して挿入する形で置き換えた。Hht1 タンパク質の細胞内局在の可視化のためには、*hht1* コード領域の 3' 末端領域に *GFP-kan^R* を挿入する遺伝子ノックインを実施した。

クロマチン状態の可視化

分裂酵母のヌクレオソーム状態を可視化するために、ATAC-seq 法を実施した。休眠胞子、発芽誘導後の胞子（1 時間・3 時間）、増殖期の細胞を準備し、先行研究の方法に従って実験を行った (Buenrostro *et al.*, 2015; Schep *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2020)。細胞に対して Tn5 transposase を作用させ、断片化された DNA を PCR 増幅して NGS 解析を行い、そのリード配列を分裂酵母ゲノムにマッピングし、カバー率 (read coverage) を測定した。

結果と考察

仮想的時間軸の設定

本研究では発芽の最初期に発現する遺伝子を検索し、その中から発芽を誘導するために必須の遺伝子や、発芽の進行に連動した発現を示す遺伝子を見出すことを目指した。したがって、休眠を打破した直後、発芽の最初期の細胞を狙って単離して、その scRNA-seq をおこなうことが望まれた。しかし、実際にシングルセルの単離に使用するような低倍率で広視野な顕微鏡下では、発芽の初期に見られるような胞子細胞の輝度の暗化を見いだすことは出来なかった。仮にそれが見られたとしても、それに先立つような発芽の最初期の胞子を見つけ出すための指標としては確立していないため、これらのように胞子の見た目で見芽のステージを判断してそのシングルセルを単離するのは合理的ではない。

そこで、本研究の基盤となった我々の先行研究 (Tsuyuzaki *et al.*, 2020; 2021; 露崎ら, 2021) では、顕微鏡下で胞子細胞の発芽のステージを判定してからシングルセルを単離するのではなく、まずはステージの如何に関わらず多数のシングルセルを単離したうえで、それらのトランスクリプトームを作成して比較したうえで、どれが発芽の最初期の細胞に由来するトランスクリプトームであるのかを推定した。64 個の scRNA-seq に基づくトランスクリプトームのデータを得たうえで、Monocle 解析による次元削減をおこなった。これにより、約 7,000 の遺伝情報をもつ、すなわち 7,000 次元からなる 1 細胞のトランスクリプトームのデータを 2 次元の情報に次元削減し、2 次元平面上にこれらのデータをプロットした。その結果、約 60 個のトランスクリプトームのプロットは平面上に一列に並ぶ形で配置された (Fig.2; Tsuyuzaki *et al.*, 2020)。類似した位置にあるトランスクリプトームは発現状態が近いといえるため、この一列の配置は、時間とともに細胞内の遺伝子発現が徐々に変動していくことを示唆していると判断した。このようなインフォマティクス解析の結果として見られた仮想的な時間軸のことをバーチャル・タイムラインと呼ぶことにした (Fig.2; Tsuyuzaki *et al.*, 2020; 2021; 露崎ら, 2021)。

発芽の最初期に発現変動した遺伝子の探索とヒストン H3 遺伝子

Monocle 解析の結果、約 60 個の scRNA-seq は平面上では一列に並ぶ形で配置された。この一列の始点にあたる位置にクラスター的存在しているのが発芽の最初期の細胞のトランスクリプトームであると想定して (Fig.2)、そのクラスター内の細胞が示すトランスクリプトームにおいて、発現量に有意 ($p < 0.05$) な差があ

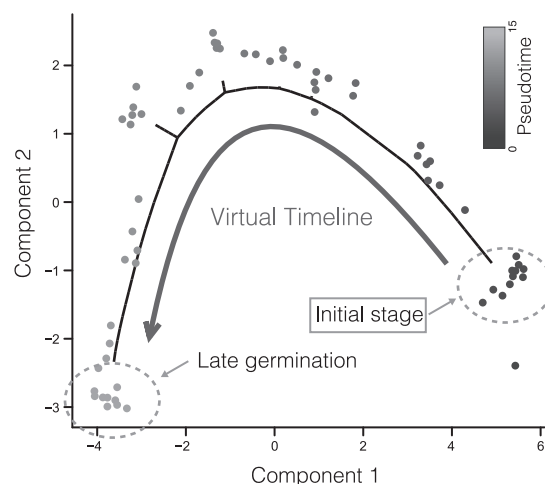


Fig.2 Prediction of temporal changes of gene expression profiles via single-cell-based RNA-seq

Single-cell-based RNA-seq (scRNA-seq) was performed over ~60 single spores in dormancy or germination to make transcriptomes derived from each single cell. Those were plotted in a two-dimensional field after reducing dimensions by the bioinformatics toolkit Monocle. Each plot corresponds to each transcriptome of a single cell and is coloured in gradation along the virtual timeline. The far-right bottom cluster at the edge of the virtual timeline corresponds to the initial stage of germination, whereas the far-left bottom to the end of germination.

るような発現変動遺伝子を統計解析によって選び出した。すなわち、発芽の最初期と推定される時期の細胞において、発現量が有意に変動する遺伝子を抽出すれば、その中に発芽を引き起こすための遺伝子が含まれる可能性があると考えた。

その結果、上位にヒストン H3 遺伝子のひとつである *hht1* が見られた。分裂酵母のヒストン H3 遺伝子は 3 コピー存在しており、*hht1*, *hht2* および *hht3* 遺伝子と命名されている (Takayama & Takahashi, 2007)。しかしながら、3 種類のヒストン H3 遺伝子がどのように細胞内で使い分けられているのかは不明であった。各遺伝子の破壊株を作製してその表現型を調べたところ、*hht2* 遺伝子破壊株のみ高温での生育阻害が見られた (Tsuyuzaki *et al.*, 2020)。この結果から、体細胞分裂周期において最も主要なヒストン H3 は *hht2* 遺伝子によって供給されると判断した。

次に *hht1Δ*, *hht2Δ*, *hht3Δ* の 3 つのヒストン H3 遺伝子破壊株についてそれぞれ胞子を作製し、発芽を誘導して発芽の効率をモニターした。その結果、*hht1Δ* と *hht2Δ*

の胞子は発芽が起きないあるいは遅延する細胞の割合が高いのに対して、*hht3Δ*は発芽に異常を示さないことが分かった (Tsuyuzaki *et al.*, 2020). *hht2*は増殖過程でも発芽でも常に必要となる恒常的なヒストン H3 遺伝子であり、*hht1*は増殖過程には不要であるが発芽の過程では重要な意味をもつヒストン H3 遺伝子であることが分かった。

細胞の目覚めとともにクロマチンの変化と大規模な遺伝子発現の開始

Monocle 解析から推定された仮想的な時間軸に沿ってヒストン H3 遺伝子の発現変動を見たところ、*hht1* 遺伝子は発芽の最初期に発現を低下させ、その後上昇させることが分かった。これに対して、*hht2*および*hht3* 遺伝子は発芽の仮想的時間軸のなかで発現量を大きく変化させなかった。これらは仮想的時間軸における mRNA 量の変動を推定したものに過ぎないため、実際の時間軸において、またヒストン H3 のタンパク質としての発現量がどのように変動するのかを改めて確認した。その結果、実際の時間軸においても、細胞内のヒストン H3 量が調節されることが分かった。

hht1 遺伝子自体が体細胞分裂周期において重要な働きをもたないため、*hht1* 遺伝子の発現変動によるヒストン量の調節は、発芽のみで見られる現象と結びついた調節機構だと捉えられる。発芽に際しては細胞の目覚めを促進するためにゲノム規模での遺伝子発現の促進が起きると考えられ、ヒストン量の一時的な低下は、このような転写の一時的増加に連動した現象であると推測される。

これらの仮想的時間軸に沿った解析結果から得た推測が正しいかを検証するために、クロマチン上にヒストンが形成するヌクレオソーム状態を調べた。まず、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) による染色体 DNA の消化実験をおこなった。その結果、発芽初期の細胞では染色体 DNA は切断されやすいが、発芽の後期では染色体 DNA が切断されにくいことが分かった。この予備的な実験結果を得たうえで、染色体全域のヌクレオソームが休眠から発芽する際にどれだけ変動するかを調べる、ATAC-seq を実行した。なお、当該実験および解析は研究室の正垣佑樹・角井康貢が主体となり共同で実施したものである。

ATAC-seq 法の原理の概要を Fig. 3A に示す。DNA 消化酵素 Tn5 (transposase) は、染色体上のヌクレオソームが粗である (=クロマチンがオープンである) 領域の DNA を選択的に切断する。次に PCR 反応を行うことで、その断片化された領域が特異的に増幅される。これに対して、ヌクレオソームが密に形成されている (クロマチンがクローズである) 領域の DNA は Tn5 によって消化

されないため、その後の PCR でも増幅されない。したがって、Tn5 による消化後に増幅された配列を次世代シーケンサーによって解読すれば、クロマチンがオープンである領域の配列が得られ、ゲノム全域においてオープンおよびクローズ領域の位置を判定できる (Buenrostro *et al.*, 2015)。今回は、休眠胞子、発芽中の胞子、および対照群として増殖期の細胞について、それぞれの細胞集団を回収して Tn5 を作用させて、ATAC-seq を実施した。なお、分裂酵母 *S. pombe* の増殖期の細胞集団についての ATAC-seq については前例がある (Schep *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2020) が、胞子についての ATAC-seq は前例がない。

その結果を Fig. 3B に示す。まず、ATAC-seq で得られた配列リードをゲノム全域にマッピングしてカバー率 (read coverage) を調べたところ、休眠期の胞子 (Spore 0h, Fig. 3B) から得た配列のカバー率は、増殖期の細胞 (Veg**, Fig. 3B) から得た配列のカバー率に比較的類似していることを示す相関係数を得た。したがって、カバー率で比較する限り、休眠状態のクロマチンのヌクレオソーム状態は増殖細胞のそれに近いといえる。事前の予想では、休眠胞子におけるクロマチン状態は増殖細胞のそれとは大きく異なると想定していたため、本実験結果は予想外の発見であった。類似の実験の先行例がないため、本研究は分裂酵母のクロマチン状態と細胞分化の関係を探るうえで良きレファレンスとなるであろう。

Fig. 3C には、ATAC-seq で得られた配列が遺伝子配列のどの領域に由来するのかを分類した結果を示す。増殖中の細胞では ATAC-seq リード配列の約 7 割、また休眠胞子ではその約 5 割が、遺伝子のプロモーター領域に由来することが分かった。一般的にプロモーター領域はヌクレオソーム量が減少してオープン・クロマチンになることが知られる (Lieleg *et al.*, 2015) ため、今回の結果はそれを忠実に再現するデータとなった。これに対して、休眠胞子ではコード領域 (CDS) に由来する配列の割合がやや増加し、プロモーター領域に由来する配列の割合はやや減少した。発芽誘導後 1 時間後と 3 時間後の胞子ではプロモーター領域に由来する配列の割合はさらに減少して、かわりにコード領域に由来する配列の割合がさらに増加した。これらの結果は、休眠胞子のクロマチンは発芽中の胞子のそれと比較しても、増殖期の細胞に比較的近いクロマチン状態にあることを示しており、カバー率で見た結果 (Fig. 3B) に合致するといえる。さらに重要なことに、休眠状態から目覚めて発芽を始めるに伴い、コード領域のヌクレオソーム状態がオープン・クロマチンに変化してきたことを示している。

Fig. 3D に本研究の結果に基づくモデルを示す。休眠期にはヒストンの存在量は比較的多く、ヒストンが

DNAに巻き付いたヌクレオソーム構造が形成され、クロマチン構造としては比較的閉じた状態にあると思われる。これに対して、発芽が誘導されるとヒストンが減少するが、これはそこに位置する遺伝子からの mRNA の転写を意味すると考えられる。やがて発芽の後期になると、このような開き気味のクロマチンが再びもとの定常

状態に戻っていくのだろうと想像される。これをさらに実証するためには、より解像度の高いクロマチン状態の可視化が必要であり、多数の細胞により平均化された細胞集団を用いた ATAC-seq よりも、シングルセル単位での ATAC-seq が求められるため、現在は引き続きそのための技術開発を進めている。

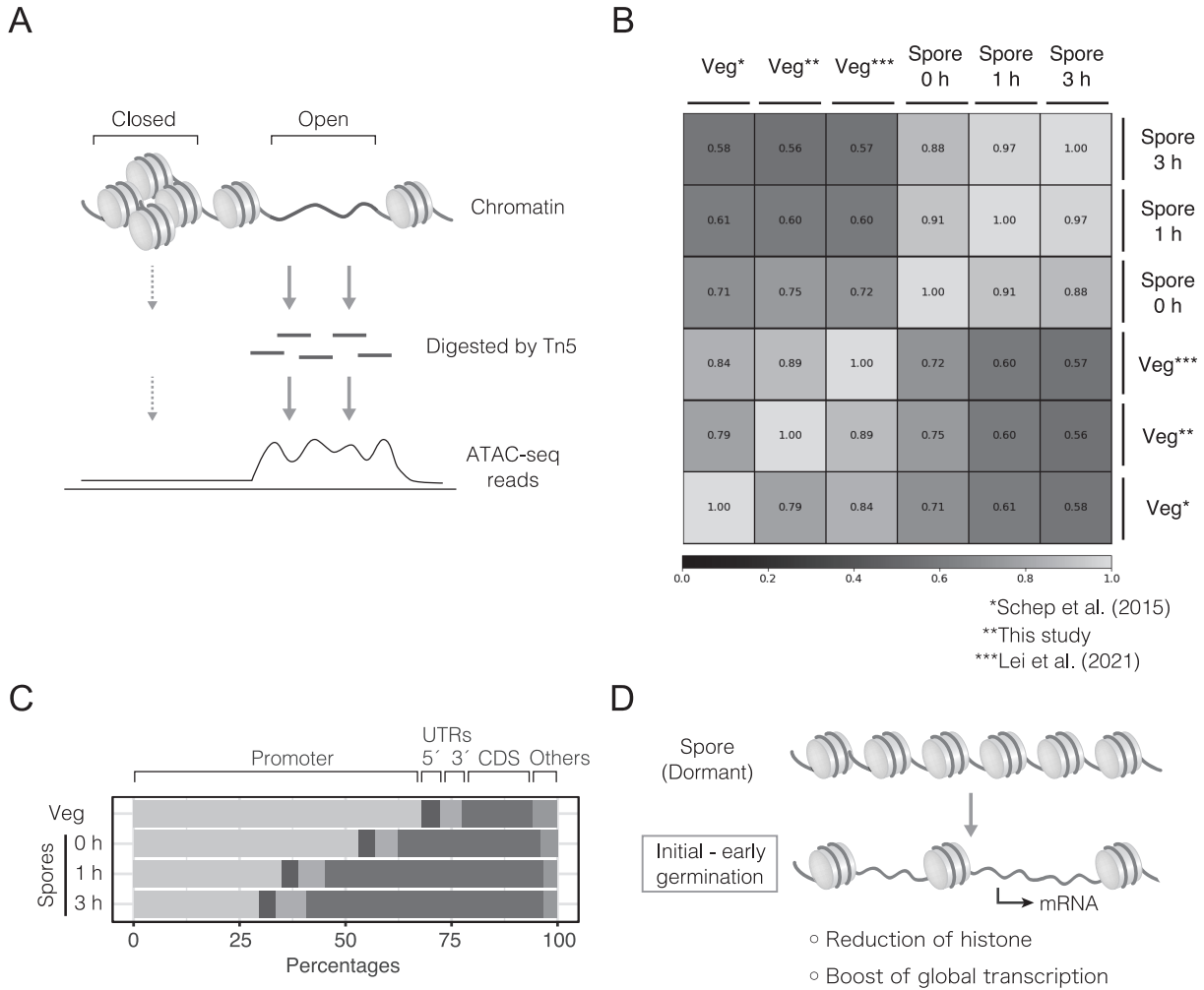


Fig. 3 Analyses for the chromatin state upon dormancy breaking

(A) A schematic for ATAC-seq analyses. Open chromatin can be digested by the transposase Tn5, whereas closed one cannot. The digested fragments are amplified by PCR and detected as ATAC-seq reads. Open and closed regions are then mapped along the entire genome sequence by peaks of the reads. (B) Comparison of read coverage among this study (vegetative cells [veg**] and spore cells [0, 1 and 3 h after induction of germination]) and previous studies: veg* is ATAC-seq data of vegetative cells from Schep et al. (2015), whereas veg*** is from Lei et al. (2021). Values shown in the plot and the heatmap are Spearman's rank correlation coefficients calculated from the ATAC-seq reads distributed into 1 kb bins on the fission yeast reference genome. (C) Peak analysis of the ATAC-seq reads. All the reads from vegetative cells (Veg) and spores (0–3 h) were categorised into the promoter region, 5'- and 3'- UTRs, coding sequences (CDS), and others, and their percentages are shown without any other normalisation. (D) A model for the relationship between the chromatin reorganisation and gene expression at dormancy breaking. Dormant spores may show the regular nucleosome pattern by histone octamers, which is partly open/closed. This study demonstrated that the amount of histone is dramatically reduced at the initial stage of germination. This may be correlated with a boost of global transcription required for dormancy breaking.

要 約

本研究では、分裂酵母における胞子の休眠状態と、そこからの目覚めにおける遺伝子発現状態をモニターするためにシングルセル単位でのRNAシーケンシング(scRNA-seq)を実施した。その結果、ヒストンH3をコードする *hht1* 遺伝子の mRNA が発芽の最初期に減少することが分かった。ヒストンがDNAに巻き付いて形成するヌクレオソーム状態を精査したところ、発芽の初期にはヌクレオソームが減少して、遺伝子配列の中でも特にコード領域においてクロマチン状態がオープン化することが示された。このように、細胞の目覚めにおいては、通常の増殖過程では見られないゲノム全体での大規模な遺伝子発現の活性化が起きていることが示唆された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 佐藤政充. 2022. 配偶子を作るための細胞分裂 — 減数分裂による染色体分配のメカニズム 第27回日本臨床エンブリオロジスト学会 (2022年1月9日, 横浜)
- 2) 佐藤政充. 2022. 酵母胞子の休眠からの目覚め ~ シングルセル発現解析でそのメカニズムに迫る 酵母研究会 第91回講演会 (2022年8月9日, 大阪)
- 3) 佐藤政充. 2022. 1細胞RNA-seqプロファイルの経時変化から見えてきた休眠胞子の目覚めシステム第202回 酵母細胞研究会例会 (2022年12月9日, 東京)

原著論文

なし

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) Sato M., Kakui Y. & Toya M. 2021. Tell the difference between mitosis and meiosis: interplay between chromosomes, cytoskeleton and cell cycle regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 660322.

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。シングルセル RNA-seq の方法論と実践、ならびにバイオインフォマティクスについて共同研究を展開してくださった早大、依田卓也先生・細川正人先生・竹山春子先生ならびに産総研オープン・イノベーション・ラボラトリーの有川浩司先生に感謝いたします。また、本研究の最初期に試行錯誤を繰り返しながら本研究の基礎を築いた岡田直幸先生に感謝いたします。

文 献

- Bähler, J., Wu, J., Longtine, M. S., Shah, N. G., III, A. M., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
- Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. 2015. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Current Protocols in Molecular Biology*, **109**, 21.29.1-21.29.9.
- Hatanaka, M., & Shimoda, C. 2001. The cyclic AMP/PKA signal pathway is required for initiation of spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **18**, 207-217.
- Johnke, R., & Padilla, G. M. 1979. Germination and Outgrowth of *Schizosaccharomyces pombe* Spores Isolated by a Simple Batch Centrifugation Technique. *Microbiology*, **115**, 255-258.
- Lei, B., Capella, M., Montgomery, S. A., Borg, M., Osakabe, A., Goiser, M., Muhammad, A., Braun, S., & Berger, F. 2020. A Synthetic Approach to Reconstruct the Evolutionary and Functional Innovations of the Plant Histone Variant H2A.W. *Current Biology*, **31**, 182-191.e5.
- Lieleg, C., Krietenstein, N., Walker, M., & Korber, P. 2015. Nucleosome positioning in yeasts: methods, maps, and mechanisms. *Chromosoma*, **124**, 131-151.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H., & Balasubramanian, M. 2000. Bgs2p, a 1,3-β-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters*, **478**, 105-108.
- Nurse, P., & Thuriaux, P. 1977. Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast. *Experimental Cell Research*, **107**, 365-375.
- Padilla, G. M., Carter, B. L. A., & Mitchison, J. M. 1975. Germination of *Schizosaccharomyces pombe* spores separated by zonal centrifugation. *Experimental Cell Research*, **93**, 325-330.
- Schep, A. N., Buenrostro, J. D., Denny, S. K., Schwartz, K., Sherlock, G., & Greenleaf, W. J. 2015. Structured nucleosome fingerprints enable high-resolution mapping of chromatin architecture within regulatory regions. *Genome Research*, **25**, 1757-1770.
- Takayama, Y., & Takahashi, K. 2007. Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle. *Nucleic Acids Research*, **35**, 3223-3237.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N. J., Livak, K. J., Mikkelsen, T. S., & Rinn, J. L. 2014. Pseudo-temporal ordering of individual cells reveals dynamics and regulators of cell fate decisions. *Nature Biotechnology*, **32**, 381-386.
- Tsuyuzaki, H., Hosokawa, M., Arikawa, K., Yoda, T., Okada, N., Takeyama, H., & Sato, M. 2020. Time-lapse single-cell transcriptomics reveals modulation of histone H3 for dormancy breaking in fission yeast. *Nature Communications*, **11**, 1265.
- 露崎隼, 細川正人, 竹山春子, 佐藤政充. 2020. シングルセル RNA-seq 解析から明らかになった分裂酵母の目覚め機構 バイオサイエンスとインダストリー (B&I) **78**:507-509

比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の分子基盤の解明

田 淵 光 昭

香川大学農学部応用生物科学科
〒761-0795 香川県木田郡三木町大字池戸2393

Studies on the molecular basis of virulence factors of the causal agent for olive bacterial wilt disease by comparative genomic analysis

Mitsuaki Tabuchi

Faculty of Agriculture, Kagawa University
2393 Ikenobe, Miki-cho, Kagawa 761-0795

Olive bacterial wilt was first reported in Kagawa prefecture in Japan in 2017. *Ralstonia pseudosolanacearum*, the causal agent of bacterial wilt disease in Solanaceae plants, was identified as the causal agent of olive bacterial wilt disease. In this study, we aimed to identify specific virulence factors for *R. pseudosolanacearum* isolated from olive bacterial wilt and to elucidate the mechanism of infection of olives. To search for specific virulence factors of the pathogen, 26 strains isolated from 6 prefectures in Japan were classified based on phylotype, sequevar, and biovar. The characterization of the strains showed that 20 out of 26 strains were classified as phylotype I, sequevar 14, and biovar 3. These results suggest that *R. pseudosolanacearum* strains with specific genetic backgrounds infect olives and cause olive bacterial wilt. Whole genome sequence analyses of eight olive bacterial wilt strains were performed by next-generation sequencing (NGS), and comparative genomic analyses were conducted. Especially, the type III secretion effectors (T3Es) repertoires of each strain were compared with bacterial wilt strains isolated from tomato, and eggplant, and identified three effectors, RipBE, RipBK, or RipBQ specific to the genome of olive bacterial wilt strains. To investigate the molecular functions of the effectors from olive bacterial wilt strains, 72 T3Es from the olive bacterial wilt strain, YPPS1660, were systematically expressed in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Among them, we found that expression of RipBK, which is specifically harbored by some olive bacterial wilt strains, strongly inhibited yeast growth and that this growth inhibition was dependent on the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domain in the RipBK molecule. The TIR domain has recently been shown to possess NADase activity that degrades NAD⁺. Therefore, we measured the NADase activity of recombinant RipBK protein expressed in *Escherichia coli* and found that it showed only a very low activity. Interestingly, the addition of yeast lysate to the recombinant RipBK protein increased NADase activity in a concentration-dependent manner. This suggests that NADase activity of RipBK is stimulated by a substance(s) derived from host eukaryotes.

Key words: *Ralstonia pseudosolanacearum*, olive bacterial wilt disease, *Saccharomyces cerevisiae*, genome, host jumping

緒 言

オリーブ立枯病は、2017年8月小豆島（香川県）において国内ではじめて確認された。症状としては、枝や

幹の導管部周辺の変色、葉枯、急速な萎凋枯死を示す（氏家, 2021）。オリーブ立枯病に罹病したオリーブから分離された原因菌は、解析の結果、*Ralstonia solanacearum* と呼ばれる一般的に青枯病菌としてナスやトマト、ピーマンなどの野菜類の病原菌として知られていた菌であることが判明した（Fig.1A）。*R. solanacearum* によるオリーブへの感染は、国内で6県（Fig.1B）、ブラジル（Tebaldi *et al.*, 2014）や中国（Jiang *et al.*, 2017）などでも確認されているが、感染経路や病原因子については不明である。

E-mail: tabuchi.mitsuaki@kagawa-u.ac.jp

共同研究者：市村 和也（香川大学農学部）,

秋光 和也（香川大学農学部）,

生咲 巖（香川県農業試験場府中果樹研究所）,

氏家 章雄（香川県農業試験場病害虫防除所）,

松本 英治（香川県農業試験場・オリーブ研究所）.

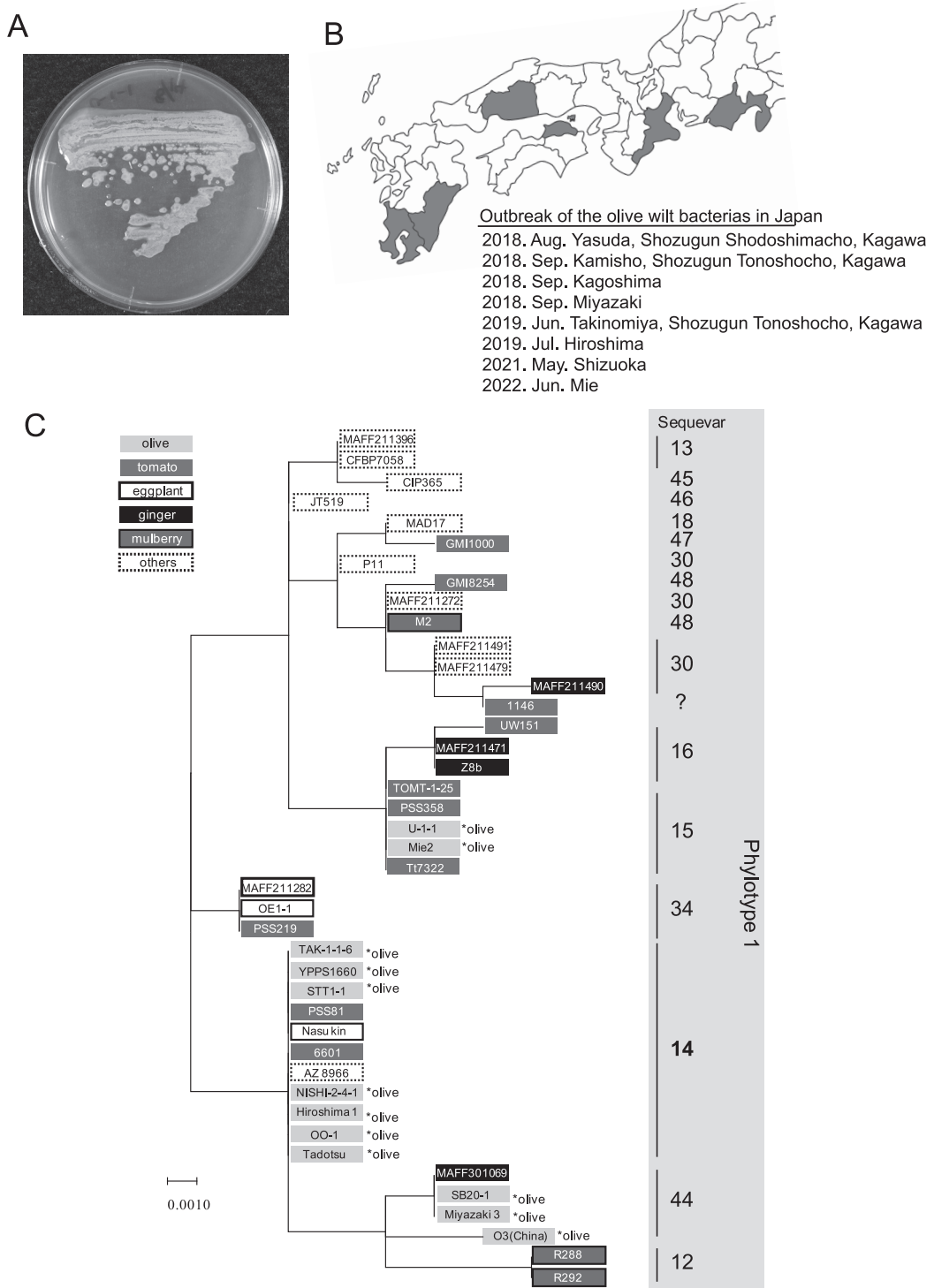


Fig. 1 Characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* isolated from the olive tree with olive bacterial wilt disease in Japan. (A) Colonies of the olive bacterial wilt strain, U-1-1, on rich B agar medium. (B) The locations where the olive bacterial wilt bacteria were isolated. Olive bacterial wilt occurs in olive groves in western Japan, including Kagawa, Kagoshima, Hiroshima, Miyazaki, Shizuoka, and Mie prefectures. (C) The phylotypes and sequevars of *R. pseudosolanacearum* from the olive bacterial wilt. The phylotype and sequevar were determined based on the DNA sequences of the *egl* gene encoding an endoglucanase. The major class of the olive bacterial wilt strains was classified as phylotype I, sequevar 14 and biovar 3.

青枯病菌には宿主範囲、地理的分布、病原性、疫学的特徴および生理・生化学的性質等の異なる系統の存在が広く知られている。Safniら(2014)によって青枯病菌と類縁細菌が分類学的に詳細に解析された結果、これらを種のレベルで *R. solanacearum* (phyloptype II), *R. pseudosolanacearum* (phyloptype I, III), *R. syzygii* (phyloptype IV) の三つのグループに類別することが提案されている。また、分子生物学的手法を用いた解析が進み、青枯病菌は単一種というよりもむしろ複数種の複合体 (*Ralstonia solanacearum* species complex, RSSC) と定義する方が適切であると考えられている (Fegan & Prior, 2005)。RSSCは、その病原性、広い宿主範囲、広範な地理的分布、土壤中での長期の残留性から、最も破壊的な植物病原菌のひとつに数えられている (Mansfield *et al.*, 2012)。RSSCは、感染を成立させるために、細胞外多糖 (EPS) や植物ホルモンの産生、細胞壁分解酵素の分泌、運動性など、様々な病原性決定因子を利用している (Genin & Denny, 2012)。しかし、RSSCの主要な病原性決定因子は、III型分泌系 (T3SS) と呼ばれる注射針状の構造物とそれによって宿主細胞内に注入される病原因子エフェクターである (Landry *et al.*, 2020)。RSSCは70種類以上もの多様なエフェクターを有し、この多様性が宿主域の広さと関連付けられている (Peeters *et al.*, 2013)。

植物は病原体感知の方法が異なる2つの自然免疫機構を有している。1つは病原体が共通して持つ細菌の鞭毛や分泌タンパク質などの病原体関連分子パターン (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) を、細胞膜または細胞質に存在するパターン認識受容体 (PRRs: pattern recognition receptors) で感知する PAMPs 誘導免疫 (PTI: PAMPs-triggered immunity) である (Halim *et al.*, 2009; McCann & Guttman, 2008; Deslandes & Rivas, 20012)。これに対し、植物病原菌側は植物細胞に T3SS を介して、エフェクターを分泌することにより PTI を抑制し感染、増殖する (Jones & Dangl, 2006)。しかし、宿主以外の植物では、病原菌との共進化の過程で獲得した抵抗性タンパク質 (R タンパク質) によりエフェクタータンパク質が特異的に認識されることにより、強力な免疫反応である過敏反応 (HR: Hypersensitive response) と呼ばれるプログラム細胞死が引き起こされる。これをエフェクター誘導免疫 (ETI: Effector-triggered immunity) と呼ぶ (Jones & Dangl, 2006)。ETI は HR により感染部位を自発的に壊死させることで感染を防止し、その後、全身獲得抵抗性 (SAR: systemic acquired resistance) により感染を受けていない周辺の組織においても抵抗性を誘導する。また、R タンパク質に認識されるエフェクターは非病原力遺伝

子 (avirulence gene, AVR) と呼ばれる。遺伝子対遺伝子説に基づいた R タンパク質を持つ植物に病原菌が感染すると AVR として認識され、ETI が誘導されることで病原菌は病気を引き起こせない。よって ETI 誘発に関わるエフェクターの標的解析は、その病原菌の感染拡大の制御法の考案に役立つと考えられる (Block & Alfano, 2011)。

エフェクターは宿主との共進化の過程で病原菌ごとに独自に獲得した様々な機能を持つタンパク質であり、1種類の病原菌でも数十種類の異なった生理的な作用を持つエフェクターを有する。そのため従来の解析方法ではエフェクターの機能解明が困難である。近年、エフェクターの機能解析法の1つとして出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を利用した方法が報告されている (Valdivia, 2004; Sigger & Lesser, 2008; Popa *et al.*, 2016a)。酵母細胞内で発現させると増殖阻害を引き起こすエフェクターが複数同定されている。我々は、出芽酵母が高等真核生物の生物学的プロセスを高度に保存していることや、全ゲノム配列が解析された非常に扱いやすいモデル生物であることに注目し、酵母発現系を用いたエフェクターの機能解析を行っている。

多くのエフェクターは、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、プロテインキナーゼ、トランスフェラーゼなどの酵素活性が予測される触媒ドメインをその一次配列上を含み、それらのいくつかは、真核生物のカウンタパートに勝る高い活性を有する (Levin *et al.*, 2010)。しかし、全てのエフェクターが大腸菌などの細菌内で発現させたときに酵素活性を示すわけではなく、活性化にはさらなる真核生物因子との相互作用が必要である (Popa *et al.*, 2016b)。例えば、我々は、グルタチオンを分解する γ -Glutamyl cyclotransferase (GGCT) 活性を持つ *R. pseudosolanacearum* のエフェクター RipAY が、宿主内チオレドキシンと相互作用することで、GGCT 活性を爆発的に増強させることを明らかにしている (Fujiwara *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2020)。

本研究では、青枯病菌としてナスやトマトなどの草本類に感染する *R. pseudosolanacearum* が、どのようにして宿主域を拡大し、樹木であるオリーブに感染できるようになったのかを明らかにすることを目的として研究を行った。まず、日本各地で分離されたオリーブ立枯病菌8菌株の全ゲノム配列を解析し、ナスやトマトに感染する青枯病菌との比較ゲノム解析によりオリーブ立枯病菌が特異的に保有するエフェクターを同定した。さらに、オリーブ立枯病菌株が保有するエフェクターを網羅的に酵母において発現させ、各種ストレス条件下における増殖阻害活性を指標とするエフェクターの網羅的機能解析を行った。その結果、本研究で調べた72個のエフェク

ターのうち、23個のエフェクターが酵母に増殖阻害を引き起こすことを見出した。オリーブ立枯病菌が特異的に保有するエフェクターの一つである RipBK は、分子内にある TIR ドメインが持つ NADase 活性依存的に酵母に強い増殖阻害を引き起こした。大腸菌で発現させた RipBK 組換えタンパク質は低い NADase 活性しか示さなかったが、RipBK 組換えタンパク質に酵母抽出液を添加することで NADase 活性が上昇し、RipBK は宿主真核生物由来因子依存的に活性化することが考えられた。

今後さらにオリーブ立枯病菌のエフェクターの機能解析が進むことで、本菌のオリーブへの宿主拡大のメカニズムの理解、並びにオリーブ立枯病菌の感染拡大防止や被害の縮小に大きく貢献することが期待される。

実験方法

供試菌と培養条件

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 (Brachmann *et al.*, 1998) の栄養培地として YPD 培地 (1% Bacto Yeast Extract, 2% Bacto Peptone, 2% Glucose)、選択培地 SD 寒天培地 (0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base, 2% Glucose, 2% Bacto Agar)、SD 液体培地 (0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base, 2% Glucose) を使用した。また、発現誘導培地として、SGal 液体培地 (0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base, 2% Galactose) および SGal 寒天培地 (0.67% Bacto Yeast Nitrogen Base, 2% Galactose, 2% Bacto Agar) を使用した。SD 培地および SGal 培地には、必要に応じて L-ヒスチジン (4mg/mL)、L-ロイシン (6mg/mL)、L-リジン (4mg/mL)、L-トリプトファン (4mg/mL)、L-メチオニン (4mg/mL)、ウラシル (4mg/mL)、アデニン (4mg/mL) を加えた。*E. coli* DH5 α (Takara Bio.) の培養には LB 培地 (1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl)、SOC 培地 (2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose)、MMI 培地 (1.3% Bacto Tryptone, 2.5% Bacto Yeast Extract, 0.4% Glycerol, 20mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.85% NaCl) を使用し、必要に応じてアンピシリン (50 μ g/mL)、カナマイシン (25 μ g/mL) を加えた。*S. cerevisiae* は 26 $^{\circ}$ C または 30 $^{\circ}$ C、*E. coli* は 37 $^{\circ}$ C、*R. pseudosolanacearum* は 28 $^{\circ}$ C で培養した。

オリーブ立枯病菌ゲノム DNA 抽出

5mL の rich B 液体培地 (1% Bacto Peptone, 0.1% Bacto Yeast Extract, 0.1% Bacto Casamino Acids, 100 μ g/mL Polymyxin B) に *R. pseudosolanacearum* 株を植菌し、30 $^{\circ}$ C で一晩培養した。培養液をエッペンドルフチュー

ブに移し、14,000rpm、1分間遠心し、上清をアスピレーターで吸い取り菌体を回収した。

菌体に 300 μ L の TE buffer に懸濁し、15 μ L の 0.5M EDTA pH 8.0、15 μ L の 10% SDS、3 μ L のプロテイナーゼ K を添加し、56 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。

プロテイナーゼ K 処理後の菌体懸濁液に 300 μ L の TE 飽和フェノールを添加後、転倒混和し、さらに 300 μ L のクロロホルムを添加後、5分間転倒混和し、14,000rpm、10分間遠心した。

上層液を新しいエッペンドルフチューブに移し、200 μ L の TE 飽和フェノール、200 μ L のクロロホルムを添加後、5分間転倒混和し、14,000rpm、10分間遠心した。

上層液を新しいエッペンドルフチューブに移し、400 μ L のクロロホルムを添加後、5分間転倒混和し、14,000rpm、10分間遠心した。

上層液を新しいエッペンドルフチューブに移し、3 μ L の RNase A (10mg/mL) を添加後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。

RNase A 処理後の溶液に 200 μ L の TE 飽和フェノール、200 μ L のクロロホルムを添加後 5 分間転倒混和し、14,000rpm、10分間遠心後、上層を 400 μ L 新しいエッペンドルフチューブに移した。この操作を 4 回繰り返した。

4 回の TE 飽和フェノール/クロロホルム抽出後の上槽液に 40 μ L の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、1mL の 95% EtOH を添加後、14,000rpm、10分間遠心し、上清をアスピレーターで吸い取った。

500 μ L の冷却した 70% EtOH を加え、14,000rpm、10分間遠心し、アスピレーターで上清を吸い取り、遠心乾燥機で完全に乾燥させた。

最終的に得られたゲノム DNA に 50 μ L の TE を加え、ボルテックスで完全に溶解させた。OD₂₆₀ を測定、DNA 濃度を算出し、-25 $^{\circ}$ C で保存した。

phyloTYPE の決定

オリーブ立枯病菌の *egl* の塩基配列を決定するために、鋳型に *R. pseudosolanacearum* 各菌株のゲノム DNA を用いて、Forward primer (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') と Reverse primer (5'-GCGTTGCCCGGCACG AACACC-3') で PCR 反応を行った (堀田・土屋, 2012)。反応条件は、96 $^{\circ}$ C 1min 後、96 $^{\circ}$ C 30sec、55 $^{\circ}$ C 30sec、68 $^{\circ}$ C 1min を 30cycle 後、68 $^{\circ}$ C 7min で行った。得られた PCR 産物を電気泳動後、FAVORGEN 社製の GEL/PCR Purification Mini Kit を用いて目的の増幅断片を回収し、Forward primer でシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。遺伝子の塩基配列をもとに、MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021; <https://www.megasoftware.net/>) を用いて系統樹を作製し、それを基に PhyloTYPE を決定した。

sequevar の決定

目的のオリーブ立枯病菌の *egl* 配列と既に sequevar が分かっている菌の *egl* 配列を比較して、塩基配列が一致する、または 99% 以上の相同性を示す場合は、同じ sequevar であると判定した (堀田・土屋, 2012)。

biovar の決定

オートクレーブによって滅菌した基礎培地 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 500 mg, KCl 100 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, peptone 500 mg, 8 mg/mL Bromothymol blue / 0.1 N NaOH 5 mL, agar 1.5 mg, water 500 mL) を 50℃ まで冷まし、滅菌済みの試験管 7 本に培地を 3 mL ずつ加えた。それぞれの試験管に最終濃度 1% になるように 10% 炭素源 (マルトース, ラクトース, セロピオース, マンニトール, ソルビトール, ダルシトール) を加えて、よく混合した。対象として、滅菌水を加えた培地を準備した。菌体を固形培地からかき取って滅菌水に懸濁し、 $\text{OD}_{600} = 0.01$ (約 10^7 cfu/mL) に調整した。菌液をパスツールピペットで 2~3 滴ずつ試験管に添加し、28℃ で 1 週間から 3 週間培養し、炭素源資化に伴う培地の pH 変化を培地の色の変化として観察した。資化された炭素源の違いによって biovar を決定した (堀田・土屋, 2012)。

全ゲノムシーケンス解析

全ゲノムシーケンス解析は、Illumina 社 MiSeq によるショートリードシーケンスと Oxford Nanopore Technologies 社 GridION によるロングリードシーケンスにより得られた配列情報の *de novo* ハイブリッドアセンブリにより完全長ゲノムシーケンスを取得した。ライブラリーの構築、データの取得・解析は、ゲノムリード株式会社 (高松市) に委託した。

エフェクター遺伝子のクローニングと酵母発現系による機能解析

エフェクター遺伝子のクローニングには Gateway cloning 法を使用した (Thermo Fisher Scientific)。*attB1* 配列および *attB2* 配列をそれぞれ 5'-末端に付加したエフェクター遺伝子 ORF 領域特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて、オリーブ立枯病菌 YPPS1660 株ゲノム DNA を鋳型として PCR 法によりエフェクター遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を BP 反応によりドナーベクター pDONR207 にクローニングし、エフェクターカセットドナーライブラリーを作製した。ドナークローンは更に LR 反応により *GALI* プロモーターの制御下で目的遺伝子の発現が可能な pMT751 酵母発現ベクター (Fujiwara *et al.*, 2016) に組み込み、エフェクター酵母発現プラスミドライブラリー

を作製した。得られたエフェクター酵母発現プラスミドは、酵母 BY4173 株にそれぞれ形質転換し、得られた形質転換体を滅菌水に懸濁して $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.0$ に調整した菌液を 10 倍, 10^2 倍, 10^3 倍希釈した段階希釈液を調製した。ガラクトースを炭素源とする誘導培地およびグルコースを炭素源とする非誘導培地に、段階希釈液をスポットし、26℃, 3 日間培養した。菌の増殖を Image J により定量し、エフェクターによる増殖阻害を評価した。

組換えタンパク質の作製・精製法

RipBK を pCold Pros2 プラスミドに組み込み、N 末端に His₆-tag とタンパク質可溶化タグである ProS2 タグを融合した RipBK WT と活性中心変異体 E286Q 組換えタンパク質を大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) pLysS (Novagen) で発現させ His Trap HP カラム (Cytiva) で精製した。

NADase 活性測定

エッペンドルフチューブに大腸菌で発現させ、His₆-tag により精製した RipBK 組換えタンパク質 2.5 μg を加え、0.6 mM NAD⁺ 溶液 40 μL 添加して全量を 500 μL とし、37℃ で 1 時間インキュベートした後、-80℃ で凍らせることで反応停止させた。これをサンプルとして、Cytiva 社の Resource™ Q (Cytiva 17-1177-01, pack of 1 mL, expiry 2019-08) を用いた HPLC により解析した。溶出は、水:0.7 M 重炭酸アンモニウム = 100:0 (0 min), 95:5 (5 min), 90:10 (10 min), 75:25 (15 min), 0:100 (17 min), 0:100 (19 min), 100:0 (20 min) の条件でグラジエントをかけ、流量 1.0 mL/min で行った。

酵母抽出液添加による RipBK の活性化

RipBK WT, E286Q タンパク質の C 末端に Protein A-tag を付加させた融合遺伝子発現プラスミドを形質転換した大腸菌を、アンピシリン (50 μg/mL), クロラムフェニコール (25 μg/mL) を含む 100 mL LB 液体培地に植菌し、37℃ で対数増殖期まで培養後、IPTG を 0.2 mM になるように添加してタンパク質の発現を誘導した。誘導後、遠心分離により得られた菌体にプロテアーゼインヒビターを含む IPP150 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) を 5 mL 加え、懸濁後、超音波破碎により菌体を破碎した。大腸菌破碎液の遠心分離により得られた上清 1 mL に予め IPP150 buffer で平衡化した IgG-beads (Thermo Fisher Scientific) を 25 μL 加え、IgG-beads に RipBK-Protein A 融合タンパク質を固定した。

RipBK WT-Protein A または活性中心変異体 RipBK E286Q-Protein A を固定化した IgG-beads に酵母抽出液、オリーブ立枯病菌抽出液 (400 μg/mL) またはコントロー

ルとして IPP150 buffer を 1mL 添加し、4℃で1時間インキュベートした。その後、IgG-beads を IPP150 buffer で3回洗浄し、洗浄後の IgG-beads を用いて NADase 活性を測定した。

結果および考察

オリーブ立枯病菌は特定の遺伝子型に類別された

R. solanacearum を internal transcribed spacer 領域、endoglucanase 遺伝子 (*egl*) および *hrpB* 遺伝子の塩基配列を基に分類する phylotype は4つの主要な clade (phylotype I ~ IV) に区別することができる (曳地, 2009)。各 phylotype は複数の sequevar から構成され、この sequevar は *egl* 遺伝子の保存領域の塩基配列の違いに基づき決定される (堀田・土屋, 2012)。また、炭素源資化の違いに基づいて分類する biovar も世界的に頻用されている。この3つの分類法を用いて日本国内6県で発生したオリーブ立枯病から分離された26菌株の遺伝子型、生物型を調べた。その結果、26菌株中すべての菌株が phylotype I に分類された (Fig.1C, Table 1)。そのうち20菌株は sequevar 14, biovar 3 に、4菌株は sequevar 15, biovar 4 に、2菌株は sequevar 44, biovar 3 に分類され、特定の遺伝子型を持った菌株がオリーブ立枯病菌として分離されていた (Fig.1C, Table 1)。特に phylotype I, sequevar 14, biovar 3 に分類された菌

株は、香川県小豆島町内の異なる3地域で分離された株が12菌株、広島県江田島で分離された株が6菌株、香川県高松市と同県多度津町で分離された株がそれぞれ1菌株あり、異なる地域で同一の遺伝子型を持つ菌株がオリーブ立枯病菌として分離されていた。また、中国でオリーブから分離された *R. pseudosolanacearum* は、sequevar 14 と sequevar 44 との報告がある (Jiang *et al.*, 2017)。以上の結果から特定の遺伝的背景を持つ *R. pseudosolanacearum* 菌株がオリーブに感染し、オリーブ立枯病を引き起こしていることが考えられた。

オリーブ立枯病菌のゲノム解析

sequevar, biovar の違いおよび分離地の違いをもとに選抜した菌株について全ゲノム配列を決定し、これらのゲノムを比較することでオリーブに対する病原性に関与する共通因子の同定が可能であると考えられたため、8種類のオリーブ立枯病菌 (YPPS1660, U-1-1, OO-1, Tadotsu, Nishi2-4-1, Hiroshima 1, SB20-1, Mie2) を次世代シーケンサー (NGS) により全ゲノム配列を決定した (Fig.2)。ショートリードシーケンスおよびロングリードシーケンスで得られたリード配列を用いてハイブリッドアセンブリを行い、完全長のゲノム配列を取得した。取得したゲノム配列を DFAST (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) を用いてアノテーションした。ほとんどの菌株は、約3.9Mbの染色体と2Mbのメガプラスミドから構成さ

Table 1 Genetic characterization of 21 olive bacterial wilt strains

Strain name	Isolation host	Isolation area	phylotype	sequevar	biovar
U-1-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	15	4
U-2-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	15	4
YPPS1660	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
YPPS1661	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
YPPS1662	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
TAK-1-1-6	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
TAK-1-2-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
STT2-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
STT1-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
STT1-5	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
STT1N	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
STT4	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
NISHI-2-4-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
NISHI-2-6-1	Olive	Japan, Kagawa, Shodoshima	1	14	3
Hiroshima 1	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
Hiroshima 2	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
Hiroshima 3	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
Hiroshima 4	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
Hiroshima 5	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
Hiroshima 6	Olive	Japan, Hiroshima, Edajima	1	14	3
OO-1	Olive	Japan, Kagawa, Takamatsu	1	14	3
Miyazaki3	Olive	Japan, Miyazaki	1	44	3
Tadotsu	Olive	Japan, Kagawa, Tadotsu	1	14	3
SB20-1	Olive	Japan, Shizuoka, Kosai	1	44	3
Mie 1	Olive	Japan, Mie	1	15	4
Mie 2	Olive	Japan, Mie	1	15	4

比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の分子基盤の解明

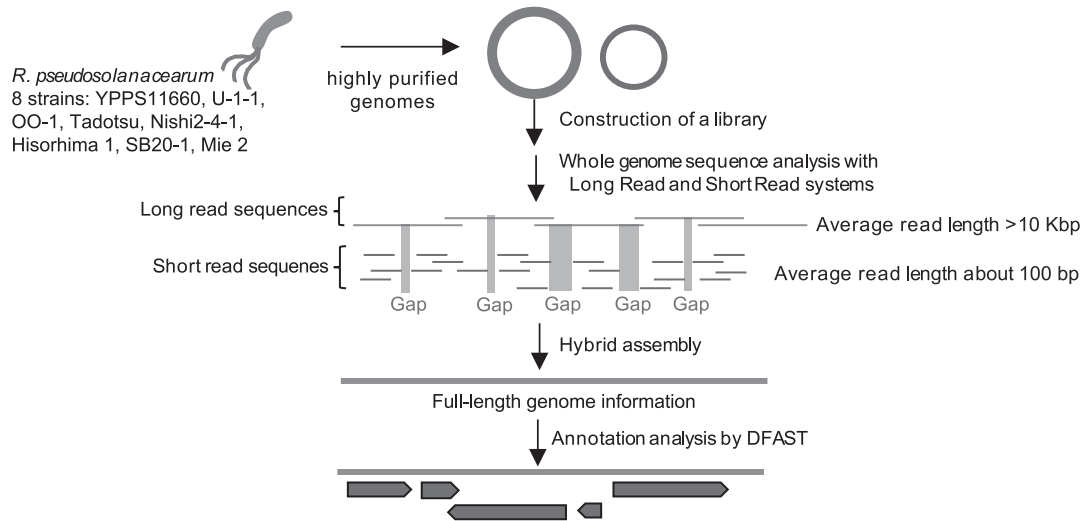


Fig. 2 Flowchart for obtaining the full-length genome sequences of *R. pseudosolanacearum* isolated from olive tree with olive bacterial wilt disease in Japan. Genomic DNAs were analyzed by two next-generation sequencers, a long-read system, and a short-read system, and hybrid assembly was performed to obtain full-length genome sequences. The acquired genome information was annotated by DFAST.

Table 2 The genome sequence information of 8 olive bacterial wilt strains

Strain name	sequevar /biovar	Chromosome (bp)	Megaplasmid (bp)	Plasmid (bp)	GC Content (%)	No. of CDSs	No. of rRNA	No. of tRNA
YPPS1660	14/3	3,929,907	2,076,036	-	66.8	5,288	12	67
U-1-1	15/4	3,936,495	1,965,779	-	66.8	5,185	12	67
OO-1	14/3	3,855,026	2,062,917	-	66.9	5,230	12	67
Tadotsu	14/3	3,918,994	2,075,525	-	66.8	5,283	12	67
Nishi2-4-1	14/3	3,907,702	2,073,437	-	66.8	5,267	12	67
Hiroshima 1	14/3	5,906,966	-	-	66.9	5,181	12	66
SB20-1	44/3	3,699,040	2,003,193	-	67.0	4,944	12	66
Mie 2	15/3	3,981,625	1,950,030	2,184	66.8	5,244	12	67

れており、それぞれ約5,000個のCDS、12個のrRNA、67個のtRNAが同定された。しかし、Hiroshima 1株はメガプラスミドと染色体が融合したと考えられる1つの環状染色体ゲノムを有していた。Mie2株はメガプラスミドに加えて、2,184bpの小さなプラスミドを有しており、菌株によりゲノムの構成に違いが見られた (Table 2)。当初、香川県から苗木などを介して、他県のオリーブ農園に感染が拡大したことが懸念されていたが、ゲノム解析の結果から特定のクローンが本病害の拡大に関係していないことが証明された。

エフェクターレパートリーに焦点を当てた比較ゲノム解析
植物病原細菌が有する病原性関連因子としては、植物毒素、植物ホルモン、植物組織破壊酵素、菌体外多糖、Ⅲ型分泌系エフェクター等が考えられる (露無ら, 2003)。特に *R. solanacearum*s species complex, RSSC は、他の植物病原細菌よりも多様なエフェクター (70種類以上) を有しており、その多様性が宿主域の広さとも関連付けられている。そこで、エフェクターに焦点を当てて更に比較ゲノム解析を行った。オリーブ立枯病菌8菌株 (YPPS1660, U-1-1, Tadotsu, OO1, SB20-1, Hiroshima 1,

Nishi2-4-1, Mie 2) が保有するエフェクターレパートリーを比較するため, RSSC エフェクター予測サイト Ralsto T3E (<https://iant.toulouse.inra.fr>) を使用し, 各菌株が保有するエフェクターを予測した. その結果, それぞれの菌株が 59~85 個前後のエフェクターをゲノム上に保有していることが明らかとなった (Tables 3, 4). さらに, 青枯病菌 (OE1-1, GMI1000) とオリーブ立枯病菌 8 菌株について, 全てのエフェクターレパートリーを比較した (Table 4). その結果, すべての *R. pseudosolanacearu* 菌株が保有するエフェクターとして 36 個のエフェクターが見出された. これらのエフェク

ターは *R. pseudosolanacearu* 菌株間で共通の病原性に機能するコアエフェクターであると考えられる. 青枯病菌が保有しておらず, SB20-1 以外のオリーブ立枯病菌が保有するエフェクターとして RipBE が, U-1-1, NISHI2-4-1, Mie 2 以外のオリーブ立枯病菌が保有するエフェクターとして RipBQ と RS_T3E_Hyp18 が, U-1-1, SB20-1, Hiroshima 1, Mie 2 以外のオリーブ立枯病菌保有するエフェクターとして RipBK が見出された. 一方, RipBO は, OE1-1 と GMI1000 は保有するが, 今回調べたすべてのオリーブ立枯病菌 8 菌株のゲノム上には見出されなかった.

Table 3 Comparison of the number of effectors possessed by each bacterial wilt strain.

Strain Name	YPPS 1660	U-1-1	Tadotsu	OO1	SB20-1	Hiroshima 1	Nishi2-4-1	Mie 2	GMI 1000	OE1-1
sequevar/biovar	14/3	15/4	14/3	14/3	44/4	14/3	14/3	15/4	47/3	34/4
Host	Olive	Olive	Olive	Olive	Olive	Olive	Olive	Olive	Egg plant	Tomato
Number of effectors*	85	85	63	64	60	59	62	65	76	82

* Predicted by Ralsto T3E (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev3/#>)

Table 4 T3E repertoires of bacterial wilt strains isolated from olive tree and Solanaceae plants.

Strain Name	YPPS 1660	U-1-1	Tadotsu	OO1	SB20-1	Hiroshima 1	NISHI 2-4-1	Mie 2	GMI 1000	OE1-1
sequevar/biovar	14/3	15/4	14/3	14/3	44/3	14/3	14/3	15/4	47/3	34/4
RipA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipA2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RipA3	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
RipA4	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
RipA5	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
RipAA	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RipAB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAC	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RipAD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAF1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
RipAG	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
RipAH	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
RipAI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAJ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RipAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAP	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RipAQ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAR	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

Continued on the next page.

比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の分子基盤の解明

Table 4 continued

Strain Name	YPPS 1660	U-1-1	Tadot su	OO1	SB20- 1	Hirosh ima 1	NISHI 2-4-1	Mie 2	GMI 1000	OE1-1
sequevar/ biovar	14/3	15/4	14/3	14/3	44/3	14/3	14/3	15/4	47/3	34/4
RipAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAT	+	MULTI	+	+	+	+	+	MULTI	+	+
RipAU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAW	+	+							+	+
RipAX1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RipAX2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
RipAY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipAZ1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipBA	+	MULTI	+	+	+	+	+	+	MULTI	MULTI
RipBE	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
RipBJ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RipBK	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
RipBM	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RipBO	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
RipBP	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
RipBQ	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
RipC1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
RipC2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
RipD	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
RipE1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipF1	MULTI	MULTI	+	+	+	+	+	+	-	+
RipG1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
RipG2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipG4	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
RipG5	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
RipG6	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
RipG7	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RipH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipH2	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
RipH3	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
RipI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RipJ	+	MULTI	+	+	MULTI	+	+	MULTI	+	+
RipL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipO1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipP1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RipP2	MULTI	MULTI	+	+	-	+	-	+	+	+
RipP3	-	-	-	-	-	-	-	-	MULTI	-
RipQ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipS1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
RipS2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RipS3	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
RipS4	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
RipS5	MULTI	MULTI	+	-	+	+	-	+	+	+
RipS6	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
RipS8	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
RipT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RipTAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipTPS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
RipU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipV1	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI	MULTI
RipW	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RipZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RS_T3E_Hyp6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
RS_T3E_Hyp7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
RS_T3E_Hyp8	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
RS_T3E_Hyp18	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-

次に RipBE, RipBK, RipBQ について, 本研究で使用したオリーブ立枯病菌全 26 菌株での保有状況を各遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法により調べた (Fig.3). RS_T3E_Hyp18 は, 解析当初, エフェクターとして同定されていなかったため, 解析対象から外している. PCR の結果, sequevar 14, biovar 3 に分類されたほとんどの菌株が RipBE, RipBK, RipBQ の 3 つすべてを保有していた. また, sequevar 15, biovar 4 である U-1-1, U-1-2, Mie1, Mie2 は RipBE のみ保有していた. Sequevar 44, biovar 3 である Miyazaki, SB20-1 は RipBQ のみを保有していた (Fig.3). これらの結果からオリーブ立枯病菌は, 通常ナスやトマトに感染する青枯病菌が持たないエフェクターを有し, これらのエフェクターの獲得がオリーブへの宿主域の拡大と関連する可能性が考えられた.

酵母発現系を用いたオリーブ立枯病菌エフェクターの網羅的機能解析

多くのエフェクターは出芽酵母で発現させた場合, そのエフェクターが有する活性に依存して酵母に増殖阻害を引き起こすことから, 酵母を用いてエフェクターの機能解析が可能であることが明らかにされている (Valdivia, 2004; Sigger & Lesser, 2008; Popa *et al.*, 2016a). そこで, オリーブ立枯病が保有するエフェクターについて酵母発現系を用いて網羅的な機能解析を行った. オリーブ立枯病 YPPS1660 菌株が保有する 85 個のエフェクター遺伝子を Gateway cloning 法を用いてドナーベクターに組み込み, これまでに 72 個のエフェクター遺伝子についてエフェクターカセットドナーライ

ブラリーを作製した. ドナーベクターを, ガラクトース誘導性 *GAL1* プロモーターを有する酵母発現ベクターに LR 反応を用いてクローニングし, 72 個のエフェクターについて増殖阻害を調べた. 多くのエフェクターは, 宿主植物の MAP キナーゼ経路などの免疫応答シグナル伝達経路を阻害する活性を有しており, 酵母においてはストレス応答にかかわるシグナル伝達経路がそのカウンターパートとして機能することから 37°C (高温ストレス応答), 高食塩 (高浸透圧ストレス応答), Myriocin (膜ストレス応答), SDS (細胞膜, 細胞壁ストレス応答) 等のストレス条件におけるエフェクター発現による酵母の生育阻害を評価した (Fig.4). その結果, RipAE, RipBK, RipAY, RipM, RipBM, RipA5, RipAN, RipR は, すべてのストレス条件において増殖阻害を示した. また, RipI, RipS6, RipAC-2, RipA1, RipA2, RipA3 は, ほとんどすべてのストレス条件において増殖阻害を示したが, 37°C において増殖阻害が見られなかった. 一方, NaCl において特異的に増殖阻害を引き起こすエフェクターとして, RipAF1, RipJ, RipQ が見出された. また, RipA4, RipAC, RipAV, RipD, RipV1-2, RipZ は, SDS に特異的に増殖阻害を示した. このようにエフェクターによっては, 特異的なストレス条件で増殖阻害を示すものが見られ, これらのエフェクターはこれらストレス応答経路を特異的に標的とする活性を有する可能性が示唆された.

さらに, 酵母で発現させたエフェクターについて GFP 蛍光を指標に観察し, 各エフェクターの細胞内局在を調べた. その結果, 発現が認められたエフェクターの多くが細胞質に局在したが, 一部のエフェクターは細胞膜

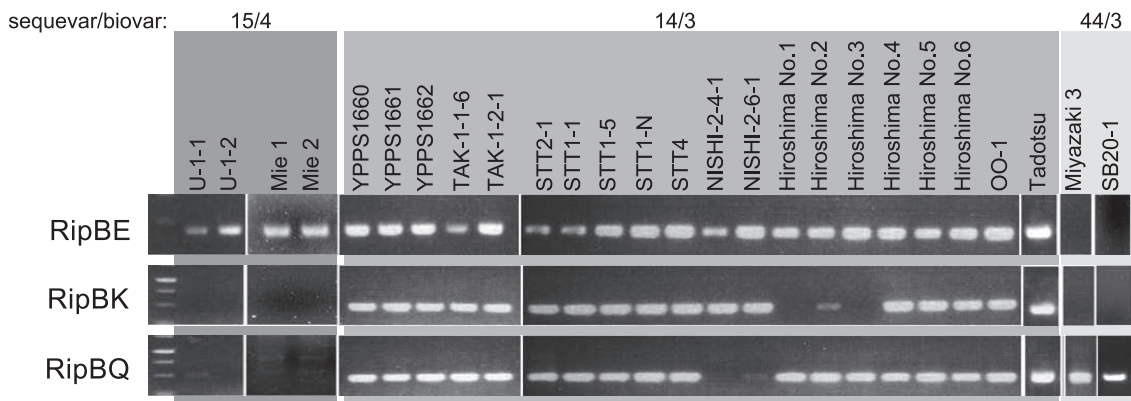


Fig.3 Results of PCR of 26 strains of *R. pseudosolanacearum* isolated from olive trees using specific primers for RipBE, RipBK, RipBQ. Eighteen strains out of 20 sequevar 14, biovar 3 strains possessed all RipBE, RipBK, RipBQ and some strains (sequevar 15, biovar 4 strains; U-1-1, U-1-2, Mie 1, Mie 2, and sequevar 44, biovar 3 strains; Miyazaki 3, SB20-1) possessed either RipBE or RipBQ.

比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌で見出された Host-jump 現象の分子基盤の解明

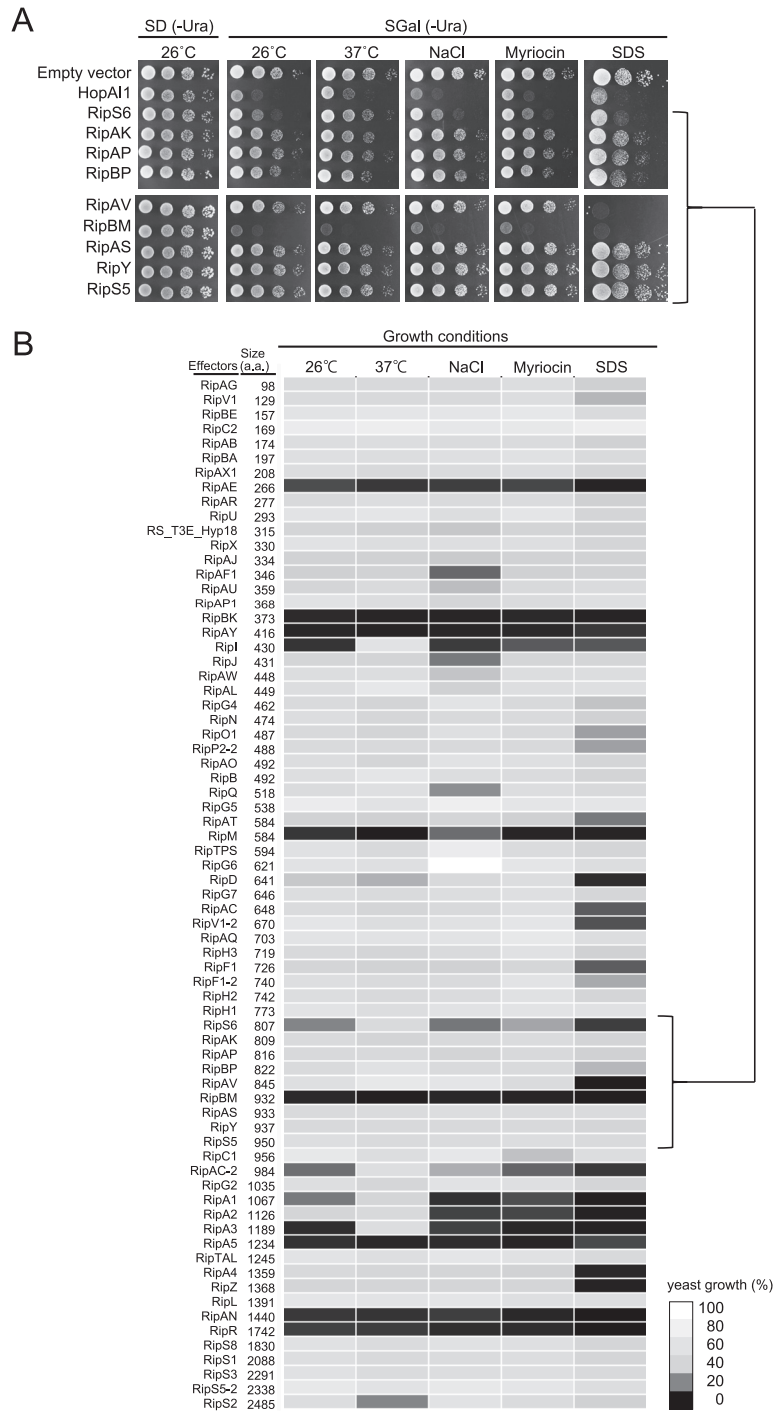


Fig. 4 Comprehensive functional analysis of 72 effectors from the olive bacterial wilt strain, YPPS1660, using a yeast expression system. (A) Yeast cells carrying effector expression plasmids whose expression is controlled under the *GAL1* promoter were spotted with a serial dilution on SD (-Ura) plates, the suppressed condition, and SGal (-Ura), the induced condition, plus various stresses. The cells were incubated for 3-4 days at the indicated temperatures. Representative results of growth inhibition, when the nine effectors are expressed in yeast, are shown. The empty vector was used as a control with no growth inhibition, and HopA11 from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* was used as a control for effectors showing growth inhibition. (B) Each plate was photographed, and the cell growth was quantified using Image J software. The relative growth defects were normalized to the growth of yeast cells carrying the empty vector and presented graphically as a gray-scale map (100% = yeast growth of cells carrying the empty vector, 0% = no growth).

(PM), 核, ミトコンドリア, 小胞体 (ER), ゴルジ体など細胞内の様々なオルガネラに局在した (Fig.5). エフェクターは, 細胞内において様々なオルガネラに局在することでその機能を発現することが知られており, これらのエフェクターも宿主である植物においては特定のオルガネラに局在することで機能を発現し, 病原性を発揮していることが考えられた.

オリーブ立枯病菌エフェクター RipBK による強い酵母増殖阻害は TIR ドメインに依存する

オリーブ立枯病菌株が特異的に保有するエフェクター

の一つである RipBK は, 酵母において発現させると強い増殖阻害が観察された (Fig.4). そこで, タンパク質ドメイン予測サイト Pfam (<http://pfam.xfam.org>) を用いて RipBK の機能ドメインの推定を行った. その結果, アミノ酸残基 241~334 a.a. の領域に Toll/Interleukin-1 受容体 (TIR) ドメインを持つことが明らかになった. RipBK 分子内のどの部分が酵母増殖阻害活性に重要であるかを調べるため, N 末端および C 末端から段階的に欠失させた各種 RipBK 欠損変異体を作製した. その結果, RipBK の酵母増殖阻害には, TIR ドメインとその周辺アミノ酸残基が重要であることがわかった (Fig. 6A).

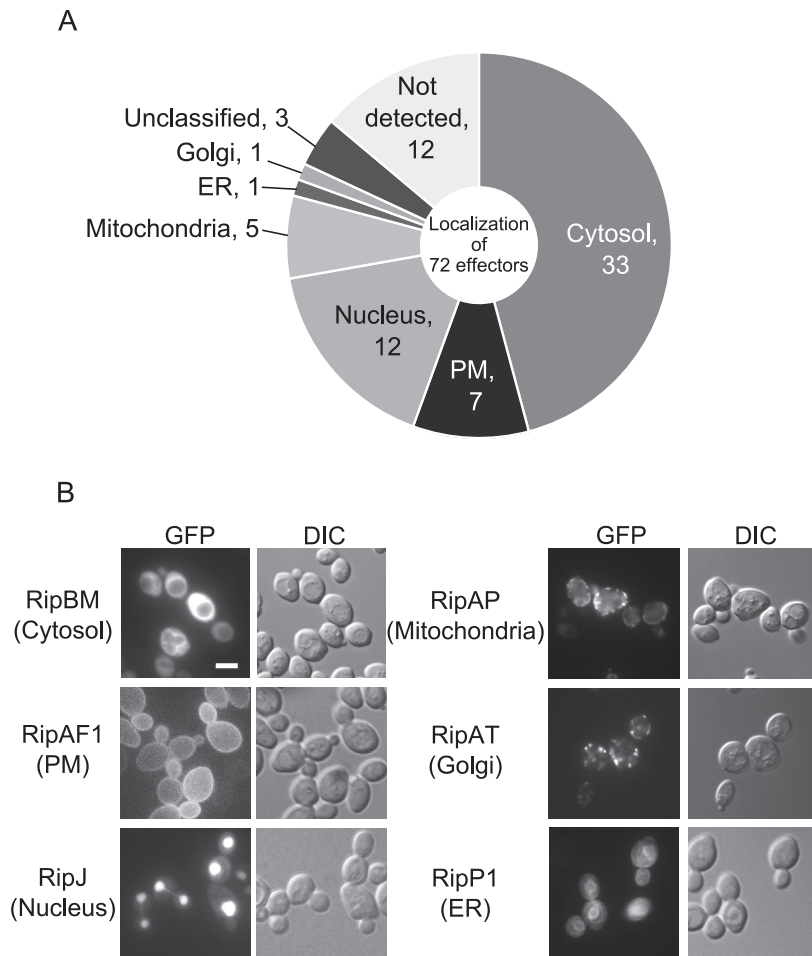


Fig. 5 Subcellular tropism of effector proteins of the olive bacterial wilt strain, YPPS1660 in eukaryotic organelles. (A) Association of *R. pseudosolanacearum* YPPS1660 effector proteins with distinct subcellular structures. Yeast strains carrying each effector expression plasmid were induced overnight in SGal (-Ura) liquid medium and live-imaged by fluorescent microscopy. Effectors were categorized according to the localization of GFP-tagged effector proteins: cytosol, plasma membrane (PM), nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum (ER), Golgi, other/unclassified, and not detected. (B) Examples of cytosol, plasma membrane, nucleus, mitochondria, Golgi, and endoplasmic reticulum. Scale bar = 5 μ m.

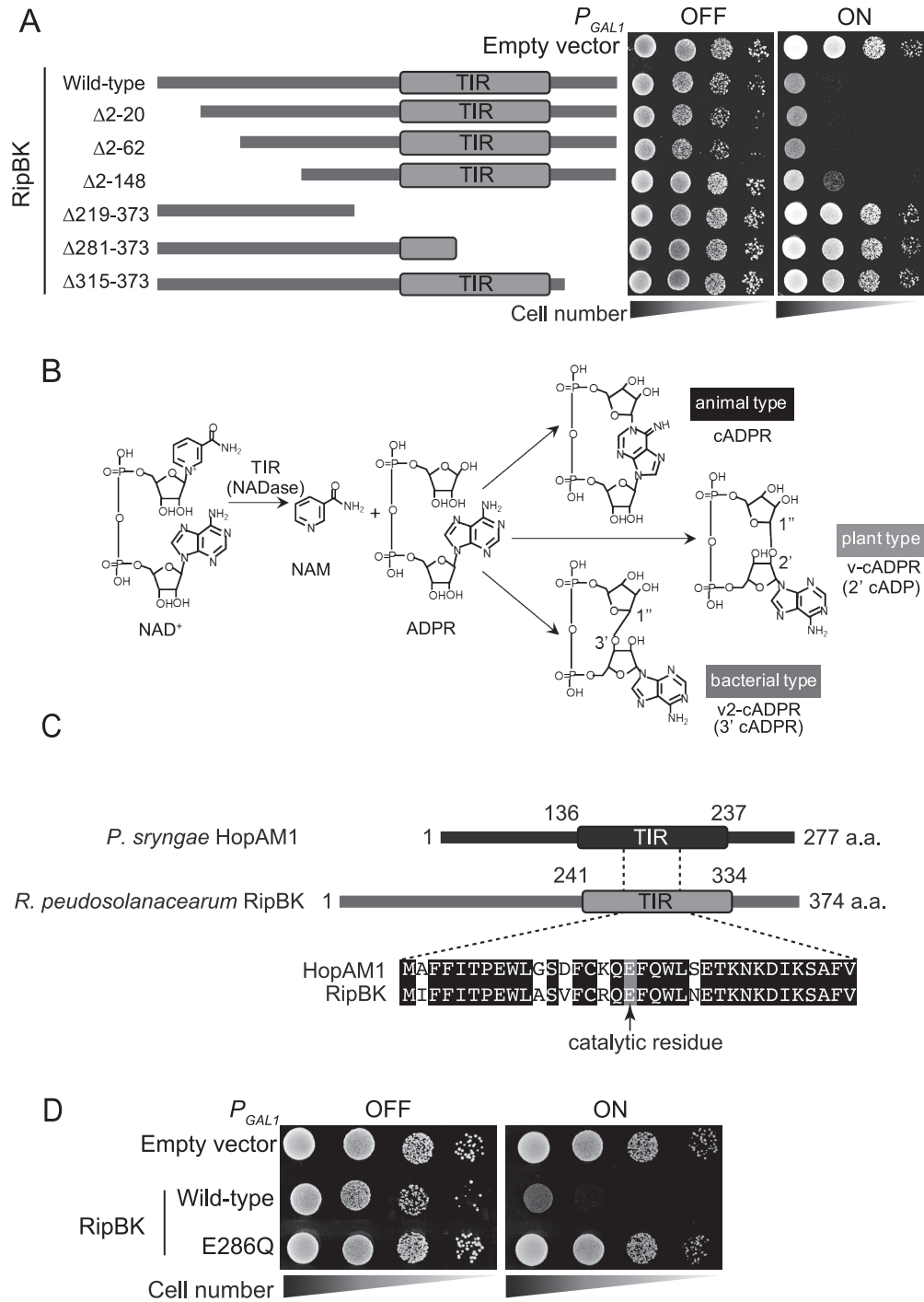


Fig. 6 Expression of the olive bacterial wilt strain specific effector, RipBK exhibits severe growth inhibition depending on its TIR domain. (A) Deletion mutant analysis of RipBK using yeast expression system revealed that the TIR domain is responsible for its growth inhibitory activity. (B) TIR domains from different species produce different cADPR isotypes. Animal types produce cADPR, plant types produce v-cADPR (2' cADPR), and bacterial types produce v2-cADPR (3' cADPR). (C) The predicted domain structures and alignment of amino acid sequences of TIR domains of *Pseudomonas syringae* effector, HopAM1, and *R. pseudosolanacearum* effector, RipBK. The putative catalytic residues of NADase in TIR domains are highlighted. (D) Yeast cells carrying empty vector or plasmids expressing RipBK wild-type or catalytic residue mutant, E286Q were spotted with serial dilution on an SD (-Ura) plate, repressed condition (OFF), or an SGal (-Ura) plate, induced condition (ON) and incubated at 26°C for 3-4 days.

TIRドメインは、生体内の酸化還元反応を制御する必須の電子伝達体、補酵素として機能するニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を特異的に分解し、ニコチンアミド (NAM) とアデノシン二リン酸リボース (ADPR) を経由して環状ADPR (cADPR) を産生する活性を有することが最近明らかになっている (Essuman *et al.*, 2017; Essuman *et al.*, 2018). 各種生物種由来のTIRドメインはNADase活性によりNAD⁺を分解するという共通性を有するが、生物種によって異なる環状ADPR (cADPR) を産生する (Manik *et al.*, 2022; Locci *et al.*, 2023) (Fig. 6B). 動物では、TIRドメインを持つタンパク質 SARM1 (sterile alpha and TIR motif containing 1) は神経軸索の損傷に伴って活性化し、NAD⁺を分解してcADPRを産生し、プログラム軸索細胞死を実行する (Essuman *et al.*, 2018). 植物においては、TIRドメインを持つ免疫受容体である Nucleotide binding Leucine-rich Repeat (NLR) タンパク質が病原菌の感染に伴ってNADase活性が上昇し、NAD⁺を分解してcADPR (v-cADPR) を産生し、病原菌に対する防御応答である過敏反応を伴う細胞死を誘発する (Wan *et al.*, 2019). *Bacillus cereus* においては最近、Thoeris と呼ばれる抗ファージ防御システムにおいてTIRドメインタンパク質 ThsB がファージ感染に伴って細菌型 cADPR (v2-cADPR) を産生し、これが下流のThsAの活性化の引き金を引くことでNAD⁺の枯渇を引き起こし、ファージ感染細胞の細胞死を誘導することが明らかにされた (Ofir *et al.*, 2021). また、最近、植物病原性細菌である *Pseudomonas syringae* のエフェクター HopAM1 はNAD⁺をv2-cADPRに分解するNADase活性を有することが報告された (Eastman *et al.*, 2022).

BLASTを用いたホモロジー検索により RipBK は、*P. syringae* のエフェクター HopAM1 のオルソログであり、53.8%の相同性があることが分かった (Fig. 6C). HopAM1 とのアライメントの結果、RipBK の286番目のグルタミン酸 (E286) が触媒残基であることが予測された (Fig. 6C). そこで、RipBK の推定活性中心変異体 (E286Q) を作製し、酵母で発現させたところ、RipBK WT で見られた酵母に対する増殖阻害は完全にキャンセルされた (Fig. 6D). 以上の結果から、RipBK はTIRドメインが有するNADase活性依存的に酵母に増殖阻害を引き起こしていることが推測された.

RipBK はNADase活性を持ち、酵母抽出液によって顕著に活性が上昇する

次にRipBKがNADase活性を持ち、NAD⁺を分解し、v2-cADPRを生成するのかを確かめるため、精製した組換えタンパク質を使用して、NAD⁺と反応を行い、

HPLCによってNADase活性の測定を行った。精製 RipBK WT はリテンションタイム16分に小さなピークが現れたが、推定活性中心変異体E286Qではこのピークが現れなかった (Fig. 7A). このピークはRipBKのNADase活性によりNAD⁺から生成したv2-cADPRであると考えられたが、その活性は極めて低かった.

以前我々は、 γ -Glutamyl cyclotransferase (GGCT) 活性を持つエフェクター RipAY は、宿主細胞内に存在するチオレドキシン (Trx) と反応することでGGCT活性が爆発的に上昇することを報告した (Fujiwara *et al.*, 2016; Fujiwara *et al.*, 2020). 活性化したRipAYは、宿主内在性のGGCTと比較して100倍近く高い触媒反応効率を有しており、これにより宿主細胞質グルタチオンを青枯病菌感染後に急速に低下させることができると考えられている (Fujiwara *et al.*, 2016). 大腸菌で発現させたRipBK組換えタンパク質のNADase活性は極めて低く、その強い酵母増殖阻害から考えてRipAY同様に何らかの真核生物由来の因子により活性化されるという仮説を立てた。そこで、RipBKが酵母の内在性因子によって活性化されるかを検証した。大腸菌で発現させたProtein A-tag融合RipBK WTとE286Q組換えタンパク質を固定化したIgG-beadsを酵母抽出液とインキュベート後、IPP150 bufferで洗浄し、RipBK固定化IgG-beadsのNADase活性を測定した (Fig. 7B). この時、酵母抽出液の代わりにIPP150 bufferを加えたサンプルをコントロールとし、また、*R. pseudosolanacearum* の抽出液についても同様に調べた。その結果、*R. pseudosolanacearum* の抽出液を添加してもRipBKの活性はコントロールと変化しなかった。しかし、酵母抽出液を添加すると、NAD⁺のピークが大幅に減少し、v2-cADPRのピークが大きく上昇した (Fig. 7C). v2-cADPRピーク面積を比較したところ、約4.5倍に増加していることが分かった (Fig. 7D). さらにこの活性化について詳細に解析するため、酵母抽出液濃度依存性について調べた。IgG-beadsによって精製したProtein A-tagを融合させたRipBK WTとE286Qに酵母粗抽出液をタンパク質濃度0, 0.2, 1.0, 2.0, 10, 20, 100 μ g/mLになるように添加し、活性を測定した。その結果、酵母抽出液添加濃度依存的にNADase活性が上昇し、20 μ g/mLで活性がほぼ最大になった (Fig. 7E). 一方、このNADase活性の上昇は、E286Qでは見られなかった。以上の結果から、原核生物には存在せず、酵母などの真核生物が有する因子によってRipBKはNADase活性を上昇させることが示唆された.

我々は、以前、幅広い宿主域を有する*R. pseudosolanacearum* 由来エフェクター RipAY は、幅広い宿主由来抽出液によりそのGGCT活性が活性化されるが、宿主域が限られ

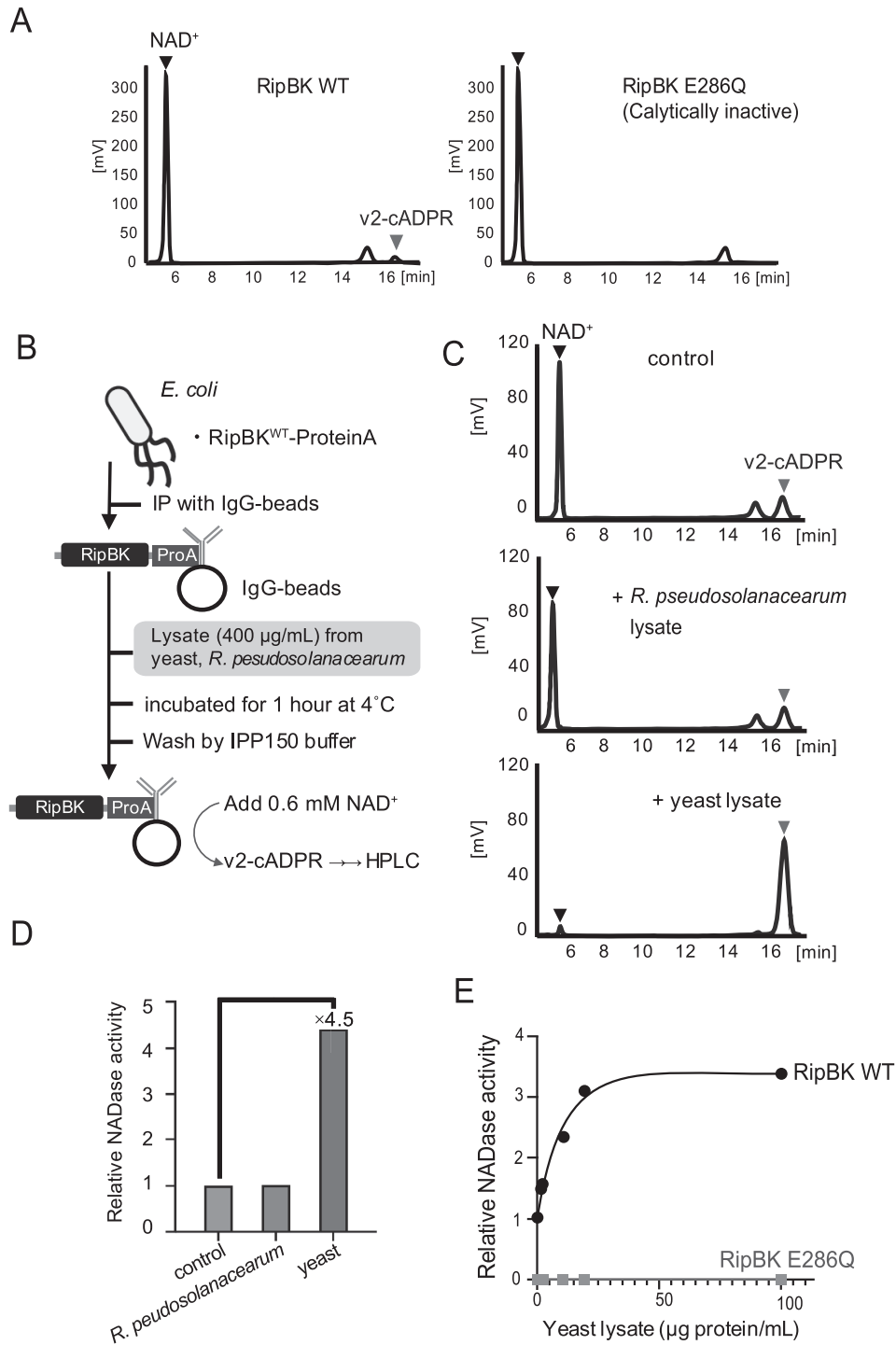


Fig. 7 RipBK acts as a NADase to degrade NAD⁺ to v2-cADPR. (A) A peak of v2-cADPR was detected when a recombinant WT RipBK protein expressed in *E. coli* reacted with NAD⁺ as a substrate. On the other hand, no peak was detected in the putative catalytic site mutant E286Q. (B) NADase activity was measured by the addition of yeast lysate or *R. pseudosolanacearum* lysate to *E. coli* expressed-recombinant RipBK-Protein A-immobilized IgG beads. As a control, an IPP150 buffer was added. (C) Effect of yeast lysate on NAD⁺ activity of RipBK. (D) The addition of yeast lysate to RipBK stimulated NADase activity by 4.5 times compared to the control. (E) Stimulation of NADase activity of RipBK by the addition of yeast lysate was in a concentration-dependent manner. Stimulation of NADase activity was not observed in the catalytic site mutant (E286Q) of RipBK.

たスイカ果実汚斑細菌病を引き起こす *Acidovorax citrulli* 由来の RipAY オルソログであるエフェクター Aave_4606 は、スイカなど極限られた植物由来の抽出液によってのみ活性化されることを見出している (Fujiwara *et al.*, 2023). このように一部のエフェクターは、宿主特異的な因子に依存して活性化することでその活性を獲得することで病原性を発現することが考えられており、エフェクターが持つ活性が宿主域を限定する事例がある. RipBK についてもオリーブ由来の因子がその活性化に重要であるかを今後解析する必要がある. また、RipBK 以外の酵母に増殖阻害を引き起こしたエフェクターについては、今後さらなる分子機能の解析をおこなうことで本菌の宿主域拡大の原因を分子レベルで明らかにすることが期待できる.

要 約

本研究では、オリーブに感染し立枯病を引き起こす *Ralstonia pseudosolanacearum* 菌株についてナスやトマトに感染し青枯病を引き起こす *R. pseudosolanacearum* との比較ゲノム解析によりオリーブ立枯病菌特異的な病原因子を明らかにすることを目的として解析を行った. 日本各地で分離されたオリーブ立枯病から分離された *R. pseudosolanacearum* 26 菌株について遺伝子型・生理型を解析したところ、特定の遺伝的背景を持った菌株がオリーブ立枯病を引き起こしていることが明らかとなった. そこで、更にこれらの菌株のうち8菌株の全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析を行った. 特に病原性に関与することが知られているⅢ型分泌系エフェクターについて各菌株ゲノム中のレパートリーを比較したところ、これらの菌株は RipBE, RipBK, RipBQ のいずれかのエフェクターを保有していることが明らかとなった. エフェクターの分子機能の解明のためにオリーブ立枯病菌 YPP1660 株由来の 72 個のエフェクター遺伝子を酵母発現系により網羅的に解析したところ、23 個のエフェクターが酵母に増殖阻害を示した. 特にオリーブ立枯病菌特異的なエフェクターの一つである RipBK は、その分子内に存在する TIR (Toll/Interleukin 受容体) ドメインが有する NADase 活性に依存して、酵母に強い増殖阻害を示すことが明らかとなった. 大腸菌で発現させた RipBK は、極めて低い NADase 活性を示したが、酵母抽出液を添加することにより強い NADase 活性を示すようになった. 多くのエフェクターにおいて宿主内因子依存的に活性化することが知られており、RipBK についても宿主由来因子に依存して NADase 活性を獲得し、宿主細胞内 NAD⁺ を分解することで病原性を発現することが予測された.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 兔子尾真菜, 藤原祥子, 生咲巖, 氏家章雄, 松本英治, 増中章, 市村和也, 田淵光昭. 2022. 比較ゲノム解析によるオリーブ立枯病菌の特異的因子の解明, 支部創立20周年記念 日本農芸化学会中四国支部会第61回講演会(例会) (1月22日, オンライン)
- 2) 兔子尾真菜, 和氣由尚, 藤原祥子, 田淵光昭. 2022. 酵母発現系を用いたオリーブ立枯病菌特異的病原因子エフェクターの機能解析, 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会 (9月7日-9日, 沖縄)
- 3) 兔子尾真菜, 和氣由尚, 藤原祥子, 木村義雄, 田中直孝, 田淵光昭. 2022. TIRドメイン含有エフェクターRipBKのNADase活性化メカニズムの解明, 第39回 YEAST WORKSHOP (11月10日, -11日, 高知)
- 4) Toshio, M., Wake, Y., Fujiwara, S., Kimura, Y., Tanaka, N. & Tabuchi, M. 2023. Eukaryotic factor-dependent activation mechanism of RipBK, a TIR domain-containing pathogen effector protein from *Ralstonia solanacearum*, 国際シンポジウム 環境・資源ゲノムとライフサイエンス (2023年1月30日, 高松)

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、本研究の遂行に協力いただきました静岡県農業技術研究所・病害虫防除所の大住太良氏 (オリーブ立枯病菌株の分与)、三重県農業技術研究所・病害虫防除所の辻 明子氏 (オリーブ立枯病菌株の分与)、農研機構西日本農業研究センター・生産環境研究領域・病害 G (現・名城大学農学部附属農場) の増中 章氏 (オリーブ立枯病菌株の分与、病原性解析)、香川大学農学部・木村義雄氏並びに応用分子細胞生物学研究室の学生諸氏に感謝の意を表します.

文 献

- Block, A. & Alfano, J.R. 2011. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 39-46.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & Boeke, J.D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132.
- Deslandes, L. & Rivas, S. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets, *Trends Plant Sci.* 17: 644-655.
- Eastman, S., Smith, T., Zaydman, M.A., Kim, P., Martinez, S., Damraju, N., DiAntonio, A., Milbrandt, J., Clemente, T.E., Alfano, J.R. & Guo, M. 2022. A phyto-bacterial TIR domain effector manipulates NAD⁺ to promote virulence. *New Phytol.*

- 233: 890–904.
- Essuman, K., Summers, D.W., Sasaki, Y., Mao, X., DiAntonio, A. & Milbrandt, J. 2017. The SARM1 toll/interleukin-1 receptor domain possesses intrinsic NAD⁺ cleavage activity that promotes pathological axonal degeneration. *Neuron* **93**: 1334–1343.
- Essuman, K., Summers, D.W., Sasaki, Y., Mao, X., Yim, A.K.Y., DiAntonio, A. & Mibradt, J. 2018. TIR domain protein are an ancient family of NAD⁺ consuming enzymes. *Curr. Biol.* **28**: 421–430.
- Fegan, M. & Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Edited by C. Allen, P. Prior, and A.C. Hayward. Minnesota: APS Press. 449–461.
- Fujiwara, S., Kawazoe, T., Ohnishi, K., Kitagawa, T., Popa, C., Valls, M., Genin, S., Nakamura, K., Kuramitsu, Y., Tanaka, N. & Tabuchi, M. 2016. RipAY, a Plant Pathogen Effector Protein, Exhibits Robust γ -Glutamyl Cyclotransferase Activity When Stimulated by Eukaryotic Thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **291**: 6813–6830.
- Fujiwara, S., Ikejiri, A., Tanaka, N. & Tabuchi, M. 2020. Characterization of the mechanism of thioredoxin-dependent activation of γ -glutamyltransferase, RipAY, from *Ralstonia solanacearum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **523**: 759–765.
- Fujiwara, S., Toshio, M., Nakayama, E., Tanaka, N. & Tabuchi, M. 2023. Host-specific activation of a pathogen effector Aave_4606. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **616**: 41–48.
- Genin, S. & Denny, T.P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex, *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 67–89.
- Halim, V.A., Altmann, S., Ellinger, D., Eschen-Lippold, L., Miersch, O., Scheel, D. & Rosahi, S. 2009. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J.* **57**: 230–242.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jiang, G., Wei, Z., Xu, J., Chen, H., Zhang, Y., She, X., Macho, A.P., Ding, W. & Liao, W. 2017. Bacterial wilt in China: History, current status, and future perspectives. *Front. Plant Sci.* **8**: 1549.
- Landry, D., González-Fuente, M., Deslades, L. & Peeters, N. 2020. The large, diverse, and robust arsenal of *Ralstonia solanacearum* type III effectors and their in planta functions. *Mol. Plant Pathol.* **21**: 1377–1388.
- Levin, I., Eakin, C., Blanc, M.-P., Klevit, R. E., Miller, S. & Brzovic, P.S. 2010. Identification of an unconventional E3 binding surface on the UbcH5-Ub conjugate recognized by a pathogenic bacterial E3 ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 2848–2853.
- Locci, F., Wang, J. & Parker, J.E. 2023. TIR-domain enzymatic activities at the heart of plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **74**: 102373.
- Manick, M.K., Shi, Y., Li, S., Zaydman, M.A., Damaraju, N., Eastman, S., Smith, T.G., Gu, W.E., Masic, V., Mosaiab, T., Weagley, J.S., Hancock, S., Vasquez, E., Hartley-Tassell, L., Kargois, N., Murata, N., Lim, B.Y.J., Burdett, H., Landsberg, J.J., Schembri, M.A., Prokes, I., Song, L., Grant, M., Diantonio, A., Nanson, J.D., Guo, M., Milbrandt, J., Ve, T. & Kobe, B. 2022. Cyclic ADP ribose isomers: Production, chemical structures, and immune signaling. **377**: eadc8969.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G. & Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 614–629.
- McCann, H.C. & Guttman, D.S. 2008. Evolution of the type III secretion and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol.* **177**: 33–47.
- Ofir, G., Herbst, E., Baroz, M. *et al.* 2021. Antiviral activity of bacterial TIR domains via immune signalling molecules. *Nature* **600**: 116–120.
- Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.-C. & Genin, S. 2013. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics.* **14**: 859.
- Popa, C., Coll, N.S., Valls, M. & Sassa, G. 2016a. Yeast as a heterologous model system to uncover Type III effector function. *PLoS Pathog.* **12**: e1005360.
- Popa, C., Tabuchi, M. & Valls, M. 2016b. Modifications of bacterial effector proteins inside eukaryotic host cells. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**: 73.
- Safni, I., Cleenwerck, I., Vos, P.D., Fegan, M., Sly, L. & Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 3087–31033.
- Siggers, K.A. & Lesser, C.F. 2008. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host Microbe.* **4**: 8–15.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**: 3022–3027.
- Tebaldi, N.D., Leite, L.N., de Marque, J.M., Furlanetto, M.C.A. & Mota L.C.B.M. 2014. Occurrence of *Ralstonia solanacearum* on olive tree in Brazil. *Summa Phytopathol.* **40**: 185.
- Valdivia, R.H. 2004. Modeling the function of bacterial virulence factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **3**: 827–834.
- Wan, L., Essuman, K., Anderson, R.G. *et al.* 2019. TIR domains of plant immune receptors are NAD⁺-cleaving enzymes that promote cell death. *Science* **365**: 799–803.
- 氏家章雄 2021. 最近話題となっている病害虫 植物防疫所病害虫情報 第124号, p. 6.
- 露無慎二, 藤川貴史, 石原博通, 2003. 植物病原細菌の発病戦略と植物の防御戦略. *化学と生物* **41**: 157–163.
- 曳地康史, 2009. Phylotype決定に基づいた青枯病菌 *Ralstoniasolanacearum*国内菌株の系統細分類による青枯病菌インベントリーの作成 微生物遺伝資源探索収集調査報告書 **22**: 21–31.
- 堀田光生, 土屋健一, 2012. 微生物遺伝資源利用マニュアル (12) 改訂第2版 p.1-32, 独立行政法人 農業生物資源研究所.

遺伝子組換え大腸菌が生産する新規な膜小胞の解析と 有用物質分泌生産への応用

尾 島 由 紘

大阪公立大学大学院工学研究科
〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

Analysis of novel membrane vesicles produced by genetically modified *Escherichia coli* and their application to secretory production of useful compounds

Yoshihiro Ojima

Department of Chemistry and Bioengineering, Osaka Metropolitan University
3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

Escherichia coli produces extracellular vesicles called outer membrane vesicles (OMVs) by releasing part of its outer membrane. We previously reported that the combined deletion of *nlpI* and *miaE*, related to envelope structure and phospholipid accumulation in the outer leaflet of the outer membrane, respectively, resulted in the synergistic increase of OMV production. In this study, the analysis of $\Delta miaE\Delta nlpI$ cells using quick-freeze, deep-etch electron microscopy (QFDE-EM) revealed that plasmolysis occurred at the tip of the long axis in cells and that OMVs formed from this tip. Furthermore, intracellular vesicles and multilamellar OMV were observed in the $\Delta miaE\Delta nlpI$ cells. QFDE-EM analysis also revealed that $\Delta miaE\Delta nlpI$ sacculi contained many holes noticeably larger than the mean radius of the peptidoglycan pores in wild-type *E. coli*. These results suggest that in $\Delta miaE\Delta nlpI$ cells, cytoplasmic membrane materials protrude into the periplasmic space through the peptidoglycan holes and are released as outer-inner membrane vesicles (OIMVs). Meanwhile, the secretion of recombinant GFP expressed in the cytosol of the $\Delta miaE\Delta nlpI$ cells was about 2 mg/L which was more than 100 times higher than that of WT, suggesting that OMV phenomenon is able to be applied for the secretory protein expression system of *E. coli*. Next, secretory production of fatty acid via OMVs was also examined using the multiple gene knockout mutant strain. However, it was failed due to the sever suppression of cell growth and fatty acid production. Expression suppression of *miaE* and *nlpI* using Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Interference (CRISPRi) achieved the increase of OMV production while maintaining cell activity. In the future, we will optimize the expression levels of each gene for secrete production of useful compounds via OMVs.

Key words: *Escherichia coli*, outer membrane vesicle (OMV), plasmolysis, peptidoglycan, secretory production, CRISPRi

緒 言

外膜小胞 (OMVs) とは、グラム陰性細菌の外膜から遊離した直径 20 ~ 250 nm の細胞外小胞であり、外膜タンパク質やリポ多糖類・リン脂質によって構成される (Schwechheimer & Kuehn 2015; Toyofuku *et al.*, 2019).

OMVs 内には、DNA、RNA などの核酸やペリプラズムタンパク質が存在する。長い間、OMVs は細胞から不要物を排出する機構と考えられてきたが、近年になって排出された OMVs が周囲の細胞に融合することで様々な物質の運搬を行い、遺伝子水平伝搬や細胞間コミュニケーションなど、微生物間相互作用に重要な役割を担っていることが明らかとなり、注目を集めている。OMVs の応用研究としては、ワクチン開発やドラッグデリバリーシステムなどへの寄与が期待されている。原核微生物が分泌する OMVs に関しては、酸化ストレス、熱ストレス、浸透圧ストレスや抗生物質ストレスによる損傷

E-mail: ojima@omu.ac.jp

共同研究者：澤邊 朋美 (大阪公立大学大学院工学研究科)。

中川 真緒 (大阪市立大学大学院工学研究科)。

熊添 優希 (大阪公立大学大学院工学研究科)。

で、外膜がたわむことによってOMVsが形成されることが提唱されている (Schwechheimer & Kuehn 2015). 一方、Toyofukuらはライブセルイメージングを用いて膜小胞の形成と細胞外への放出を観察し、細胞膜が一旦断片化したのちに再結合してMVが作られること報告している (Toyofuku *et al.*, 2019).

これまで大腸菌においていくつかの遺伝子欠損によりOMVs生産が促進するとの報告がある。NlpIは、外膜と内膜の間を結ぶペプチドグリカン (PG) の架橋を加水分解する酵素である Meps の機能を抑制するリポタンパク質である。nlpI 遺伝子を欠損することで、Meps による PG の分解が促進され、PG と外膜の結合が緩む。この結果、外膜が隆起しやすくなり、OMVs の生産が促進されると考えられている (Schwechheimer *et al.*, 2015). 一方、DegP はペリプラズム内の不活性なタンパク質を分解するプロテアーゼである。欠損によりペリプラズム内に不活性タンパク質が蓄積することが物理的な膜ストレスを誘導し、不活性タンパク質を細胞外に排出するためにOMVs生産量が増えるとされる (Schwechheimer, & Kuehn 2013). MlaE は、Yrb-ATP 結合カセット (ABC トランスポーター) の膜輸送体で、YrbE とともに称される。外膜のリン脂質の輸送に関わっており、内膜へのリン脂質の逆輸送により外膜と内膜のリン脂質の比を一定に保つ役割を果たしている。mlaE 遺伝子の欠損により、外膜の外葉からリン脂質が戻ることが出来なくなり、外膜の外葉に脂質が蓄積する。その結果、外膜上で余剰となった脂質が放出されやすくなり、OMVs 生産が促進するとされている (Roier *et al.*, 2016). MlaA は VacJ とともに称され、MlaE と同じ Yrb-ATP 結合カセットのリポタンパク質として、外膜の外葉と内葉のリン脂質の比を一定に保つために働く。mlaA 遺伝子を欠損することで、外膜の外葉と内葉の脂質バランスが崩れ、OMV 生産の引き金となる。mlaA および mlaE の遺伝子欠損による OMVs の生産促進の効果は、グラム陰性菌である *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌) および *Vibrio cholerae* (コレラ菌) で報告された (Roier *et al.*, 2016). 大腸菌においても網羅的な遺伝子欠損株の解析により mlaA および mlaE の欠損により、OMVs の生産が促進することが確認されている (Kulp *et al.*, 2015).

我々の以前の研究では、これらの遺伝子欠損を重ね合わせることでOMV生産に与える影響を確認したところ、二重遺伝子欠損株 $\Delta mlaE \Delta nlpI$ が最も高いOMV生産を示すことを明らかにした (Ojima *et al.*, 2020). 本研究では、単独遺伝子欠損株 $\Delta mlaE$ および $\Delta nlpI$ と $\Delta mlaE \Delta nlpI$ の各株の細胞や生産するOMVに関して、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法を用いた観察を中心に詳細な解析を行い、OMV生産の促進メカニズムを明らか

にした。さらに、大腸菌を宿主とした物質生産における細胞外への分泌ツールとしてOMVを応用するため、組換えタンパク質や脂肪酸のOMVを介した分泌生産を試みた。

実験方法

使用菌株と培養方法

大腸菌 K-12 株由来の BW25113 と単独遺伝子欠損株 $\Delta nlpI$, $\Delta mlaE$, $\Delta fadE$ は、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP, 国立遺伝学研究所) から入手した。二重遺伝子欠損株 $\Delta mlaE \Delta nlpI$ は、P1kc フェージを使用した P1 形質導入法によって構築した (Ojima *et al.*, 2020). タンパク質生産に関しては、各株にプラスミド pCA24N-gfp を形質転換し、細胞質内で His タグ付き GFP をモデルタンパク質として発現させた。

各大腸菌株を LB 培地 (1% Bacto トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl) で培養した。pCA24N-gfp を保持する株の培地には、50mg/L のクロラムフェニコールおよび 1mM の IPTG を添加した。前培養は、LB 培地で 37°C で 18 時間行い、本培養は 500mL バッフル付き三角フラスコに入った 100mL の LB 培地に、OD₆₀₀ = 0.01 となるように植菌した。ロータリーシェーカー (NR-30, Taitec) 上で、37°C, 140rpm で巡回培養した。細胞増殖は OD₆₀₀ を測定し評価した。

ナノ粒子マルチアナライザーによる細胞体積測定

培養 3 時間後および 24 時間後に、各菌株の細胞を 10,000 × g, 4°C で 10 分間遠心分離し回収した。細胞を PBS で洗浄し、最終的に PBS に再懸濁した。細胞体積は、Nanopore NP-1000 を備えたナノ粒子マルチアナライザー (qNano, IZON Science Ltd.) により測定した。

急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による大腸菌細胞の観察

上記と同様に PBS に再懸濁した菌体を 4°C, 10,000 × g, 10 分間遠心分離して上清を捨て、0.85% NaCl が含まれる 5mM HEPES 溶液または 15% グリセロール溶液にて再懸濁した。ここで、HEPES 溶液はエッチングした細胞表面を観察する際に、グリセロール溶液は細胞断面を観察する際に用いた。得られた菌体に対して急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により標本を作製し観察した (Tahara & Miyata 2023). 具体的には、試料をマイカフレークと混合しウサギ肺皮膚片に載せ、液体ヘリウムにより急速凍結した。凍結試料作製装置 (JFDV, JEOL) により、-180°C のチャンバー内に保管したサンプルの温度を -120°C まで上昇させた後、ナイフで凍結切断し、-104°C で 15 分間凍結エッチングした。ここで 15% グリ

セロールを溶媒として使用した場合、細胞断面を観察するため凍結エッチングのステップは省略した。その後、試料に炭素と白金膜を蒸着してから、強酸によって試料を溶かし、水と漂白剤にて洗浄した。作製したレプリカ標本をグリッドに載せ、透過型電子顕微鏡 (JEM-1010, JEOL) にて観察した。

OMVの回収とTEM観察ならびに動的光散乱法 (DLS) によるサイズ分布測定

OMVの回収は、以前に報告されている手法にいくつかの修正を加えて行った (Gujrati *et al.*, 2014)。24時間培養した後、100mLの培養液を10,000×g、4℃で10分間遠心分離し細胞を除去した。次に、上清を0.45μmのフィルターに通した。硫酸アンモニウムを最終濃度400g/Lで添加し、室温で1時間インキュベートして培養液成分を沈殿させた。11,000×g、4℃で30分間遠心分離し沈殿物を回収し、500μLの15%グリセロールに溶解し、超遠心分離機 (CS100FNX, 日立工機) を使用して109,000×gで1時間超遠心分離した。得られたペレットを100μLの15%グリセロールに懸濁したものを、元の培養液から1000倍濃縮されたOMVサンプルとした。

得られたOMVサンプルをグリッド上に置き、酢酸ウランでネガティブ染色してからTEM (JEM-2100, JEOL) により観察した。また同時にOMVサンプルを滅菌水で希釈し、0.45μmのフィルターにかけて不純物を除去した後、動的光散乱法 (Zetasizer Nano, Malvern) によりOMVの粒子径分布を測定した。

大腸菌細胞のペプチドグリカン (PG) の調製と急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による観察

24時間培養した大腸菌細胞を10,000×g、4℃で10分間遠心分離して回収した後にPBSで一度洗浄し、10% SDS (w/v) に再懸濁し95℃で12時間インキュベートした。200,000×g、20℃で40分間超遠心分離してPGを回収し、Milli-Q水で3回洗浄した後にTEMもしくは急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により観察した。

OMVの生産量とOMVを介したタンパク質分泌生産量の評価

OMV生産量は、先行研究の手法にいくつかの修正を加えてタンパク質量基準と脂質量基準の2つの手法で定量化した。タンパク質量基準では、OMVサンプルをSDS-PAGEおよびCBB染色により分析した。OMV量は、ImageJソフトウェア (National Institutes of Health) を使用して、SDS-PAGE上に現れる外膜タンパク質OmpA, C, F由来の約37kDaのバンド強度を数値化することにより、野生株に対する相対値として示した (Schwechheimer &

Kuehn 2013)。脂質量基準では、蛍光色素FM4-64を使用して定量化した (McBroom *et al.*, 2006; Manning & Kuehn 2011)。単離されたOMVを5μg/mLのFM4-64 (Molecular Probes/Thermo Fisher) が溶けたPBSで20分間インキュベートし、分光蛍光光度計 (INFINITE200PRO, TECAN) を使用して、558nmの励起波長と734nmの蛍光波長で測定した。

pCA24N-gfpを形質転換しHisタグ付きGFPを発現させて培養した際のOMVサンプルに含まれる組換えGFP量は、抗Hisタグ一次抗体を用いたウェスタンブロットティングによって分析した。組換えGFPの量は、バンド強度をImageJにより画像解析することで定量化した。各大腸菌細胞内に蓄積されたGFPも同様にウェスタンブロットティングによって分析した。細胞の場合、OD₆₆₀=0.3のサンプル10μLをゲルの各ウェルにロードし、細胞量を合わせて比較した。

OMVを介した脂肪酸分泌生産の評価

脂肪酸分解に関わる*fadE* 遺伝子の欠損株 $\Delta fadE$ にプラスミド pA5c-tesA-vhb50-8fadR (addgene ID86601) を形質転換し、必要遺伝子を発現させることで細胞質内に脂肪酸を生産する株 $\Delta fadE/tesA$ を作製した (Liu *et al.*, 2017)。さらに同時にOMVを高生産する株として三重遺伝子欠損株 $\Delta fadE\Delta mlaE\Delta nlpI$ を作製し、プラスミドを形質転換した ($\Delta fadE\Delta mlaE\Delta nlpI/tesA$)。各大腸菌株を8%グルコースを含むM9最小培地で、140rpm、37℃で72時間培養し脂肪酸を生産した。菌体を含む培養液全体と、遠心して菌体を除去した培養上清から、それぞれ酢酸エチルを用いて脂肪酸を抽出し、メチルエステル化後にガスクロマトグラフィー (GC-2025, Shimadzu) により測定した。

Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Interference (CRISPRi) による発現抑制株の作製とOMV生産量の評価

欠損によるOMVs生産の促進が報告されている2つの遺伝子 *mleE* と *nlpI* について、gRNAを設計したプラスミド pgRNA-bacteria (addgene ID44251) と dCas9 発現プラスミド pdCas9-bacteria (addgene ID44249) をそれぞれ野生株に形質転換した。各大腸菌株をLB培地37℃で培養し、8時間後の増殖期にmRNAを抽出し、qRT-PCRにより遺伝子発現量を測定した。また24時間後にOD₆₆₀を測定すると同時に、前述の方法でOMVsを回収し、タンパク質量基準で回収量を評価した。

結果および考察

大腸菌の遺伝子欠損株の細胞と生産された OMVs の特徴

培養終了時の各大腸菌株の増殖や細胞サイズ、OMV 生産量などを Table 1 に示す。

野生株の OD₆₆₀ は 5.1 であったのに対して、単独遺伝子欠損株では $\Delta nlpI$ が 4.1 であり少し減少したが、 $\Delta mlaE$ では 5.2 であり増殖に影響を与えなかった。一方で、二重遺伝子欠損株 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では、OD₆₆₀ は 2.9 であり増殖抑制が顕著であった。OMV 生産を向上する遺伝子欠損は重ね合わせることで増殖を阻害することがわかった。続いて、タンパク質基準での OMV 生産量を比較したところ、野生株と比較して $\Delta nlpI$ と $\Delta mlaE$ は、それぞれ約 7 倍と 5 倍に増加し、さらに $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では、約 30 倍に増加していた。脂質膜基準でも OMV 生産量を確認したところ、野生株と比較して $\Delta nlpI$ と $\Delta mlaE$ では、約 6 倍と 9 倍に増加し、さらに $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では、約 14 倍に増加していた。このようにタンパク質基準と脂質膜基準において数字に違いがある要因としては、OMV の高生産株では OMV 中のタンパク質と脂質の比率が変化している可能性が考えられる。ただし、いずれの評価方法においても遺伝子欠損を重ね合わせることで更に OMV 生産が向上することを確認できた。次に、DLS により OMV の平均粒径を測定したところ、野生株と $\Delta nlpI$ では約 80 nm であるのに対して、 $\Delta mlaE$ では約 65 nm となり、小さくなる傾向が見られた。一方で、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では約 100 nm となり欠損を重ね合わせることでサイズが大きくなることがわかった。続いて、qNANO により各株の細胞体積を評価した。まずは培養 3 時間時点で測定したところ、野生株が約 1 fL であるのに対して、 $\Delta nlpI$ では約 0.85 fL と少し小さく、それ以外の欠損株は野生

株と変わらなかった。一方、培養 24 時間後では、野生株で約 0.52 fL となり 3 時間後より大幅に低下したが、この結果は過去の報告で培地中の成分が少なくなると細胞体積が小さくなるという結果と一致した (Kubitschek 1990)。欠損株は、全て約 0.4 fL となり野生株と比較して小さかった。以上より、OMV 粒子や細胞体積の結果から、OMV を高生産する欠損株では細胞の表現型にも大きな変化が生じている可能性が示唆された。

大腸菌の遺伝子欠損株の細胞と生産された OMVs の特徴

OMV を高生産する欠損株の細胞について詳しく解析するため、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により、細胞の微細構造の観察を行った。まずは前処理を終え、急速凍結を行う直前の細胞を位相差顕微鏡で観察したが、野生株と $\Delta mlaE\Delta nlpI$ ともに生きた状態の細胞を光学顕微鏡で観察した際と大きさや形状が一致し、前処理による人為的な変化は起きていないことが確認された (Fig. 1A, D)。続いて、エッチング処理を施したレプリカ標本を TEM で観察した結果、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ の細胞は野生株よりも全体的に細長く伸びている様子が確認された (Fig. 1B, E)。さらに、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ の細胞では、長軸の先端から OMV を形成している様子が観察された (Fig. 1F)。観察された OMV の直径は約 400 nm であり、OMV の中では最も大きな部類である。続いて、エッチング処理を行わず細胞断面を観察した結果を Fig. 2 に示す。

まず野生株に関しては、Fig. 1 に類似した細胞形状が観察され (Fig. 2A)、より高倍率で観察しても細胞の外膜と内膜はほとんど一層に見え、ペリプラズムの幅が数 nm であることを考えると観察倍率からは妥当な結果となった (Fig. 2B)。一方で、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ の細胞は細長い傾向が観察され (Fig. 2C)、さらに矢印で示されるような長軸

Table 1 Summary of cell growth, relative OMV production, OMV size, and cell volume of each *E. coli* strain

	Culture time [h]	WT	$\Delta nlpI$	$\Delta mlaE$	$\Delta mlaE\Delta nlpI$
OD ₆₆₀ [-]	24	5.1 ± 0.6	4.1 ± 0.7	5.2 ± 0.3	2.9 ± 0.2
Relative OMV production (SDS-PAGE) [-]	24	1	7.0 ± 1.2	5.3 ± 1.5	29.4 ± 5.6
Relative OMV production (FM4-64) [-]	24	1	5.8 ± 1.0	8.7 ± 0.7	13.8 ± 3.9
Average OMV size [nm]	24	83.9 ± 0.3	81.7 ± 0.3	65.9 ± 0.6	100.4 ± 0.5
Cell volume [fL]	3	1.08 ± 0.27	0.85 ± 0.26	1.04 ± 0.27	1.08 ± 0.28
	24	0.52 ± 0.18	0.39 ± 0.15	0.41 ± 0.14	0.39 ± 0.20

The data were obtained from three independent experiments ($n=3$).

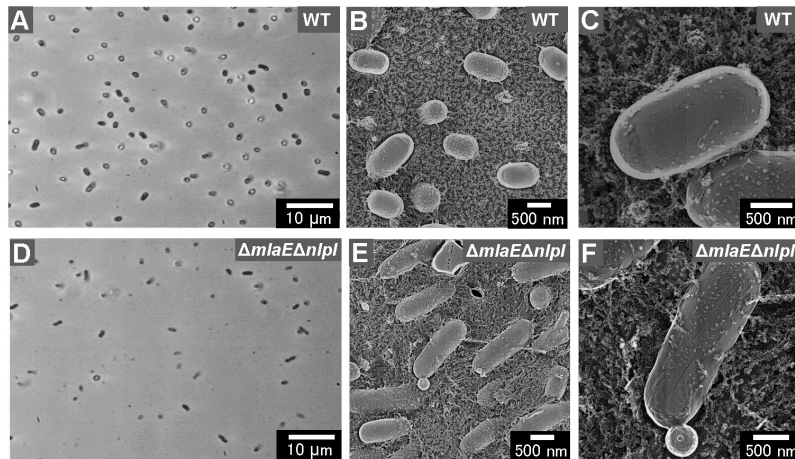


Fig. 1 Surface structure of the wild-type (WT) *E. coli* BW25113 and $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells visualized via quick-freeze, deep-etch electron microscopy (QFDE-EM). (A, D) Phase-contrast optical microscopy image of the WT (A) and $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells (D). (B) Field image of the WT cells. (C) Magnified image of the surface of WT cells. (E) Field image of the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells. (F) Magnified image of the surface of $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cell.

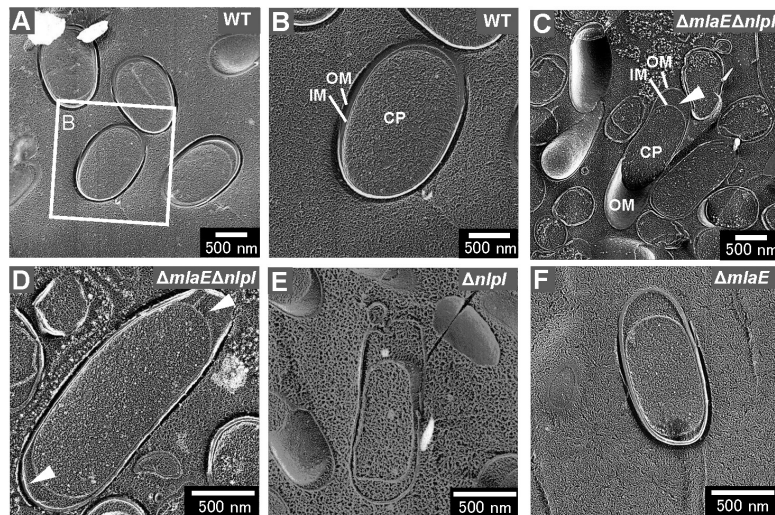


Fig. 2 Cross-section of various fractured *E. coli* cells visualized by QFDE-EM. (A) Field image of cells. (B) Magnified image of the structure of the WT cells. (C) Field image of the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells. OM, outer membrane; IM, inner membrane; CP, cytoplasm. (D) Magnified image of the structure of the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells. The arrowheads indicate the plasmolysis. (E) Magnified image of the structure of the $\Delta nlpI$ cells. (F) Magnified image of the structure of the $\Delta mlaE$ cell.

の先端部に外膜と内膜のペリプラズム空間が拡張した原形質分離が生じていることが明らかとなった (Fig. 2D). $\Delta mlaE\Delta nlpI$ の全細胞のおよそ 50% 以上の頻度ではっきりとした原形質分離が観察された。また原形質分離は、

$\Delta nlpI$ と $\Delta mlaE$ の単独遺伝子欠損株においても観察され (Fig. 2E, F), OMV 高生産株に共通の表現型であることも確認された。

さらに観察を続けると、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ において原形質

分離が起こった長軸先端部の外膜が括れて、小胞を形成している様子が確認された (Fig.3A, B).

この現象は他の細胞においても高い頻度で観察されたため (Fig.3C), $\Delta mlaE\Delta nlpI$ における主な OMV 形成経路であると考えられる. さらに興味深いことに, ペリプラズム空間に細胞内小胞のようなものや (Fig.3D), 多重膜と考えられる小胞も観察された (Fig.3E, F). そこ

で, 超遠心分離により回収した OMV を酢酸ウラニルによるネガティブ染色で観察したところ (Fig.4), 野生株では多重膜の OMV は観察されないのに対して, $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では数%の頻度で多重膜小胞が観察された. この多重膜小胞は, $\Delta nlpI$ ではさらに低頻度で観察され, $\Delta mlaE$ では観察されなかったことから, $nlpI$ の欠損がきっかけとなり生じる表現型であることが示唆された.

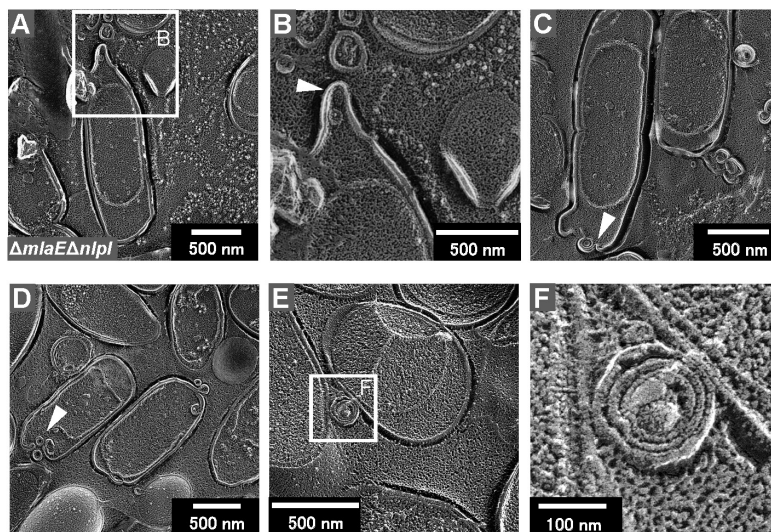


Fig. 3 Cross-section of plasmolyzed $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells. (A-D) Magnified image of the structure of the plasmolyzed cells. The arrowheads indicate the blebbing from the outer membrane. (E) The multilamellar vesicle generated from the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells.

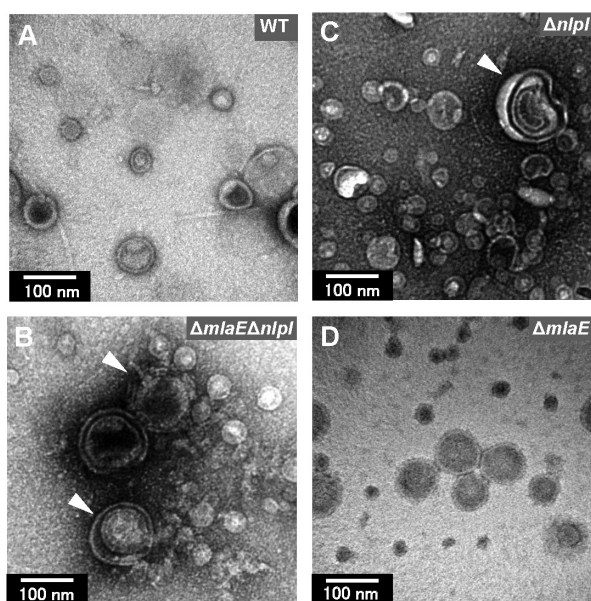


Fig. 4 Transmission electron microscopy images of the OMVs isolated from *E. coli*. (A) WT. (B) $\Delta mlaE\Delta nlpI$. (C) $\Delta nlpI$. (D) $\Delta mlaE$ strains. The OMVs were stained with uranyl acetate.

大腸菌細胞からのPGの調製と急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による観察

NlpIはPG層の架橋を加水分解する酵素であるMepsの機能を制御するリポタンパク質として報告され、*nlpI*を欠損することでMepsによるPG層の加水分解が促進され、PG層と外膜の結合が緩み、外膜が隆起しやすくなることでOMVsの生産が促進されると考えられる。本研究において、細胞内で原形質分離が生じていることもその推察を裏付けるものである。そこで、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ のPGを調製し、同様に急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により観察した。まずは、酸化タングステンでネガティブ染色したPGをTEMで観察したところ、野生株と $\Delta mlaE\Delta nlpI$ でPGが形状を保ったまま調製できていることが確認された (Fig.5A, E)。

続いて、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法で表面状態を観察したところ、野生株のPGは細胞を観察した際と類似した形状をしており (Fig.5B)，さらに高倍率で撮影すると滑らかな表面構造をとっていることが観察された (Fig.5C, D)。一方で、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では長細い形状をしたPGが多く、細胞と同じような傾向が見られた。さらに高倍率で観察すると、図中の矢印で示すように長軸先端部に穴が開いている様子が複数観察され、大きなものでは直径50nmを超えていた (Fig.5G, H)。一般に大腸菌のPG構造上に存在する隙間は2nm程度であり、野生株には確認されなかったため、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ ではPG

構造が脆弱化していることが示唆された。他の研究グループにより、シェワネラ属細菌ではPGの穴から細胞内膜や細胞内成分がペリプラズムに流出し、その成分を内包した外内膜小胞 (outer-inner membrane vesicles, OIMVs) が報告されており (Pérez-Cruz *et al.*, 2013)，この結果を受け $\Delta mlaE\Delta nlpI$ ではOIMVが生産されている可能性が考えられた。

以上の結果から、予想される大腸菌株 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ のOMV生産機構をFig.6にまとめる。 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ は通常のOMVと多重膜小胞であるOIMVを生産しており、OMVの生産促進に関しては、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ においてLpp-PG架橋の機能不全により、細胞の長軸先端部位で原形質分離が高頻度で生じ、余分な外膜が括れ取られることで、生産が促進することが明らかとなった。OIMVの生産に関しては、一段階目として、内膜や細胞質膜物質がPGの穴を通してペリプラズム空間に漏出し、細胞内小胞が形成される。二段階目として、細胞内小胞が外膜とともに細胞外へ放出され、多重層小胞であるOIMVが生産されることが考えられた。以上の様に、本研究では電子顕微鏡を用いたアプローチによって、大腸菌の多重遺伝子欠損株の新たな膜小胞形成過程を明らかにした。またこの過程において、細胞膜の断片化や再結合による膜小胞の形成が生じているかどうかに関しては現時点では明らかとなっておらず、ライブセルイメージング等を用いた観察による確認が必要である。

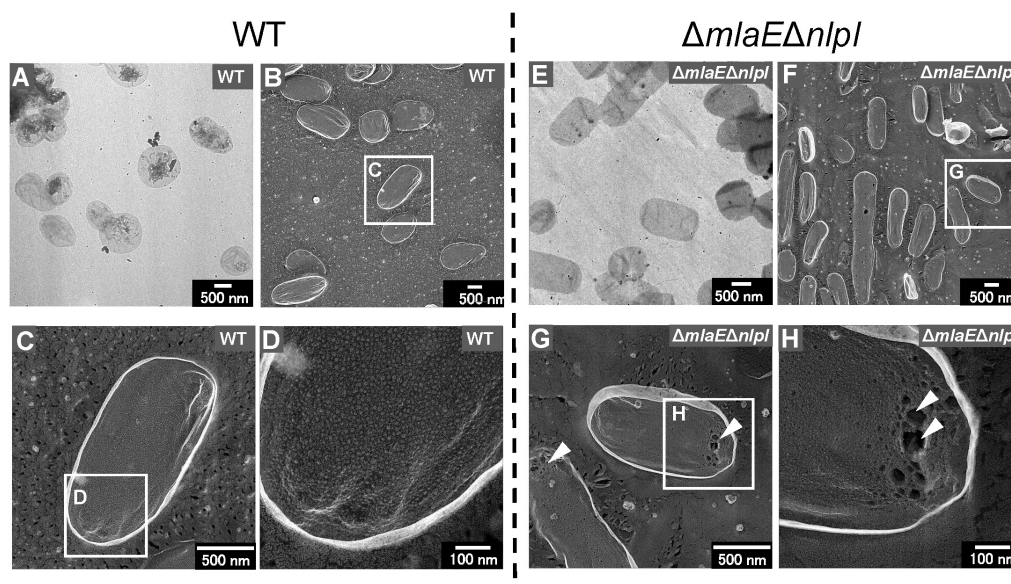


Fig. 5 Surface structure of PG of the WT and $\Delta mlaE\Delta nlpI$ *E. coli* cells. (A, E) The TEM image of the PG stained with uranyl acetate of WT and $\Delta mlaE\Delta nlpI$. (B) Field image of the WT cells. (C–D) Magnified image of the surface of the WT PG. (F) Field image of the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ PG. (G–H) Magnified image of the surface of the $\Delta mlaE\Delta nlpI$ PG.

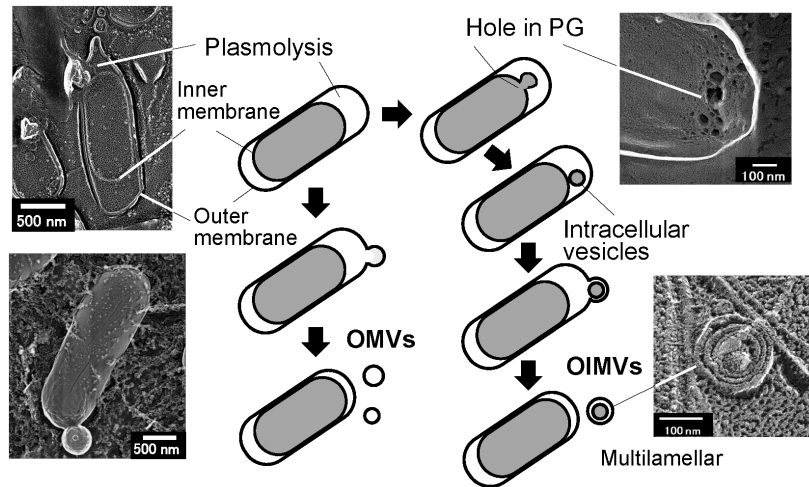


Fig. 6 Possible models of the mechanism underlying vesicle formation by $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells. Left side: model for mechanism in the promoted unilamellar OMV production. Right side: model for mechanism in OIMV production.

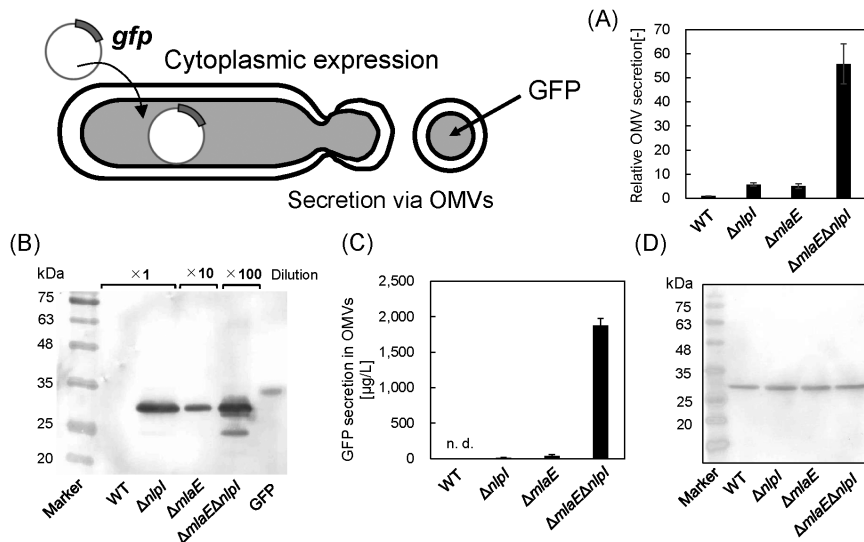


Fig. 7 Green fluorescent protein (GFP) secretion in the OMV fraction isolated from each *E. coli* strain. (A) Relative OMV production by each *E. coli* strain normalized to that by the WT strain. (B) Western blot analysis of secreted GFP using an anti-His-tag primary antibody. (C) Quantitative evaluation of GFP secretion in the OMV fractions of corresponding *E. coli* strains. (D) Western blot analysis of the GFP produced in each *E. coli* cell. Loading samples were prepared on an OD_{660} basis to include the same quantity of cells. The data are expressed as the mean of three independent experiments ($n=3$) and standard deviation (vertical bar).

OMV 高生産株を用いた大腸菌のタンパク質分泌生産

これまでの結果から、OMV 高生産株である $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では OIMV と考えられる多重膜小胞が確認され、PG にも穴が存在することが明らかとなったことから、この株を用いることで組換えタンパク質の分泌生産を試みた。モデルタンパク質として GFP を細胞質内に発現させ、OMV 画分を回収して GFP の分泌量を評価した。まず

増殖に関しては、 $\Delta nlpI$ および $\Delta mlaE$ の OD_{660} 値はそれぞれ 4.6 および 4.5 であり、野生株の 6.0 よりも低く、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ は 2.7 で最も低かった（データ省略）。タンパク質基準で OMV 生産量を相対比較したところ (Fig. 7A), $\Delta nlpI$ および $\Delta mlaE$ による OMV 量はそれぞれ野生株の 5.7 倍および 5.1 倍であったが、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ は 55.8 倍となった。

これらの結果は、pCA24N-gfp プラスミドを導入しても高いOMV生産量は維持されることを示唆している。続いて、OMV画分に含まれるGFPをウエスタンブロットティングにより評価した(Fig.7B)。野生株では検出感度以下でありバンドが検出されなかったが、各欠損株では検出され、特に $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では非常にバンド強度が強かった。濃度既知のGFPのバンド強度から培養液中の分泌濃度を算出したところ(Fig.7C)、 $\Delta nlpI$ と $\Delta mlaE$ ではそれぞれ14.3 μ g/Lと36.5 μ g/Lであった。一方で、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ では約2mg/Lと他の株と比較して非常に高い分泌濃度を示した。この原因として、分泌効率の向上ではなく細胞内での発現量そのものが増加したことが考えられたため、細胞量を合わせてウエスタンブロットティングを行い細胞内のGFP量を比較したところ、Fig.7Dに示すように株間でほとんど差がないことがわかった。またOMV生産量の増加倍率以上に分泌量が向上している理由については、細胞質内に発現したGFPがPGの穴を通してペリプラズムに漏出し、OMVへの内包効率が向上したことが考えられた。以上の結果から、OMVを介した組換えタンパク質の分泌生産の有効性が実証された。今後は、密度勾配超遠心法などにより、全OMV画分に占めるOIMVの割合を評価することで、分泌への寄与度を評価できると考えている。

OMV高生産株を用いた大腸菌の脂肪酸分泌生産

OMVを介したタンパク質の分泌生産が実証されたため、続いて疎水性が高くタンパク質より分泌が難しい有用物質として脂肪酸の分泌生産を試みた。脂肪酸は、分解に関与する*fadE*遺伝子を欠損し、生産の促進に関与するチオエステラーゼ遺伝子(*tesA*)を細胞質内で過剰発現させることで、細胞内に蓄積することが報告されている(Liu *et al.*, 2017)。今回は、この脂肪酸生産菌 $\Delta fadE/tesA$ の*mlaE*と*nlpI*を欠損させた $\Delta fad\Delta mlaE\Delta nlpI/tesA$ を作製し、培地中への脂肪酸の分泌量をガスクロマトグラフィーによって測定した。結果として、 $\Delta fadE/tesA$ では、約300mg/Lの濃度で脂肪酸を生産したが、大腸菌細胞内に蓄積した状態であり培養上清からはほとんど検出されなかった。一方で、 $\Delta fad\Delta mlaE\Delta nlpI/tesA$ では、増殖が抑制され脂肪酸の生産量が10%以下に減少し、さらに培養上清への分泌は確認できなかった。この結果は、細胞のエネルギー消費が大きい脂肪酸生産株に対して、細胞を脆弱化させるOMV生産促進用の遺伝子欠損を重ね合わせたことで、細胞の負荷が大きくなり過ぎたことが原因であると考えられた。

CRISPRiによる発現抑制株の作製とOMV生産量の評価

OMVを高生産させる手法として、遺伝子欠損のアプ

ローチ以外に遺伝子の発現量を制御可能な技術であるCRISPRiを応用し、最適な発現抑制状態を探索することで、細胞の活性を保ったままOMVの高生産を試みた。結果として、複数設計したgRNAの内、*mlaE*では*mlaE*⁻¹、*mlaE*⁻²、*mlaE*⁻³の3つ(Fig.8A)、*nlpI*では*nlpI*⁻⁴の1つのgRNAが有意に対象遺伝子のmRNA発現を抑制した(Fig.8B)。

一般的に、対象遺伝子のN末端に近い領域にgRNAを設計したほうが抑制効率が高いとされるが、今回の結果からその傾向は見られなかった。*mlaE*では、3つのgRNAをそれぞれ導入することで、野生株の3、10、32%の発現量に抑制された(Fig.8A)。ここで、増殖を示すOD₆₆₀は野生株と*mlaE*欠損株の間の値となり回復傾向が確認された(Fig.8C)。さらに、OMV生産量は遺伝子の発現抑制率合いに応じて、野生株と欠損株の間の値となった(Fig.8A)。*nlpI*に関しては、gRNAの導入により13%の発現量に抑制され(Fig.8B)、増殖は野生株と欠損株の間の値となった(Fig.8D)。興味深いことに、OMV生産量は、欠損株よりも40%ほど増加した(Fig.8B)。以上の結果から、CRISPRiを用いて発現抑制株を作製することで、欠損株よりも高い増殖を保ちながら、OMV生産量を向上できることがわかった。今後は、*mlaE*と*nlpI*の発現抑制を組み合わせる、もしくは*mlaE*欠損株の*nlpI*発現を抑制するなどの最適化を行うことで、細胞負荷の高い有用物質生産に向けたOMV高生産株を作製する予定である。

要 約

外膜小胞(Outer Membrane Vesicles; OMVs)は、グラム陰性細菌の外膜から遊離した直径20~250nmの細胞外小胞である。本研究では、大腸菌のペプチドグリカン(PG)構造維持に関与する*nlpI*遺伝子と、外膜外層へのリン脂質バランスを維持する*mlaE*遺伝子の欠損を重ねた2重欠損株 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ が、野生株の約30倍のOMVsを生産することを明らかにした。さらに急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により、 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ の細胞ではペリプラズム空間が広がる原形質分離と細胞内小胞が生じ、多重膜小胞も生産することを確認した。さらに急速凍結レプリカ電子顕微鏡法によるPGの観察では、2重欠損株では野生株には見られないサイズの穴が多数観察されたことから、PGの穴を介して内膜がペリプラズムに漏出し、更に外膜に包まれた外内膜小胞が生産されていると考えられた。この結果より、細胞質内で生産される組換えタンパク質や脂肪酸の細胞外分泌を目的とし、組換えタンパク質としてGFPを細胞質内発現させたところ、2重欠損株では2mg/L程度の濃度でOMV画分に分泌さ

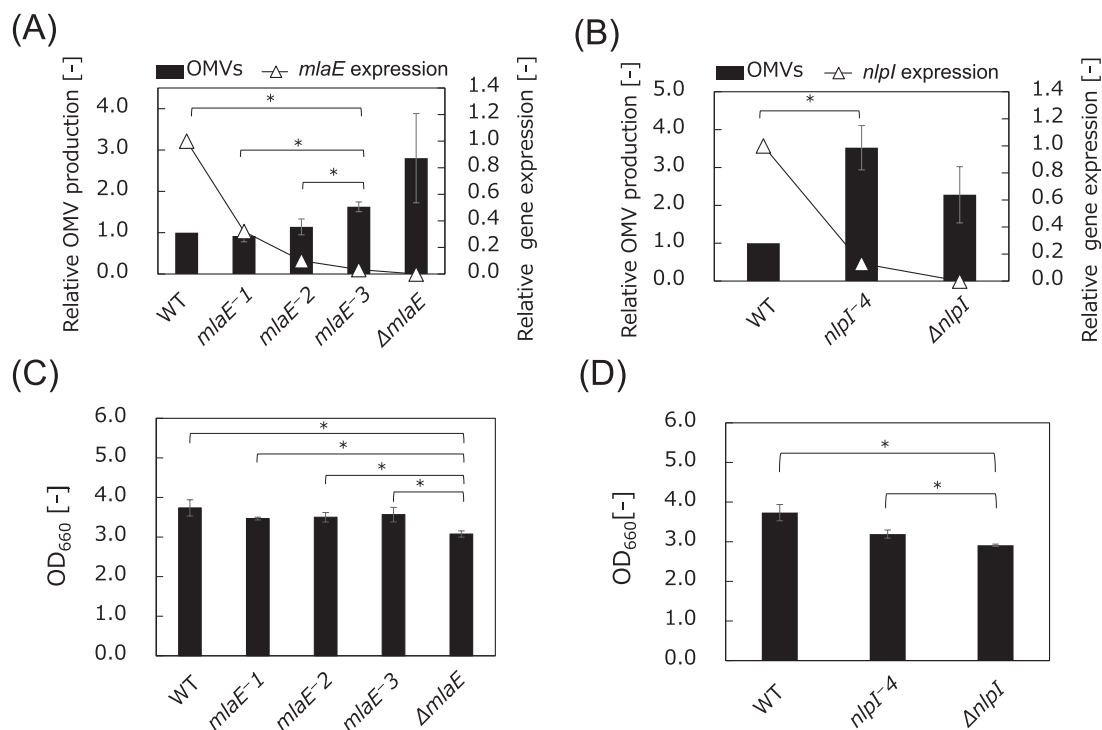


Fig. 8 Expression suppression of *mlaE* and *nlpI* using Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Interference (CRISPRi). (A) Relative gene expression and OMV production of *mlaE*-repressed strain. (B) Relative gene expression and OMV production of *nlpI*-repressed strain. (C) OD_{660} of *mlaE*-repressed strain. (D) OD_{660} of *nlpI*-repressed strain. The data are expressed as the mean of three independent experiments ($n=3$) and standard deviation (vertical bar). Significant difference ($p < 0.05$) is marked with asterisks.

れ、タンパク質分泌生産ツールとして有効であることを確認した。続いて、遺伝子の欠損と過剰発現により作製された脂肪酸生産大腸菌に、さらに $\Delta mlaE$ と $\Delta nlpI$ の2重欠損を重ねて脂肪酸の分泌生産を試みたところ、増殖と脂肪酸生産量自体の著しい低下が確認され、細胞への負荷が大きすぎる事が明らかとなった。そこで、遺伝子を欠損するのではなくCRISPRi技術を用いて発現抑制を行ったところ、増殖低下を抑えつつOMVs生産を向上させることに成功した。今後は、発現抑制状態を最適化することで脂肪酸などの細胞負荷の大きな有用物質の分泌生産を目指す予定である。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 熊添優希, 澤邊朋美, 尾島由紘, 東雅之. 2022. 大腸菌の外膜小胞を介した有用物質分泌生産の検討. 化学工学会岡山大会2022 (12月19日, 岡山)
- 2) Ojima, Y., Sawabe, T., & Azuma, M. 2022. Outer membrane vesicles of *Escherichia coli* and its application to the biotechnology field. The 34th Annual Meeting of the Thai Society

for Biotechnology and International Conference (TSB2022) (November 24–25, Bangkok, Thailand) Invited talk

- 3) Ojima, Y., Sawabe, T., Nakagawa, M., Tahara, YO., Miyata, M., & Azuma, M. 2021. Aberrant membrane structures in hypervesiculating *Escherichia coli* strain $\Delta mlaE \Delta nlpI$ visualized by quick-freeze deep-etch electron microscopy. EMBO Biologists Workshop Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (November 23–26, Tsukuba (Hybrid), Japan)
- 4) 尾島由紘, 澤邊朋美, 中川真緒, 田原悠平, 宮田真人, 東雅之. 2021. 電子顕微鏡により可視化された大腸菌の外膜小胞高生産株 $\Delta mlaE \Delta nlpI$ の異常な膜構造. 第73回日本生物工学会大会 (10月27–29日, オンライン)
- 5) 中川真緒, 尾島由紘, 澤邊朋美, 田原悠平, 宮田真人, 東雅之. 2021. 大腸菌Nissle1917株の外膜小胞高生産株の特性解析. 第73回日本生物工学会大会 (10月27–29日, オンライン)

原著論文

- 1) Ojima, Y., Sawabe, T., Nakagawa, M., Tahara, YO., Miyata, M., & Azuma, M. 2021. Aberrant membrane structures in hypervesiculating *Escherichia coli* strain $\Delta mlaE \Delta nlpI$ visualized by electron microscopy. *Front. Microbiol.* 12: 706525

その他（総説・書籍・特許など）

- 1) 尾島 由紘, 東 雅之. 2022. バイオプロセスを用いた有用性物質生産技術～大腸菌を用いたタンパク質分泌生産～. 情報技術協会. pp.477-487 (第7章分担執筆)
- 2) 尾島 由紘, 東 雅之. 2021. 大腸菌の外膜小胞高生産株の作製とタンパク質分泌生産等への利用. 酵素工学ニュース. 86, pp.32-35

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、急速凍結レプリカ電子顕微鏡観察において、本研究の遂行にご協力いただいた大阪公立大学大学院理学研究科の宮田真人氏ならびに田原悠平氏に感謝の意を表します。

文 献

Gujrati, V., Kim, S., Kim, S-H., Min, J.J., Choy, H.E., Kim, S.C., & Jon, S. 2014. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano*. **8**:1525-1537.

Kubitschek, H.E. 1990. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* **172**: 94-101.

Kulp, A. J., Sun, B., Ai, T., Manning, A. J., Orench-Rivera, N., Schmid, A. K., & Kuehn, M. J. 2015. Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **10**, e0139200.

Liu, D., Wan, N.F., Zhang, F., Tang, Y.J., & Wu, S.G. 2017. Enhancing fatty acid production in *Escherichia coli* by *Vitreoscilla* hemoglobin overexpression. *Biotechnol. Bioeng.* **114**:463-467.

Manning, A.J., & Kuehn, M.J. 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* **11**: 258.

McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., & Kuehn, M.J. 2006. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* **188**: 5385-5392.

Ojima, Y., Sawabe, T., Konami, & K., Azuma, M. 2020. Construction of hypervesiculation *Escherichia coli* strains and application for secretory protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **117**: 701-709.

Pérez-Cruz, C., Carrión, O., Delgado, L., Martínez, G., López-Iglesias, C., & Mercade, E. 2013. New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: 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. *Nat. Commun.* **7**: 10515.

Schwechheimer, C. & Kuehn, M.J. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 605-619.

Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. 2013. Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **195**: 4161-4173.

Schwechheimer, C., Rodriguez, D. L., & Kuehn, M. J. 2015. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*. **4**: 375-389.

Tahara, Y.O., & Miyata, M. 2023. Visualization of peptidoglycan structures of *Escherichia coli* by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* **2646**: 299-307.

Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 13-24.

新規分析法によるセリンラセマーゼ生産菌の網羅的探索と このラセマーゼによる D-セリン高効率生産の研究

金 内 誠

宮城大学食産業学群

〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立2-2-1

Studies of screening D-serine producing bacteria using enzymic assay method and enhanced production of D-serine using bacteria

Makoto Kanauchi

School of Food Industrial Sciences, Miyagi University
2-1, Hatatate 2-chome, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi 982-8686

Among the many D-amino acids which have healthy functions, D-serine reportedly prevents cognitive impairment of the human brain. After lactic acid bacteria capable of producing D-serine were selected, we investigated the bacteria cultivation conditions for production of D-serine. Many microorganisms that have serine racemase produce D-serine from L-serine. For this study, D-serine was assayed using colorimetry, for which peroxide produced by amino acid oxidase reacting with D-serine was colored using methyl benzothiazolinonehydrazone (MBTH) and dimethylaniline (DMA). Lactic acid bacteria (129 strains) were cultivated in media containing L-serine. After cultivation, the bacteria-converted D-serine was assayed. Results demonstrated high D-serine conversion potential for the H74 strain, which was identified as *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* according to its morphological, physiological, and molecular biological characteristics. The H74 strain converted efficiently L-serine to D-serine in a medium containing 1.0% L-serine. The strain converted efficiently L-serine to D-serine at 15°C, and the conversion rate at 15°C was found to be four times higher than that found at 30°C. The high conversion rate at 15°C continued for 8 days.

Serine racemase activity in the strain was found in the cell membrane and cytoplasm fractions. These findings suggest that serine racemase is a membrane-binding cytoplasmic enzyme. From these findings, we infer that the strain has high potential for the production of D-serine and foods that contain D-serine as supplements supporting health.

Key words: D-serine, D-serine producing bacteria, lactic acid bacteria, racemase

緒 言

アミノ酸は、タンパク質の構成成分であり、生物の代謝や構造・組織の維持等、各種生命活動に関わる重要な物質である。また、グルタミン酸からはγアミノ酪酸(GABA)、チロシンからはドーパミン、トリプトファンからはセロトニンなど脳内の伝達物質の形成にも関与する(Rhintamäki & Partonen, 2011)。さらに脂質の代謝にはリジンやメチオニンから代謝変換されるカルニチンが関与する(Flanagan *et al.* 2010)。そのために、栄

養学的だけでなく生化学的にも重要な物質である。アミノ酸の特徴の一つとして、光学活性を持ち、鏡像異性体であるL体とD体が存在し、通常のタンパク質を構成しているものは、L型のアミノ酸のみである(胸組, 1998)。そのためこれまでは、D型のアミノ酸の研究が極めて少なかった。

本来D型のアミノ酸(D-アミノ酸)は、微生物の細胞表層の構成成分として生産される(Lam *et al.*, 2009; 宮本, 2019)。これまで *Enterococcus gallinarum* は、生産するD-アミノ酸について詳細な検討がなされ、抗生物質であるバンコマイシン耐性を獲得するためにセリンラセマーゼ遺伝子(*vanT*)を発現してD-セリンを合成し、

細胞表面に蓄積すると報告されている (Billot-Klein *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 1999). この報告のように D-アミノ酸は、細菌の外部からのストレス耐性に対し、重要な役割を果たすと考えられる。また、発酵微生物も D-アミノ酸を変換する (Kato *et al.*, 2011) が、その多くは菌体外に漏出し、その結果として D-アミノ酸は発酵食品中に含有することとなる (大森・大島, 2012; 井上ら, 2014). 特に、乳酸菌類は、D-アミノ酸を生産するアミノ酸ラセマーゼが強いことが知られるが、その特徴の一つとして、その活性の強さや酵素学的な特性は菌株間で大きく異なる (牟田口ら, 2015).

さらに近年では、分析機器の発達により D-アミノ酸を測定可能な分析機器が開発され、生体の代謝における生理機能も明らかとなった。D-アミノ酸はエネルギー変換に関わるだけでなく、食品に好ましい香味を付与する効果 (呈味性) や、疲労回復、肌のうるおいの保持、免疫力の向上等の効果 (大森・大島, 2012) を有することが報告されている。また、Avellar *et al.*, (2016) は、高齢健常者において D-セリンが空間記憶能力、問題解決能力、学習能力を促進することを報告した。また、D-セリンは、統合失調症やアルツハイマー症、脳卒中等、脳内の神経伝達に関わる疾患に関与し、症状を改善する (丸山ら, 2011). このような D-セリンが持つ脳疾患改善につながる効果は、高齢者の健康維持に大きく貢献することが期待できる。

このように機能性にすぐれた D-アミノ酸を作り出す乳酸菌を選抜して、発酵食品に応用することができれば、医薬品に頼らないで、日常の食生活による健康増進が可能となる。特に高齢社会を迎えた日本においては、高齢者の健康維持に貢献できると考えられる。

そこで、本研究ではまず、機能性に優れた D-セリンの生産に着目し、高セリンラセマーゼ活性を持つ乳酸菌を自然界や食品から分離スクリーニングした。スクリーニング後に得られた高変換株は培養日数、培地組成などの D-セリン変換最適培養条件や、細胞分画によるセリンラセマーゼの酵素局在を検討し、D-セリンを効率的に製造し、新規機能性食品への開発につなげることを目指した。

実験方法

乳酸菌の分離源

乳酸菌の分離源として、ナチュラルチーズ、なれずし、ホヤやサバの水産物加工物、植物試料なども用いた。

乳酸菌の分離

各試料の分離は、成書を一部改変して行った (内村・

岡田, 1992). 分離源となる試料 4.0g に MRS (De Man, Rogosa, Sharpe ; Oxoid, Thermo Scientific 社) 5.0mL を添加し、30℃ で、48~72 時間培養した (集積培養). その後、この培養液を PBS 溶液 (リン酸緩衝生理食塩水) にて、 1.0×10^5 倍まで 10 倍ずつ段階希釈した。分離寒天培地には、MRS-白亜寒天培地 (0.5% 炭酸カルシウムを含む MRS 培地) (Kondo *et al.*, 2016) に、希釈した前培養液を塗抹後、アナエロパック (三菱ガス) を用いて、嫌気下で 30℃、72 時間培養し、クリアゾーンをつくったコロニーは釣菌した。釣菌したコロニーは GYP 液体培地 (1.0% グルコース、1.0% 酵母エキス、0.5% ポリペプトン、1.0% ツイーン 80 溶液、0.5% ミネラル溶液 pH6.5) (内村・岡田, 1992) に接種し、培養後、グリセロールと混合し、グリセロール・ストック溶液として -80℃ で冷凍保存した。ただし、ツイーン 80 溶液は 50mg/mL、ミネラル溶液は 1.0mL 中に硫酸マグネシウム・七水和物; 40mg、硫酸マンガン・四水和物; 2mg、硫酸鉄 (II)・七水和物; 2mg、塩化ナトリウム; 2mg となるようにした。

培地中の L-セリンから D-セリンへの高変換菌株のスクリーニング

供試菌株として分離菌株および研究室保存株 (合計 129 株) は 30mL の MRS 液体培地に接種し、30℃、24 時間、静置にて前培養した。培養後、遠心分離 (6,000 ×g, 10min, 4℃) を行い集菌した。菌体は PBS 溶液で洗浄し、再び遠心分離 (6000 ×g, 10min, 4℃) を行い集菌した。菌体の洗浄は 3 回行い、PBS 溶液に再懸濁した。次に 1.0% L-セリンを含む GYP 液体培地に PBS 懸濁菌体を終濃度 1.0×10^7 cells/mL となるように接種し、30℃ で 48 時間静置培養した。培養液 10mL を 15mL 容チューブに採取し、遠心分離 (6,000 ×g, 10min, 4℃) を行った。上清部分を採取し、試料溶液とした。

培地中の L-セリンからの D-セリンへの変換率の測定

試料溶液中の D-セリン濃度の定量は、松本・金内 (2021) および Kanauchi (2019) の方法を一部改変して行った。各培養液 (50μL) と 150μL の検出試薬溶液 [6.0U/mL D-アミノ酸オキシダーゼ (ブタ肝臓由来, Sigma-Ardrich 社), 2.0mg/mL ペルオキシダーゼ (西洋わさび由来, 和光純薬株式会社), 0.11mM メチルベンゾチアゾリノン ヒドラゾン 塩酸塩 (MBTH), 0.79mM ジメチルアニリン (DMA), 10mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を 50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解] を 96 穴ウェルマイクロプレートに分注した。これらを 37℃、30 分間反応させた。反応後、プレートリー

ダー Multiskan GO アドバンス (Thermo Fisher Scientific 社) で 590nm の吸光度を測定した。検量線には、0～50mM の D-セリン溶液を使用した。コントロールは、L-セリンを含む GYP 培地の菌体未接種培地を用いた。培地中の L-セリンからの D-セリンへの変換率は、下記の計算式より算出した。

$$D\text{-セリン変換率 (\%)} = \frac{\left[\frac{\text{培養後の培地中の D-セリン濃度 (mM)}}{\text{添加後の培地中の L-セリン濃度 (mM)}} - \frac{\text{菌体未接種の培地中の D-セリン濃度 (mM)}}{\text{添加後の培地中の L-セリン濃度 (mM)}} \right]}{\text{添加後の培地中の L-セリン濃度 (mM)}} \times 100$$

アミノ酸分析計による D-セリンの分析

D-セリンを含む D-アミノ酸は Kuranaga & Kakeya (2022) の方法を一部改変して、測定した。すなわち、サンプル溶液に *N*-(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-alaninamide (L-FDLA) を加え、塩基性条件下で反応させ、L-アミノ酸を誘導化させた。中和後、0.02N 塩酸で希釈し、高速アミノ酸分析計 LA8080 (日立ハイテック) にて測定した。

生理学的・形態学的特性

被検菌は、MRS 液体培地にて、30℃、24 時間、静置で前培養し、遠心分離 (6,000×g, 10min, 4℃) を行い集菌した。菌体は、PBS 溶液で洗浄し、再び遠心分離 (6,000×g, 10min, 4℃) により集菌した。菌体は、PBS 溶液にて 3 回行ったものを試験に使用した。被検菌のグラム染色試験は、フェイバー G (日水製薬株式会社) によって染色し、油浸レンズを用いて光学顕微鏡を用いて形態観察した。カタラーゼ活性試験は内村・岡田 (1992) に従った。すなわち、菌体に 3.0% 過酸化水素溶液を 500μL 添加し、3 分後、気泡の確認によりカタラーゼ活性の有無を判断した。被検菌の被検糖および被検炭素源類の資化性試験は、YP 基本培地 (1.0% 酵母エキス, 0.5% ポリペプトン, 1.0% ツイーン 80 溶液, 0.5% ミネラル溶液) に、被検糖および被検炭素源を 1.0% となるように添加した (内村・岡田 1992)。被検糖および被検炭素源として、D-アラビノース, L-アラビノース, フルクトース, ガラクトース, グルコース, ラクトース, マルトース, マンニトール, マンノース, D-メレチトース, L-ラムノース, ラフィノース, サリシン, デンプン, D-ソルビトール, スクロース, トレハロース, キシロース, グルコン酸ナトリウムの 19 種類を用いた。対照として被検糖および被検炭素源を添加しない基礎培地を用いた。あらかじめ前培養した被検菌を終濃度 1.0×10^5 cells/mL となるように菌を各培地に接種し、30℃、48 時間で静置培養後、菌の増殖を観察した。また、被検菌の生育温度の検討は、1.0% グルコースを含む YP 基本培地を用い、被検菌を終濃度 1.0×10^5 cells/mL となるように接種

し、15～60℃まで検討した。

分子生物学的特性

16S リボソーム RNA をコードする DNA のホモロジー解析は、成書に従った (鈴木ら, 2001)。プライマーは、Forward primer 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') および Reverse primer 1525r (5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') を用いた。増幅後、DNA シークエンサー (3130 sequencer, アプライド バイオサイエンス製) とシークエンス反応キット (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, アプライド バイオサイエンス製) を用いて解析した。また、塩基配列の相同性は、NCBI (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) にて解析した。

炭素源 (糖源) の種類と濃度の違いによる培地中の L-セリンからの D-セリンの変換率

1.0% L-セリンを含む YP 基本培地 [1.0% 酵母エキス, 0.5% ポリペプトン, 1.0% ツイーン 80 溶液, 0.5% ミネラル溶液] に、各種糖を 1.0% となるように添加した。炭素源として、生理学的試験にて生育が確認できた D-アラビノース, L-アラビノース, フルクトース, ガラクトース, グルコース, ラクトース, マルトース, マンニトール, マンノース, ラフィノース, サリシン, デンプン, D-ソルビトール, スクロース, トレハロース, キシロースの 16 種類を用いた。スクリーニング株は、あらかじめ静置培養にて前培養し、 1.0×10^7 cells/mL となるように各炭素源を含む培地に接種し、30℃、48 時間静置培養した。培養液を遠心分離 (6,000×g, 10min, 4℃) し、上清の D-アミノ酸を上記方法によって測定した。

窒素源の添加量の違いによる培地中の L-セリンからの D-セリン変換

1.0% D-アラビノース基本培地 [1.0% D-アラビノース, 1.0% 酵母エキス, 1.0% L-セリン, 1.0% ツイーン 80 溶液 (50mg/mL), 0.5% ミネラル溶液] に、0.5% ポリペプトン, 1% ポリペプトン量を加えた培地に、あらかじめ前培養したスクリーニング株を 1.0×10^7 cells/mL となるように接種し、30℃、48 時間静置培養した。さらにペプトン無添加の 1.0% D-アラビノース基本培地でも同様に検討した。上記同様、培養液を遠心分離し、上清の D-アミノ酸を測定した。

ビタミン類の添加の違いによる培地中の L-セリンからの D-セリン変換

1.0% D-アラビノース基本培地に、ビオチン, ピリドキ

サル塩酸塩を、それぞれ1.0 μ g/L, 3.0 μ g/L, 9.0 μ g/L 添加し、あらかじめ培養したスクリーニング株を1.0 $\times 10^7$ cells/mLとなるように接種し、上記同様に培養してD-セリン変換率を測定した。また、ビタミン無添加の1.0% D-アラビノース基本培地に、上記同様にスクリーニング株を接種後、培養、遠心分離し、上清のD-アミノ酸を測定した。

培養温度の違いによる培地中のL-セリンからのD-セリン変換

上記からD-セリン高変換のために決定したD-セリン高変換培地 [1.0% D-アラビノース, 1.0% 酵母エキス, 1.0% L-セリン, 1.0% ツイーン 80 溶液, 0.5% ミネラル溶液, ピリドキサル塩酸塩 (3.0 μ g/L), pH6.5] に上記同様にあらかじめ培養したスクリーニング株を接種後、15~37 $^{\circ}$ C, 48時間培養し、D-セリン変換率を測定した。

培養時間の違いによる培地中のL-セリンからのD-セリン変換

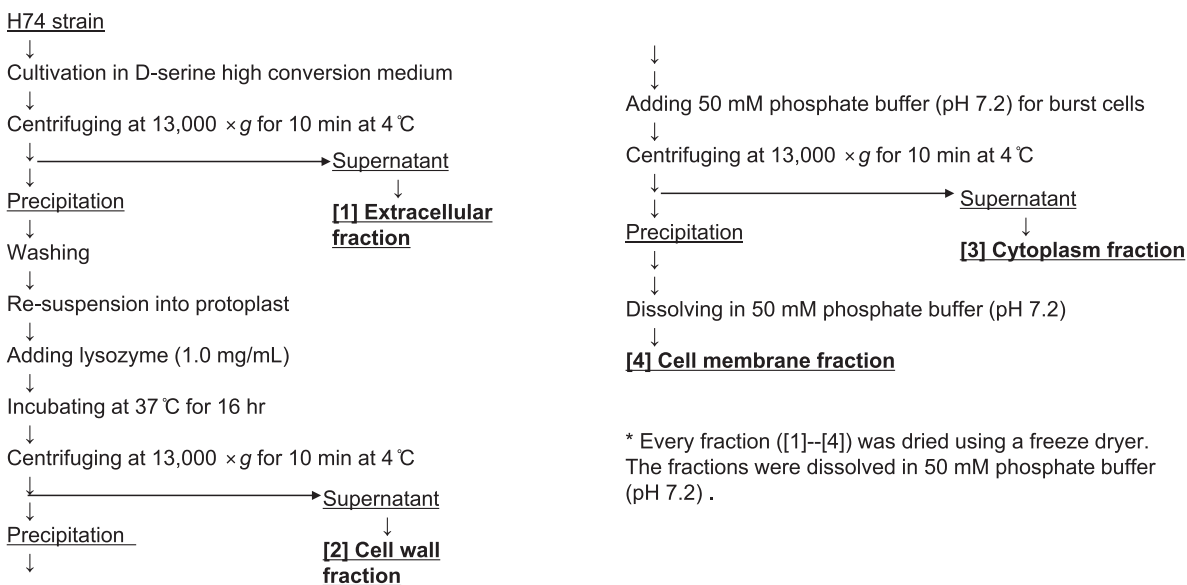
上記からD-セリン高変換のために決定したD-セリン高変換培地に、あらかじめ培養したスクリーニング株を接種後、15 $^{\circ}$ Cで培養して、最大8日間培養し、経時的にサンプリングして、D-セリン変換率を測定した。

細胞の分画

あらかじめ培養したスクリーニング株は、50mLのD-セリン高変換培地に培養菌株に1.0 $\times 10^7$ cells/mLとなるように接種した。これを15 $^{\circ}$ C, 4日間培養後に遠心分離にて集菌した。上清は①菌体外画分とした。沈殿した菌体はPBS溶液で2回洗浄後、プロトプラスト緩衝液 (50mM トリス-塩酸緩衝液, 5.0mM EDTA, 5.0mM 塩化ナトリウム, 25%スクロース, pH7.5) に懸濁後、リゾチームを終濃度1.0mg/mlになるように添加し、37 $^{\circ}$ C, 16時間反応させた。反応後、遠心分離 (13,000 \times g, 10min, 4 $^{\circ}$ C) を行った。得られた上清を②細胞壁消化画分とした。沈殿に50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を加え、菌体をバーストさせた。これを遠心分離 (13,000 \times g, 10min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清を③細胞質画分とした。沈殿は50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 5.0mLに懸濁し、④細胞膜画分とした。各画分は凍結乾燥後、50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 5.0mL 各画分のセリンラセマーゼ活性を測定した。なお、分画方法は、Fig.1に示した。

分画した細胞のセリンラセマーゼ活性

細胞の分画溶液 (20 μ L) に50 μ LのL-セリン基質溶液 (1.0mM L-セリン, 50mM ピリドキサルリン酸塩を50mM トリス-塩酸緩衝液; pH7.5に溶解) を加え、37 $^{\circ}$ C, 30分反応させた。生成したD-アミノ酸は、上記



* Every fraction ([1]--[4]) was dried using a freeze dryer. The fractions were dissolved in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2).

Fig. 1 Method of finding H74 strain fractions. H74 strain bacteria were fractionated to localize D-serine racemase in the H74 strain organelles. The cultivated H74 strain was fractionated to four fractions, as the extracellular fraction, the cell membrane fraction, cell wall fraction, and cytoplasm fraction.

方法によって測定した。ネガティブコントロールは、50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) と各種L-アミノ酸を反応させた。測定は、3回以上繰り返し行った。

結果及び考察

培地中のL-セリンをD-セリンへ変換する乳酸菌のスクリーニング

アミノ酸ラセマーゼによって酵素生産されたD-アミノ酸の機能性は、数多く報告されている (大森・大島, 2012)。特にD-セリンは、統合失調症やアルツハイマー病、脳卒中等、脳内の神経伝達など治療法が確立していない疾患の治療に関与すると考えられる (Hashimoto *et al.*, 2004)。そこで、本研究では、機能性に富むD-セリンに着目し、培地中のL-セリンをD-セリンに変換するセリンラセマーゼ活性が強い乳酸菌を選抜することとした。

まず、初めにD-型セリンの測定原理はFig.2Aに示した。サンプル中に含まれるD型のアミノ酸にD-アミノ酸オキシダーゼを作用させることで、アミノ酸の酸化的脱アミノ化反応が引き起こされる。このときに生成する過酸化水素は、ペルオキシダーゼの触媒により、試薬中のMBTH及びDMAと反応することで、紫色の呈色反応が引き起こされる。これを吸光度測定すること測定できる。そこで濃度系列を調製したD-セリン溶液で測定した結果をFig.2Bに示した。その結果、濃度と吸光度に相関があり、 R^2 は0.9980であった。これによって十分に測定できることが確認できた。

また、D-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼ法

によるD-セリン量の精度は、L-FDLA処理後にアミノ酸分析装置によって測定し、確認した。L-FDLAは、L-アミノ酸のみを誘導化 (Kuranaga & Kakeya 2022; Marfey, 1984) し、通常のアミノ酸分析装置では分離されない。一方、L-FDLAによって誘導化されないD-アミノ酸は、アミノ酸分析装置によって分離、測定できる。そこで、L-, D-セリン混合溶液をD-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼ法とL-FDLA処理後にアミノ酸分析装置によるD-アミノ酸の測定を比較した。その結果、酵素法は精度よく測定できることが確認できた (データ未提示)。本実験での培地中のアミノ酸は、添加した1.0% L-セリン以外、ほとんどがペプトンに由来し、L型のアミノ酸でその総量は20mg/100g (データ未提示) と、添加したセリンに比べ圧倒的に少なく、培地中で多くを占める1.0%セリンが他のアミノ酸のD-型へ変換する影響は少ない。そこで、D-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼを用いた測定系にて、D-セリン変換乳酸菌を測定することとした。

ナチュラルチーズやなれずし、水産物加工物、植物試料などより細菌を60株分離した。これらから、強い乳酸生産性があり、グラム陰性で、乳酸菌と考えられる特徴の菌株は25株であった。また、グラム陽性でカタラーゼ陰性の研究室保有菌株は104株で、合計129株の中から、培地中のL-セリンからD-セリンへ変換する菌株のスクリーニングを行った。

培地中のL-セリンからD-セリンへ3.0%以上変換したものは6株、D-セリンへの変換率が2.0~3.0%未満のものは6株、D-セリンへの変換率が1.0~2.0%未満のもの

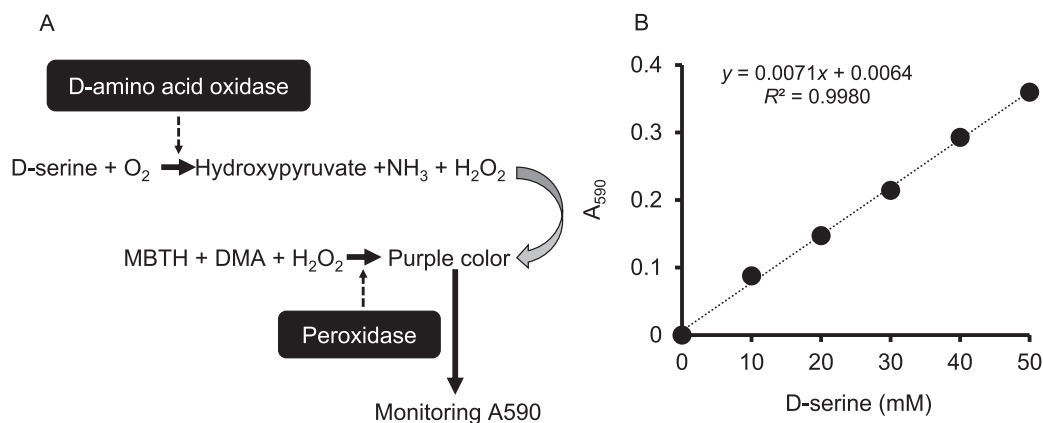


Fig. 2 Mechanisms of assaying D-serine and standard curves of D-serine. Panel A portrays mechanisms of assaying D-serine using the D-amino acid oxidase system. Panel B shows the standard curve for the assay of D-serine using the D-amino acid oxidase system.

は16株、D-セリンへの変換率が0.5~1.0%未満のものは13株、D-セリンへの変換率が0.5%未満のものは88株であった。培地中のL-セリンからD-セリンへの変換率が3.0%以上の値を示した6株の中でH74株が一番高く、変換率は約6.0~7.0%であった。また、他5株のD-セリンへの変換率は3.0~4.2% (データ未提示)であった。H74株は、伝統的な発酵食品である「へしこ」から分離したものであった。

培地中のL-セリンからD-セリンへ高変換する乳酸菌74株の同定

スクリーニングされたH74株の形態学的・生理学的特徴、分子生物学的特徴を検討した。H74株の各特性をTable 1に示した。H74株は、グラム染色の結果はグラム陽性で、顕微鏡観察の結果、二連~四連球菌であった。カタラーゼ活性試験では発泡が確認できず、カタラーゼを持たなかった。また、H74株は、発酵中に二酸化炭素を生成せず、ホモ型発酵形式を持つことから、ホモ乳酸発酵連鎖球菌であることが明らかになった (内村・岡田, 1992)。また、H74株の被験糖および被検炭素源の資化性は、被験糖および被検炭素源無添加を対照とした。H74株は、ラムノース、メレジトース、グルコン酸ナトリウム以外の糖は資化した。特にL-アラビノースは資化性が強かった。また、この時、滴定によって乳酸の生成量を求め、乳酸換算にて示した。48時間でグルコースからの乳酸生産は0.5~0.6g/100mLであった。L-アラビノースからの乳酸の生成は0.3g/100mL程度、D-アラビノースでも同程度であり、ペントースでは生育はよ

かったが、乳酸生産は少ないと考えられた。

アラビノースは自然界では、主にL体として存在する糖であり、植物細胞壁の構成成分の1つで、米や小麦などの穀類の細胞壁を構成するヘミセルロースである (檜作, 1999)。また、アラビノースは、多くの動物の腸内細菌が利用することが明らかになっている。Schutte *et al.* (1992) は、L-アラビノースを含んだ餌をブタに与えることで、揮発性脂肪酸及び乳酸の増加や消化率の増加を報告し、これは腸内の乳酸菌等がL-アラビノースを資化・発酵するためであった。

また、BLASTのデータベースとの相同性の結果、16S rDNA シークエンス解析ではH74株は、*Enterococcus faecium* (CP115812.1) 及び *Lactococcus lactis subsp. lactis* (CP064339.1) とで99.73%であった。次に生育温度を検討した結果、H74株の生育範囲は15~40℃で、15℃以下、50℃以上では生育できなかった。*Enterococcus faecium* は、10℃でも生育するとされている (内村・岡田, 1992)。また、*Lactobacillus* 属は、50℃以上では生育できないと報告されている (Ahmed *et al.* 2006.)。よって、一連の同定試験より、H74株は *Lactococcus lactis subsp. lactis* であると同定した。

Lactococcus 属は *Streptococcus* 属から、*Enterococcus* 属も *Streptococcus* 属から独立した属で、非常に近縁であると考えられている (Scheifer & Kilpper-Balz, 1984; Schleifer *et al.*, 1985)。また、Billot-Klein *et al.* (1994) は、*Enterococcus gallinarum* BM4174株が、D-セリンの生合成に関わるセリンラセマーゼ遺伝子 (*vanT*) を有することを報告した。従って *Lactococcus* 属も *Enterococcus*

Table 1 Physiological, morphological, and molecular biological characteristics of H74

Physiological characteristics		Sugar/carbon source		Growth	
Sugar/carbon source	Growth				
D-Arabinose	+	D-Sorbitol			+
L-Arabinose	+	Sucrose			+
Fructose	+	Trehalose			+
Galactose	+	Xylose			+
Glucose	+	Gluconate Na			-
Lactose	+	Sugar free			-
L-Rhamnose	-	Morphological and molecular biological characteristics			
Maltose	+	Shape			Coccus
Mannitol	+	Fermentation type			Homo
Mannose	+	Growth of temperature (°C)			15-40
D-Melezitose	-	Catalase			-
Raffinose	+	Pseudocatalase			-
Salicin	+				<i>Lactococcus lactis</i>
Starch	+	16S rRNA sequencing homology			subsp. <i>lactis</i> (Acc. #
					CP064339.1)
					99.73%

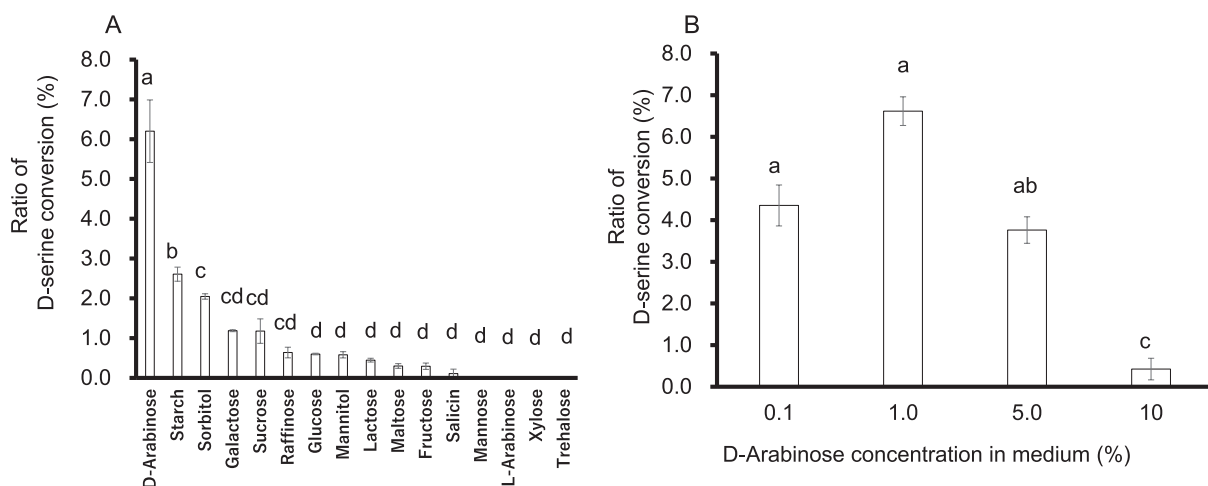


Fig. 3 Optimum carbon sources and optimum concentrations in the medium for D-serine conversion. The highest condition was calculated as having 100% as the relative ratio of D-serine conversion. Panel A shows the optimum sugars to achieve high conversion of D-serine by the H74 strain bacteria in the medium condition. Panel B shows the optimum D-arabinose concentration to achieve high D-serine conversion by the strain bacteria in the medium condition. After assaying D-serine conversion, they calculated Tukey's test for post-hoc analysis, $p < 0.05$, in panels A and B.

属と同様に、セリンラセマーゼ遺伝子を有する菌株である。今後は本株のセリンラセマーゼ遺伝子の塩基配列などの詳細について明らかにする必要があると考えられた。

H74株のL-セリンからD-セリンへ変換する最適条件

H74株におけるD-セリン高変換のための培養条件を検討した。まず、炭素源の種類によるD-セリン変換率を示した (Fig. 3A)。炭素源としてD-アラビノースを用いて培養したところ、グルコースで培養するより10倍以上D-セリン変換率が高かった。一方、生育を示さないラムノース、メレジトース、グルコン酸ナトリウムを炭素源とした培地のほか、マンノース、L-アラビノース、キシロース、トレハロースを含む培地で培養したH74でもD-セリンは検出されなかった。D-アラビノースは、米や米糠などの穀類の細胞壁を構成するヘミセルロースである (檜作, 1999)。本株は、米糠漬けの「へしこ」より分離し、米糠に多く存在するD-アラビノースを資化しやすいのではないかと考えられた。

H74株は、0.1~1.0% D-アラビノースを含む培養で、D-セリン変換条件が最大となった (Fig. 3B)。10% D-アラビノースを含む培地でのD-セリン変換率は0.43%と低下し、豊富な栄養条件では変換しなかった。

解糖系が活性化すると解糖系酵素GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) がセリン

ラセマーゼに結合し、GAPDHが産生するNADHを利用してD-セリンの合成を阻害する (鈴木, 2015)。よって、解糖系での糖の代謝が低い条件で生産されるのではないかと推察された。

次にD-セリン高変換のための培地中のポリペプトン濃度を調べた。その結果をFig. 4Aに示した。ペプトンを無添加の培地でH74株を培養したものがD-セリン変換率が高かった。ポリペプトンは、タンパク質を酵素で消化したものの総称で (駒ら, 2011) である。本実験で用いたポリペプトンは、ミルクカゼインをパンクレアチで消化させたもので、アミノ態窒素が2.1%以上含まれている。ポリペプトン中の遊離アミノ酸として、ロイシンやリシン、フェニルアラニンであった。一方、ポリペプトン中のセリン含有量はペプトン1.0g中に3.7mgであり、培地のL-セリンとD-セリン濃度は低く、さらに、本測定には影響はないと考えられた。さらに、H74株は、窒素源が欠乏状態になることで、菌体増殖に必要なアミノ酸変換のためにも、ラセマーゼが上昇すると考えられた。

酵母エキスの濃度によるD-セリン変換について検討した。結果は、Fig. 4Bに示した。酵母エキスの濃度は、0.1%を添加した培地でのD-セリン変換率より、1.0%を培地に添加した培地でのD-セリン変換効率が高くなった。酵母エキスはビタミンを含むことから、ビタミンが補酵素としてラセマーゼ変換に関わると考えられた。

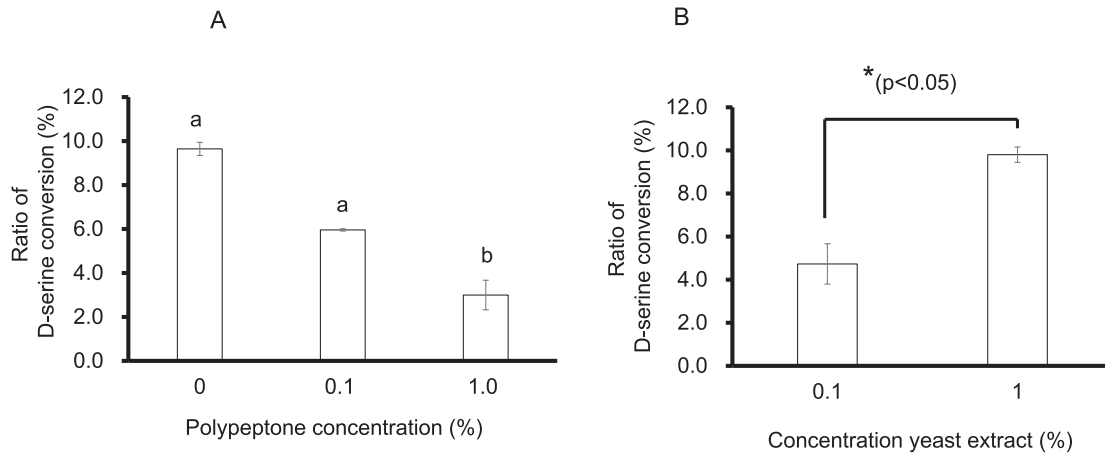


Fig. 4 Optimum polypeptide concentration as a nitrogen source and yeast extract in the medium. The highest condition was calculated as having 100% as the relative ratio of D-serine conversion. Panel A shows the optimum polypeptide concentration to achieve high conversion of D-serine by H74 strain bacteria in the medium condition. After assaying D-serine conversion, they calculated Tukey's test for post-hoc analysis, $p < 0.05$. Panel B shows the optimum yeast extract concentration to achieve high conversion of D-serine by the strain bacteria in medium condition. After assaying D-serine conversion, a T-test was applied to infer significance of the findings: $p < 0.05$. Asterisk (*) indicates p value smaller than 0.05 ($p < 0.05$).

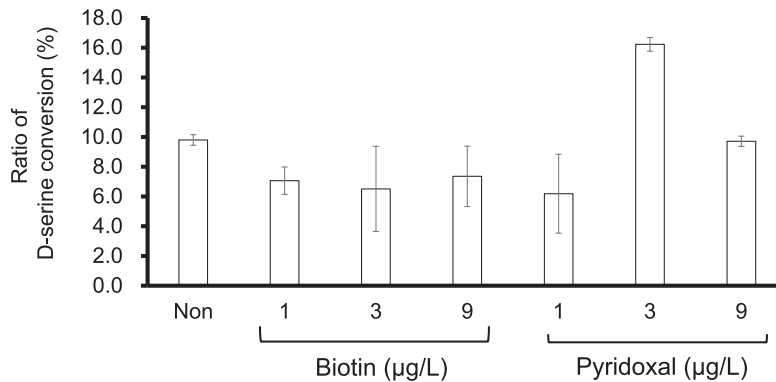


Fig. 5 Optimum concentration of vitamins in the medium. H74 strain bacteria were cultivated the medium containing 1.0% D-arabinose, 0.5% peptone, 1.0% yeast extract, and vitamin as biotin (1-9 $\mu\text{g/L}$) or pyridoxal (1-9 $\mu\text{g/L}$) at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 48 hr to achieve high conversion of D-serine of H74 strain in the medium condition. After assaying D-serine conversion, Tukey's test was applied for post-hoc analysis. Significance was inferred for $p < 0.05$. The highest condition was calculated as having 100% as the relative ratio of D-serine conversion.

そこで、次にD-セリン高変換のための培地中の各種ビタミン（ビオチンとピリドキサル塩酸塩）の添加濃度について検討した（Fig.5）。

いずれのデータ間でも有意差が認められなかった。しかし、H74株はピリドキサル塩酸塩3.0 $\mu\text{g/L}$ を添加するとD-セリン変換率が高くなった。

ピリドキサルはビタミンB6活性を有する化合物の

1種で、生体内反応の補酵素として、重要な役割を担っていることが知られている（Hayashi, 1995）。細菌類のペプチドグリカンに含まれるD-アラニンは、PLP（ピリドキサル）リン酸依存型のアラニンラセマーゼにより変換される（宮本, 2019）。また、セリンラセマーゼにおいてもPLP依存性のものが報告されている。カイコの蛹（Uo *et al.* 1998）や、ラットの脳（Wolosker *et al.*

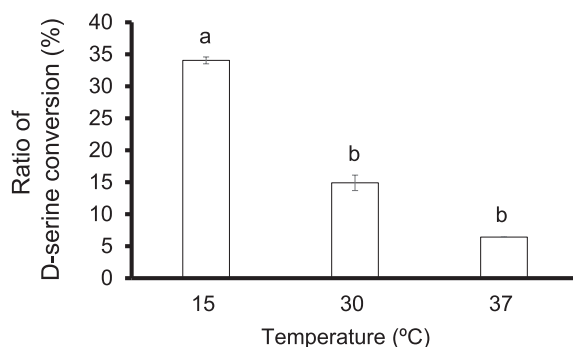


Fig. 6 Optimum temperature for D-serine conversion. H74 strain bacteria were cultivated in medium containing 1.0% D-arabinose, 0.5% peptone, 1.0% yeast extract, and 3.0 μ g/mL of pyridoxal between 15 $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C for 48 hr to elucidate high conversion conditions of D-serine by H74 bacteria under temperature conditions. After assaying D-serine conversion, Tukey's test was used for post-hoc analysis. Significance was inferred for $p < 0.05$. The highest condition was calculated as having 100% as the relative ratio of D-serine conversion.

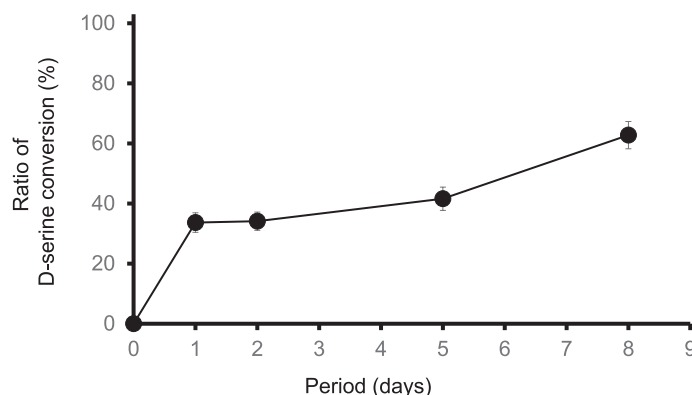


Fig. 7 Optimum cultivation period for D-serine conversion. H74 strain bacteria were cultivated in medium containing 1.0% D-arabinose, 0.5% peptone, 1.0% yeast extract, and 3.0 μ g/mL of pyridoxal at 15 $^{\circ}$ C for 2-8 days to ascertain high D-serine conversion conditions of the H74 strain. The highest condition was calculated as having 100% as the relative ratio of D-serine conversion.

1999) が, PLP 依存性セリンラセマーゼをもつと報告されている。これらの酵素はセリンに対する特異性が高く, D-セリンの生合成や生理的機能と密接に関連すると考えられている (三浦, 1999)。

D-セリン高変換のための培養温度の検討を Fig. 6 に示した。その結果, 最も高い変換率を示した培養条件は 15 $^{\circ}$ C であり, 統計的にも有意に高いことが明らかとなった。

次に, 至適培養期間を検討した (Fig. 7)。その結果, 1~2 日間で, D-セリンの変換率は 33~34%, 5 日間では 41% であった。また, 8 日間培養後の D-セリン変換率は高く, 約 60% であった。さらに, D-セリン変換率を L-FDLA による誘導化後にアミノ酸分析を行ったところ, 同様に約 60% 程度であった。

本来, 酵素変換の D 型と L 型の平衡は 1:1 である。しかし, 本実験では, 菌体による変換のほか菌体の接種量 (初期菌体量) が多く, 細胞壁に蓄積した D-セリンが徐々に培地へ遊離し, 変換量が上昇したと考えられた。今後は, 菌体が生産するペプチダーゼなどについても検討予定である。

以上の結果より, D-セリンデヒドラターゼを用いず, D-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼで測定が可能であり, H74 株の D-セリン変換の培地条件は, 1.0% D-アラビノース, 1.0% L-セリン, 1.0% 酵母エキス, 3.0 μ g/mL ピリドキサル塩酸塩, 1.0% ツイーン 80 溶液, 0.5% ミネラル溶液を含む培地で, 培養温度 15 $^{\circ}$ C, 8 日間であると考えられた。

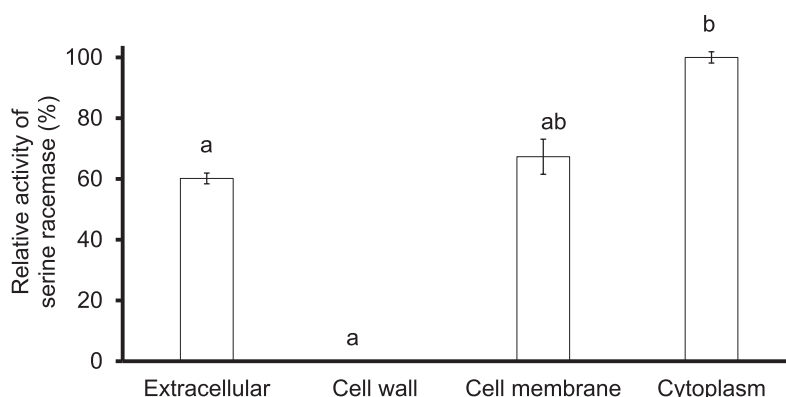


Fig. 8 Location of D-serine racemase in cell organization. H74 strain bacteria were fractionated to evaluate the localization of D-serine racemase in organelles of H74 strain bacteria. The cultivation medium of H74 strain was the extracellular fraction. After digestion by lysozyme of H74 strain, the supernatant of centrifugation was the cell wall fraction. Finally, after bursting the protoplast cells of the H74 strain bacteria, the precipitate obtained by centrifugation was the cell membrane fraction; the supernatant of centrifugation was the cytoplasm fraction. The highest activity of serine racemase was calculated as having 100% as the relative activity.

H74 株のセリンラセマーゼの局在

H74 株のセリンラセマーゼ局在を検討するために、乳酸菌の細胞を菌体外画分、細胞壁消化画分、細胞質画分、細胞膜画分に分画し、それぞれセリンラセマーゼ活性を測定した。その結果を Fig. 8 に示した。一番高いセリンラセマーゼ活性を示したものは細胞質であった。細胞質のセリンラセマーゼ活性、61mU/min を 100% とした相対活性で示した。次いで、細胞膜で相対活性 67% であった。細胞外画分としての菌体溶液は相対活性 60% と菌体内の活性と比べ菌体外の活性は低く、酵素を分泌しないと考えられた。一般的に微生物酵素は、細胞内に保持される菌体内酵素と、細胞外に分泌される菌体外酵素（分泌型酵素）の 2 種類に大別される（Chibata, 1974.）。さらに、菌体内酵素は、細胞溶解等によって放出される酵素と、細胞膜や細胞膜内膜系に結合している酵素に分類される。細菌のセリンラセマーゼは、セリンラセマーゼ遺伝子 (*vanT*) 解析から膜結合型であると報告されている（Billot-Klein *et al.*, 1994）。

本酵素は、細胞膜画分と細胞質画分に活性が見られることから、膜結合型の酵素であると考えられた。また、本酵素は、細胞質で旺盛に発現・生成され、細胞膜へ運ばれる酵素で、本株が死滅などによって菌体外（培地中）に、漏出したのではないかと推察した。

また、本酵素は 60℃ でも活性がある耐熱性酵素であり、一方、菌体は 60℃ でほとんど死滅する（データ未提示）。このような性質から、細胞を死滅後に、菌体を

固定化酵素として利用が可能であると考えられる。現在は、酵素学的特徴や分子生物学的な特徴についても検討している。

要 約

D-セリンを含む発酵食品や飲料などの食品の生産を目指し、D-セリン生産乳酸菌をスクリーニングし、さらに D-セリンの最適生産条件を明らかにした。D-アミノ酸は、食品に好ましい香味を付与する効果（呈味性が高い）だけでなく、様々な機能性を有し、特に D-セリンは統合失調症やアルツハイマー病、脳卒中等、脳内の神経伝達など治療法が確立していない疾患の治療に関与すると考えられる。

まず、D-セリン量の測定は、高価な機器を用いずに測定するため、D-アミノ酸オキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を呈色反応させることで測定した。その結果、L-セリンの影響を受けず、D-セリン濃度を測定することが可能であった。また、いくつかの乳酸菌類は、そのアミノ酸ラセマーゼにより、L-セリンを D-セリンへ変換した。そこで、発酵食品などから分離した乳酸菌株 129 株を被験菌として、培地に L-セリンを添加し、乳酸菌を培養後に生成する D-セリン量を D-セリンデヒドラターゼを用いず、D-アミノ酸オキシダーゼを利用して測定した。その結果、H74 株が最高値を示した。

H74 株は、形態学的、生理学的、分子生物学的特徴か

ら *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* であると同定した。また、H74株のD-セリン変換率条件を検討した結果、炭素源を1.0% D-アラビノース、1.0% L-セリン、1.0% 酵母エキス、3.0 μ g/mLピリドキサル塩酸塩を含む培地で、L-セリンからD-セリン変換率が最大となった。D-セリン高変換のための培養温度を検討した結果、最も高い変換率を示した培養条件は15 $^{\circ}$ Cであり、30 $^{\circ}$ Cでの培養と比較して、約2.4倍高いD-セリン変換率を示すことが明らかになった。

培養8日目では、L-セリンからD-セリンへの変換率は約60%と高い値となった。さらに、H74株のセリンラセマーゼ活性は細胞膜と細胞質画分に局在することから、膜結合型の酵素であると考えられた。

以上の結果H74を用いて、D-セリン製品やD-セリン高含有食品の生産のポテンシャルを持つことが明らかとなった。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 加藤陽菜子・庄子真樹・金内誠：「*Enterococcus faecium* H74株が有するセリンラセマーゼについて」2023年日本農芸化学大会

その他（特許）

- 1) 金内誠 加藤陽菜子；D-セリンの製造方法、特願2023-094516

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

- Ahmed T., Kanwal R. & Ayub N. 2006. Influence of Temperature on Growth Pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* Isolated from Camel Milk. *Biotech.* **5**: 481-488.
- Arias C.A., Martín-Martínez M., Blundell T.L., Arthur M., Courvalin P. & Reynolds P.E. 1999. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol. Microb.* **31**: 1653-1664.
- Avellar M., Scoriels L., Madeira C., Vargas-Lopes C., Marques P., Dantas C. & Panizzutti R. 2016. The effect of D-serine administration on cognition and mood in older adults. *Oncotarget.* **7**: 11881-11888.
- Billot-Klein D., Blanot D., Gutmann L. & Van Heijenoort, J. 1994. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. *Biochem. J.* **304**: 1021-1022.
- Chibata I. 1974. Utilization of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. *J. Syn. Org. Chem. Jap.* **32**: 286-297.
- Flanagan J.L., Simmons P.A., Vehige J., Willcox M.D. & Garrett Q. 2010. Role of carnitine in disease. *Nutrition & Metabolism.* **7**: 30.
- Hayashi H. 1995. Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J. Biochem.* **118**: 463-473.
- Hashimoto K., Fukushima T., Shimizu E., Okada S., Komatsu N., Okamura N., Koike K., Koizumi H., Kumakiri C., Imai K. & Iyo M. 2004. Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **28**: 385-388.
- 檜作進. 1999. アラビノースの栄養・生理的機能と用途. 応用糖質科学. **46**: 159-165.
- 井上裕, 岡部唯, 鈴木理恵, 尾中孝, 木田隆生. 2014. 発酵食品および熟成食品の味質に及ぼすD-アミノ酸の影響についての考察. 微量栄養素研究. **31**: 59-65.
- Kanauchi M. ed. 2019. Lactic acid bacteria: methods and protocols, humana, New Jersey U.S.A.
- Kato S., Ishihara T., Hemmi H., Kobayashi H. & Yoshimura T. 2011. Alterations in D-Amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J. Biosci. Bioeng.* **111**: 104-108.
- Kuranaga T. & Kakeya, H. 2022. Chapter Five - Development and application of highly sensitive labeling reagents for amino acids. *Methods in Enzymol.*, **665**: 105-133
- 駒大輔, 山中勇人, 森芳邦彦, 大本貴士. 2011. 培地の成分知っていますか. 生物工学会誌. **89**: 195-199.
- Kondo A., Asami K., Suda Y., Shimoyamada M., & Kanauchi M. 2016. *J. Food. Sci.* **81**: 1457-1465.
- Lam H., Oh D.C., Cava F., Takacs C.N., Clardy, J., de Pedro, M.A. & Waldor M.K. 2009. D-Amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science.* **325**: 1552-1555.
- Marfey P. 1984. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 591-596.
- 丸山林土, 大出浩子, 金野柳一. 2011. セリンラセマーゼと疾患. 国際医療福祉大学紀要. **16**: 24-33.
- 松本菜月, 金内誠. 2021. 迅速なD-アミノ酸測定法の開発とその測定法を活用した生醗製造のための高D-アミノ酸生産乳酸菌 *Lactobacillus sakei* ZH-2株の分離. 日本醸造協会誌. **116**: 573-583.
- 三浦洸. 1999. 動物組織中のD-セリンの由来: セリンラセマーゼ. ビタミン. **73**: 405-406.
- 宮本哲也. 2019. 細菌のD-アミノ酸生合成機構とその機能. 生化学. **91**, 3: 309-315.
- 胸組虎胤. 1998. タンパク質構成アミノ酸はなぜL体なのか(どうしてそうなるの1). 化学と教育, **46**: 170-174.
- 牟田口裕太, 大森勇門, 大島敏久. 2015. 乳酸発酵とD-アミノ酸生産. 化学と生物. **53**: 18-26.
- NCBI ; National Center for Biotechnology Information. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. 最終訪問日2023年2月3日.
- 大森勇門, 大島敏久. 2012. 食品機能成分としてのD-アミノ酸の可能性. 生物工学会誌. **90**: 135.
- Rhintamäki R & Partonen T. 2011. Dietary amino acid. Preedy V.R., Watson R.R. & Martin C.R. (eds.) in: Handbook of behavior, food and nutrition. Springer, New York, U.S.A.

- Scheifer K.H. & Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. J. Syst. Bacteriol. 34: 31-34.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D. & Fischer W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6: 183-195.
- Schutte J.B., De Jong J., Van Weerden E.J. & Tamminga S. 1992. Nutritional implications of L-arabinose in pigs. British J. Nutrition. 68: 195-207.
- 鈴木 健一朗, 平石明, 横田 明. 2001. 微生物の分類・同定実験法 分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に. シュプリンガー・フェアラーク, 東京
- 鈴木将貴. 2015. https://kompas.hosp.keio.ac.jp/sp/contents/medical_info/science/201508.html. 最終訪問日2023年4月3日
- 内村泰, 岡田早苗. 1992. 乳酸菌実験マニュアル 分離から同定まで. 朝倉書店 東京.
- Uo T., Yoshimura T., Shimizu S. & Esaki N. 1998. Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine racemase in silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. Biophys Res Commun. 246: 31-34.
- Wolosker H., Sheth K.N., Takahashi M., Mothet J.P., Brady R.O., Ferris C.D. & Snyder S.H. 1999. Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 721-725.

2017年度寄付講座助成の研究報告

助成期間：2017年10月～2023年3月

生物間相互作用解析を基軸にした糸状菌の潜在機能の開拓と利用

萩原 大 祐

筑波大学生命環境系糸状菌相互応答講座

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

Exploitation and utilization of potential functions of filamentous fungi based on biological interaction analysis

Daisuke Hagiwara

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577

Filamentous fungi, which inhabit diverse environments on earth, are ecologically important as they contribute to material cycles based on biomass decomposition, and they also have a strong influence on human society through their effects on animal, plant, and human diseases and their application in the fermentation industry. In the environment, they interact with microorganisms with different growth mechanisms, such as viruses, bacteria, and fungi, and a detailed and comprehensive understanding of these interactions is important for understanding the true ecology of filamentous fungi. Therefore, our laboratory has focused on 1) viruses in filamentous fungi cells, 2) co-cultures between filamentous fungi, and 3) interactions with microbial community, and has been analyzing these interactions. In particular, we have explored filamentous fungal viruses (mycoviruses) on a large scale, which have not been given much importance, and have contributed to our understanding of the diversity of mycoviruses and the mechanisms by which they express their functions in the host. Co-culture experiments with other fungi and filamentous fungi have also revealed the molecular basis of the mutual response that induces the production of secondary metabolites. We believe that this detailed and bird's-eye understanding of the interactions between organisms based on filamentous fungi will establish a new field of filamentous fungi research in the future.

Key words: *Aspergillus*, Mycovirus, Secondary metabolism, Co-culture

第一章 はじめに

糸状菌は菌糸生育により増殖し環境中に広く分布している菌群である。その種数は220万種以上と推測されており、既知種は12万種ほどである (Hawksworth and Lücking, 2017)。これらの分離菌株に限っても、形態や機能、生態は実に多様であり、多くの糸状菌は主に植物バイオマス分解する腐朽菌として生息し、地球上の炭素循環のキープレーヤーとして分解酵素分泌系の進化を遂げている。植物に感染する病原性戦略を持つ種や、陸上植物と栄養交換による相利共生関係を築く種も存在する。植物のみならず、動物や両生類、昆虫に感染性を示す種もあり、生態系における多様な生物間相互作用を創

出している。裏を返せば、生物量としても大きな割合を占める糸状菌が関わる生物間相互作用により、地球上の多くの環境生態系が構成され、恒常性が維持されているとも言える。

一方、単独の生物としての糸状菌は、ペニシリンにはじまる化合物や多様な産業用酵素の生産宿主としての有用性を見出されて研究が大きく進展してきた。細胞生物学や分子生物学的な解析により、有用物質の生産機構や、形態形成、代謝、環境応答機構などの理解が深まり、近年では遺伝子レベルで多くの因子が明らかにされている。このように、ゲノム配列の決定を契機に、単独の生物としての糸状菌はより深く広く研究されている。同じ頃、糸状菌の機能の発現に、糸状菌と他者との相互作用が大きく寄与することが報告されるようになった。たとえば、実験室環境で単独の生育では発現せずに休眠している二次代謝は他の微生物との共培養により覚醒し、新たな代

E-mail: hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp

教員：浦山 俊一 (筑波大学生命環境系)。

謝物が産生する例が多く報告されている (Xu *et al.*, 2023). また、糸状菌内に感染するマイコウイルスが、生育や病原性などの宿主機能に大きく影響を及ぼすことも報告されている (Kotta-Loizou & Coutts, 2017; Hough *et al.*, 2023). このように、糸状菌と他者との相互作用が異なる様式で確認されているが、現状ではこれらの現象を支える分子機構に関してほとんど知見が得られていない。さらに、無数の微生物が共存する複合環境において、糸状菌がどのような生存戦略をとっているのか、すなわち、糸状菌が微生物群集とどのような相互作用を持ち、どう応答するかについても、ほとんど解析例がないため理解が及んでいない。今後、糸状菌の潜在的な能力を引き出し活用する上でも、糸状菌の複合環境における生存戦略を解明する上でも、集団から細胞、分子のレベルまで踏み込んだ糸状菌の相互作用・相互応答研究は不可欠である。

そこで本寄附講座では、1) 糸状菌細胞に潜むマイコウイルス、2) 糸状菌同士の共培養、3) 微生物集団に対する相互作用等に着目し (Fig.1), 糸状菌を基軸とした生物間相互作用の詳細かつ俯瞰的な理解を得ることで、糸状菌の真の生態理解に迫ることを目的とした。

第二章 研究成果の概要

1. 糸状菌に感染するマイコウイルスの多様性解析

真菌に感染するマイコウイルスは、宿主の“病気”から発見された経緯がある。しかし今では、感染しても無症状の潜在的な感染因子も多く存在すると認識されている。宿主の症状から感染を判別できないため、地球上の糸状菌類にどの程度感染が広がっているのか把握するこ

とは困難である。しかし我々は、従来のウイルス探索法の欠点を克服した、ウイルス配列を高感度で高精度に検出する技術を有しており、その技術を活用した網羅的なマイコウイルス探索を実施した。糸状菌に潜むマイコウイルスの実態とその多様性の理解を目指し、多数の糸状菌種を対象に探索した (Chiba *et al.*, 2021a; Chiba *et al.*, 2021b)。

ヒト病原菌の *Aspergillus fumigatus* を含むアスペルギルス属菌 175 株を対象に、マイコウイルスを構成する核酸種である dsRNA を精製し、電気泳動、および次世代シーケンサーを駆使した Fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing (FLDS) 法により、ウイルスの検出およびウイルス配列情報を獲得した。対象株のうち 23 株がウイルスを保有しており、その中から 17 種のウイルスで完全長ゲノムを決定した。その結果、14 種がこれまでに報告のない新規 RNA ウィルスと考えられた。マイコウイルスには、複数のセグメントから RNA ゲノムが構成されるものが含まれており、本研究で用いた FLDS 法は、それらのセグメントを同一ウイルスに帰属することが判定可能な技術であり、既存の検出手法に比べて優位性を示す。したがって、今回得られたウイルスゲノムは読み逃しのない真の完全長ウイルスゲノムであると言える。

本解析では、検出されたウイルス配列の中に見て不可解な配列を持つものが存在した。 *Aspergillus fumigatus* narnavirus2 (AfuNV2) の RNA 依存 RNA 合成酵素 (RNA-dependent RNA polymerase: RdRp) と予想される ORF には、本来の酵素機能発現に必要な 5 つのモチーフのうち 3 つ (F, A, B) しか含まれておらず、不完全な RdRp タンパク質であると推測された。同ウイル

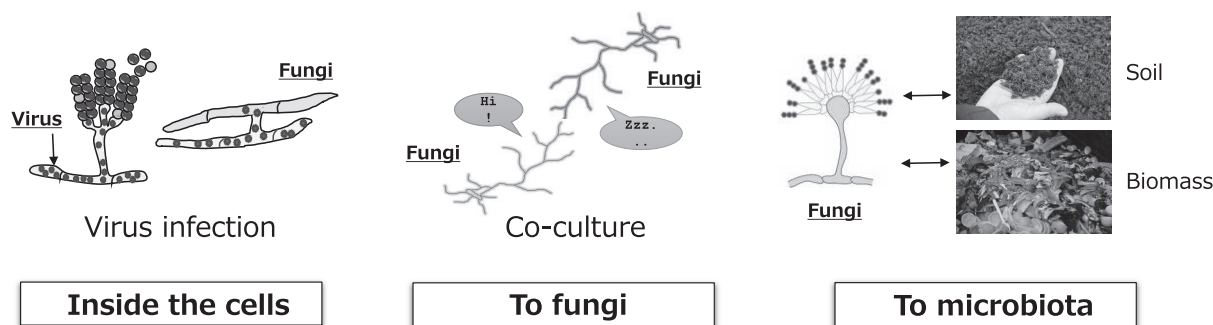


Fig. 1 The aim of this study is to gain a detailed and bird's eye view of the interactions between organisms based on filamentous fungi.

Mycoviruses are present inside fungal cells. The objective is to determine what viruses are present and what effects they have on the host filamentous fungi. The study of fungal interactions will reveal the molecular mechanisms of secondary metabolism induced by co-culture. Interaction and mutual responses of filamentous fungi to indigenous microbial communities (microbiota) in the soil and environmental biomass are the target of the study.

スには他のセグメントが存在し、そこに含まれる ORF を調べると、先の RdRp で欠落していた 2 つのモチーフ (C, D) を含むタンパク質をコードする配列を持っていた。すなわち、本来は一つのタンパク質として存在する RdRp が、必要なモチーフを 2 つの異なるタンパク質 (RNA1, RNA2) に分割して保持していることが示唆された。ホモロジーモデリングによる検証では、これらの 2 つのタンパク質が水素結合やファンデルワールス力により相互作用し、RdRp の活性部位を形成することが示唆されており、複合体を形成して RdRp 活性を示すことが予想された。本解析では、別のアスペルギルス属菌からも RdRp が分割したナルナウイルス配列が見つかり、興味深いことにこちらでは違う箇所での分割型を示していた (前者を Type I, 後者を Type II と命名した)。2 種類の異なる分割タイプのナルナウイルスを発見したことから、既存のナルナウイルス配列と比較系統解析を行なったところ、Type I と Type II のウイルス配列は異なるクレードに良く別れたことから、独立に発生したものと考えられた。

以上から、従来の手法と比べて優位性のある検出技術を適用したことにより、これまで見逃されてきたウイルスを多数同定することができた。中には、分割型の RdRp を有するウイルスが含まれており、RNA ウイルスの分子マーカーとも言える RdRp が分割されうることが初めて示した例となった。このような極めてユニークなウイルスや多様なウイルスが糸状菌から見つかることは、マイコウイルスの実態解明に向けた探索の余地が多く残されていることを示しているとも考えられる。

2. マイコウイルスが宿主糸状菌にもたらす作用の網羅解析

ウイルス探索の技術革新により、マイコウイルスの配列情報は急速に蓄積され始めており、ウイルス機能の検証は単発的に報告されるものの (García-Pedrajas *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Nuss, 2005; Milgroom & Cortesi, 2004; Heiniger & Rigling, 1994)、現状として全く追いついていない。また機能を検証する上で、糸状菌宿主に対する影響を外観だけで捉えてしまうと、表現型を見せないことも多くあるため、潜在的な感染と判定されてしまう。実際には、目に見える表現型を示さない場合でも、ウイルス感染により遺伝子発現や二次代謝生産が影響を受ける例も報告されており (Zhang *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2014)、マイコウイルスと宿主糸状菌における相互作用について注意深く観察する必要がある。またウイルス機能をより正確に理解するには、ある一つのウイルス種に対しても多面的に評価し一般性を担保するデータが必要となる。すなわち、異なる宿主株に対して同等の機能

を与えることができるか、あるいは、ある宿主株に同種異株のウイルスが感染すると同等の影響を与えるのか、といった体系的な実験を組む必要がある。我々は、このような体系的な理解を得ることを目的として、ウイルスの脱離および導入法を確立し、複数の同種糸状菌株—ウイルスセットに対して網羅的な機能解析を実施した。

まず初めに、効果的なウイルス脱離法を確立するために、抗ウイルス活性のある核酸アナログ試薬の効果を比較検証した (Ikeda *et al.*, 2022)。4 種の試薬、リバビリン、7d2CMA (7-Deaza-2'-C-Methyladenosine)、2CMA (2'-C-Methyladenosine)、2CMC (2'-C-Methylcytidine) を用いて、*A. fumigatus* の複数のウイルス保有株を対象に試験した結果、7d2CMA と 2CMA が dsRNA ウイルスを対象に幅広く高い脱離率を示した。このように、マイコウイルスの脱離頻度は、ウイルス種と核酸アナログ種の組合せに依存することが示され、マイコウイルス研究に重要な指針を示すことができた。

実際に取得したウイルス脱離株と親株となるウイルス保有株とを対象に、様々な条件下で各種の生育性状を比較した。その結果、調べた多くのウイルス感染株は、脱離株と比べた時にコロニー生育に影響を及ぼすことが示された。ただし、温度や使用した培地の種類に強く依存することも示されており、培養条件により機能がダイナミックに変化しうることが明らかになった。

アフラトキシン生産菌として知られる *Aspergillus flavus* のウイルス感染株を対象として、孢子形成能へのウイルスの影響を調べた。この中で、2 種のウイルスに重複感染している株 (IFM 63847) では、単独ウイルスの感染では影響が出ないのに対して、二重感染することで孢子形成が約 1/10 に低下する表現型を示した。この結果から、糸状菌に複数のウイルスが感染することで機能が発現するという相互作用の可能性が示唆された。そのほか、複数のウイルス感染株/脱離株のセットを対象として、抗真菌薬感受性や二次代謝化合物生産への影響を比較し、いずれも表現型として優位な影響を与えるウイルスを明らかにすることができた (Kuroki *et al.*, 2023)。

A. flavus の感染株/脱離株のすべてのセットを対象にトランスクリプトーム比較解析を実施し、ウイルスに対する宿主の細胞応答を解析した。発現パターン解析から、ウイルス感染の有無で生じるバリエーションは、遺伝的背景の異なる株間の発現パターンを超えるほどの影響を示すものではないことが示された。このことは、目に見える表現型が無くても、遺伝子発現レベルでは、ウイルス感染による宿主の応答反応が生じていることを示していると言える。感染の有無で一定程度以上の発現変動を示した遺伝子を抽出すると、前述の IFM 63847 株において、ウイルスの二重感染により単独感染よりも発現変

動遺伝子数が増加していた。ここでも、複数のウイルスの共存により宿主の応答反応が増大したと考えられる。また、同属のウイルスが感染するセット間で比較すると、発現変動遺伝子のほとんどが共通しないことから、宿主菌株やウイルス株に特有の宿主応答が生じることが示唆された (Kuroki *et al.*, 2023)。以上の結果から、1) 表現型を示さない潜在的なマイコウイルスであっても、遺伝子発現レベルでは大きな影響を与えること、2) マイコウイルス感染細胞では菌株に特異的で多様な応答が起きており、3) 糸状菌宿主の表現型が表出するためには、条件が限定されることが明らかになった。マイコウイルスを利用することで、宿主糸状菌の遺伝子発現パターンや表現型を制御する可能性に関して、その基盤となる知見を得ることができた。

3. マイコウイルスによる糸状菌二次代謝の誘導

マイコウイルスによる糸状菌二次代謝への影響はいくつかの報告がある。特にカビ毒生産に関しては、*Fusarium graminearum* によるトリコテセン産生はマイコウイルス感染により負の影響をもたらす (Chu *et al.*, 2002)。また、*Alternaria alternata* のクライソウイルス AaCV1 は宿主菌の生育不良を引き起こすものの、宿主菌は AK トキシンの産生量が増大し、植物に対する高い病原性を示した (Okada *et al.*, 2018)。*Aspergillus ochraceus* では、パルティティウイルスの感染によりオクラトキシンの産生が促進されることが示されたが、本現象の遺伝子レベルでの確認は取れていない (Nerva *et al.*, 2019)。このように、ウイルスによる糸状菌二次代謝への影響は、現象としての報告がなされているものの、その制御メカニズムについてはほとんど理解されていない状況である。このような背景から、我々はイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を対象として、ウイルス感染による二次代謝制御のメカニズムに関する知見の取得を目指した。

解析の対象は、3種のマイコウイルス (トティウイルス、クライソウイルス、パルティティウイルス) が重複感染する株と、このうちパルティティウイルスのみが単独感染する同じ遺伝系統の株を用いて、様々な培養条件下で代謝物解析を実施した。その結果、ある条件において3種の重複感染株が、カビ毒として知られるテヌアゾンを産生誘導していることが明らかになった。テヌアゾンは過去に、*Alternaria* 属菌や *Magnaporthe* 属菌からの産生が報告されており (Rosett *et al.*, 1957)、特定の条件下で産生しうることが示されている。また、テヌアゾンの生合成遺伝子 *TAS1* とその転写制御因子 *TAS2* についてもイネいもち病菌で同定されており (Yun *et al.*, 2015; Yun *et al.*, 2017)、この情報を参考にウイルスによる影響の分子メカニズムを検証する。まず、ウイ

ルスの再感染株を作製し原因となるウイルスの特定を行った結果、直接の原因となるのはトティウイルスの感染であることが判明した。さらに、トティウイルスの感染の有無によって、テヌアゾン酸生合成因子の遺伝子 *TAS1*、*TAS2* の発現を解析すると、テヌアゾン酸の産生の増減と相関して、三重感染株で高い発現レベルを示した。つまり、転写制御因子である *TAS2* を正に制御することで、テヌアゾン酸生合成遺伝子発現が上昇し、結果、テヌアゾン酸産生が誘導されたと示された。

以上の結果は、マイコウイルスが遺伝子レベルで影響を与え糸状菌の二次代謝を制御することを初めて示したことになる (Ninomiya *et al.*, 2020)。これまでもウイルス感染による二次代謝への影響は単発的に報告があったものの、本成果により、マイコウイルスが糸状菌細胞の内部でその応答機構にまでアクセスして二次代謝を作動している実態が明らかになった。糸状菌には多様な二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが存在している。しかしその多くが、研究室の培養条件において発現が確認できていない。このような休眠状態にある二次代謝を覚醒することにより、新規物質を得ることができると期待されている。ウイルス感染による二次代謝の活性化における作動原理の理解が進み、糸状菌細胞へのウイルス導入技術が発達することで、糸状菌二次代謝を活性化するための革新的技術につながると期待される。

4. 糸状菌間相互作用による抗生物質ジフェニルエーテル類の産生誘導

休眠状態にある二次代謝は新たな有用物質の探索源として有望である。これらの活用を目指して、糸状菌を対象とした手法開発が進められており、培養条件の検討 (OSMAC 法)、DNA メチル基転移酵素やヒストンアセチル化阻害剤などを使用したエピジェネティック処理、標的生合成遺伝子の異種発現、などが検討されてきた (Bode *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 1999; Heneghan *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2010)。これらの他に簡易的な手法として微生物共培養があり、注目を集め数々実践されている。しかしこれまでの共培養研究では、化合物の取得に成功しても、培養したどちらの菌の産物かも不明のままであることも多く、ましてや関与する遺伝子の同定までは大抵の研究では実施されていない。したがって、共培養により二次代謝が活性化その分子的理解は追いついていないのが現状である。例外的に、Brakhage らのグループが先駆的な研究により、*A. nidulans* が放線菌 *Streptomyces rapamycinicus* との共培養でオルセリン酸生合成遺伝子クラスターを発現し、複数の化合物を産生誘導することが明らかにされている (Schroeckh *et al.*, 2009)。その後の解析により、共培養

による化合物産生誘導にヒストンアセチル化が関与すること (Nützmann *et al.*, 2011), BasR という転写因子が関与すること (Fischer *et al.*, 2018), 当該放線菌が *A. fumigatus* の二次代謝も誘導することが明らかにされている (König *et al.*, 2013; Stroe *et al.*, 2020). このモデルケースでは、放線菌と糸状菌による相互作用を観察しており、糸状菌同士の共培養ではない。そこで本研究では、糸状菌同士のモデル共培養系を確立し、共培養に伴う二次代謝の制御を解析した。

複数のモデル糸状菌 (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, and *A. oryzae*) を使用して共培養により代謝物の産生誘導の検討をした結果、*A. fumigatus* と *A. nidulans* の組み合わせで共培養した場合に、単独培養ではほとんど検出されない3つの主要な化合物の産生を認めた (Ninomiya *et al.*, 2022). これらの産物は、質量分析およびNMR解析により、ピオラセオール I, II, およびジオルシノールと同定された。これらの化合物は共通してジフェニルエーテル骨格を有しており、いずれも抗微生物活性が報告されている (Yamazaki & Maebayashi, 1982; Itabashi *et al.*, 1993). 培養菌体を対象にトランスクリプトーム解析を実施し、単独培養に比べて共培養時に発現上昇する二次代謝遺伝子クラスターを探索した。その結果、*A. fumigatus* ではシデロフォア生合成に関する遺伝子が誘導されており、共培養時は細胞外環境の鉄の争奪が起こっている可能性が示唆された。また、*A. nidulans* ではシコリン生合成遺伝子クラスター (*cic* クラスター), およびオルセリン酸生合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター) の発現誘導が見られた (Sanchez *et al.*, 2012; Schroeckh *et al.*, 2009). *ors* クラスターは、上述のように、放線菌との共培養時にも活性化し、オルセリン酸、その二量体のレカノール酸などの生合成に寄与している。そこで、*ors* クラスターの骨格形成遺伝子である *orsA* の破壊株作製、および各因子を麹菌 *A. oryzae* に異種発現することで、*ors* クラスターがジフェニルエーテル産生に関与するか検証した。作出した菌株の代謝物の解析から、*orsA* がジフェニルエーテル生合成に必須であること、*orsA* の単独の発現でオルセリン酸、レカノール酸、ジフェニルエーテルである diorcinolic acid が産生されることが示された。その他の因子である *orsB* および *orsF* を *orsA* に併せて *A. oryzae* に異種発現させると、ジオルシノールを産生した。続いて、チロシナーゼドメインを有する OrsC の関与を予想し、*orsA, B, F* に併せて *orsC* を異種発現させると、ジオルシノールにヒドロキシ基が導入されたピオラセオールが産生された。以上の結果から、幅広い生物活性を示すジフェニルエーテルであるピオラセオール I と II の生合成遺伝子を明らかにした (Ninomiya *et al.*, 2022)。

本研究では、モデル糸状菌 *A. fumigatus* と *A. nidulans* からなる糸状菌間の共培養系を確立し、当該共培養がオルセリン酸生合成遺伝子クラスターの転写を活性化し、抗菌性ジフェニルエーテルの産生を誘導することを明らかにした。多様な構造を生み出す糸状菌のジフェニルエーテル生合成の理解を深めるとともに、*A. nidulans* が放線菌 *S. rapamycinicus* と *A. fumigatus* に応答して、異なる種類のポリケチドを産生する機構の一端を明らかにした。このような知見は、糸状菌を取り巻く微生物との複雑なコミュニケーションに対する二次代謝の応答の理解に大きく貢献する。

第三章 おわりに

本寄附講座は、糸状菌が環境で遭遇する様々な次元の相互作用を想定し、その作用の及ぶ範囲や詳細な分子基盤を明らかにした。糸状菌に潜在的に感染するマイコウイルスの探索と網羅機能解析からは、これまでのウイルス学の常識を覆す新奇な遺伝子構造を持つウイルスの発見や、表現型として表出しない深部の細胞応答を捉えることに成功し、糸状菌とウイルスの相互作用の理解を拡張することができた。さらに我々は、子嚢菌、担子菌、接合菌と広範な菌種を対象に合計1000を超える株を対象にマイコウイルスを探索し、自然界のほとんどの菌種にウイルス感染が及ぶことを明らかにしている。ここで新たに得られた多数のウイルス感染株と精細なウイルス配列ライブラリーは世界でも類を見ないユニークなリソースであり、今後、マイコウイルスの biosphere の多様性と糸状菌-ウイルス間相互作用の分子機構の解明に貢献すると期待される。

マイコウイルスや共培養により糸状菌の二次代謝が活性化する例を見出し、それらが遺伝子レベルで制御されている実態をトランスクリプトーム解析により明らかにした。特に共培養では、培養される両菌株において二次代謝が活性化することを明らかにし、共培養法が二次代謝研究において重要な解析手法であることが改めて証明された。取り上げた事例の他にも、*Aspergillus* 属菌同士の共培養による特異的な色素化合物の産生を確認しており、当該化合物の生合成遺伝子の同定に成功している。当該遺伝子クラスターは他の菌種にも存在し、それらの菌では、共培養に応答する場合としない場合、構成的に産生するものがあり、化合物クラスターの応答性は菌株に依存することが明らかになった。さらなる共培養の事例の積み重ねと、詳細な分子機構解析により、二次代謝活性化の作動原理の解明につなげる必要がある。

微生物集団に対する糸状菌の相互作用・相互応答については、本寄附講座における挑戦であり一つの目標で

あった。そのためにマイクロブーム培養による実験系を確立し解析を進めており、実際に、集団内での糸状菌の挙動を、生育量や発現応答、機能発現などの視点で分析することが可能になった。プレート上や液体培地とは大きく異なる振る舞いも見出され、本手法が糸状菌の新たな生態の発見に大きく寄与するものと確信する。本手法を駆使した相互作用研究をさらに発展させ、今後の糸状菌研究の新たな領域を確立し、真の生態に迫る研究を展開したい。

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成29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、寄付講座研究員（二宮章洋、老木紗予子、趙彦杰、黒木美沙、Wasiatus Sa'diyah）、寄付講座技術補佐員（水越浩子、大畑由紀子、中澤善美、畑川秀美）、筑波大学糸状菌相互応答講座の学生・構成員諸氏の協力のもとに、研究を真剣に楽しく抜かりなく実施してまいりました。誰一人取り残すことなく、関わったメンバーがみな前向きに次に進むことができたことに、感謝の意を表します。また、筑波大学生命環境系、高谷直樹教授、竹下典男准教授、野村暢彦教授には多大なるご支援と、的確なタイミングで効果的なアドバイスを投げかけていただいたことに感謝いたします。

文 献

- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3**: 619–627.
- Chiba, Y., Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S., & Hagiwara, D. 2021a. Discovery of divided RdRp sequences and a hitherto unknown genomic complexity in fungal viruses. *Virus Evol.* **7**: veaa101.
- Chiba, Y., Oiki, S., Zhao, Y., Nagano, Y., Urayama, S., & Hagiwara, D. 2021b. Splitting of RNA-dependent RNA polymerase is common in Narnaviridae: Identification of a type II divided RdRp from deep-sea fungal isolates. *Virus Evol.* **7**: veab095.
- Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, S.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W. & Kim, K.-H. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2529–2534.
- Fischer, J., Müller, S. Y., Netzker, T. *et al.* 2018. Chromatin mapping identifies BasR, a key regulator of bacteria-triggered production of fungal secondary metabolites. *eLife* **7**: e40969.
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. 2019. Mycoviruses in biological control: From basic research to field implementation. *Phytopathol.* **109**: 1828–1839.
- Hawksworth, D.L., & Lücking, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectr.* **5**: doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- Heiniger, U., & Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Ann. Rev. phytopathol.* **32**: 581–599.
- Heneghan, M. N., Yakasai, A. A., Halo, L. M., Song, Z., Bailey, A. M., Simpson, T. J., Cox, R. J. & Lazarus, C. M. 2010. First heterologous reconstruction of a complete functional fungal biosynthetic multigene cluster. *ChemBioChem* **11**: 1508–1512.
- Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. 2023. Fungal viruses unveiled: A comprehensive review of mycoviruses. *Viruses.* **15**: 1202.
- Ikeda, A., Chiba, Y., Kuroki, M., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2022. Efficient elimination of RNA mycoviruses in aspergillus species using RdRp-inhibitors ribavirin and 2'-C-methylribonucleoside derivatives. *Front. Microbiol.* **13**: 1–9.
- Itabashi, T., Nozawa, K., Nakajima, S. & Kawai, K. 1993. A new azaphilone, falconensin H, from *Emericella falconensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 2040–2041.
- Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y. & Kushiro, T. 2010. Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nat. Chem.* **2**: 858–864.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C. & Hutchinson, C. R. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**: 1368–1372.
- Kotta-Loizou, I., & Coutts, R.H.A. 2017. Mycoviruses in *Aspergilli*: A comprehensive review. *Front. Microbiol.* **8**: 1699.
- König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. 2013. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* **14**: 938–942.
- Kuroki, M., Yaguchi, T., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2023. Experimental verification of strain-dependent relationship between mycovirus and its fungal host. *iScience.* **8**: 107337.
- Lee, K. M., Cho, W. K., Yu, J. *et al.* 2014. A comparison of transcription patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *PloS one* **9**: e100989.
- Milgroom, M. G., & Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 311–338.
- Nerva, L., Chitarra, W., Siciliano, I., Gaiotti, F., Ciuffo, M., Forgia, M., Varese, G. C. & Turina, M. 2019. Mycoviruses mediate mycotoxin regulation in *Aspergillus ochraceus*. *Environ. Microbiol.* **21**: 1957–1968.
- Ninomiya, A., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2022. Antibacterial diphenyl ether production induced by co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**: 4169–4185.
- Ninomiya, A., Urayama, S., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S., Moriyama, H. & Hagiwara, D. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* **11**: 1641.
- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 632–642.
- Nützmann, H.-W., Reyez-Dominguez, Y., Scherlach, K. *et al.* 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone

- acetylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**: 14282–14287.
- Okada, R., Ichinose, S., Takeshita, K. *et al.* 2018. Molecular characterization of a novel mycovirus in *Alternaria alternata* manifesting two-sided effects: down-regulation of host growth and up-regulation of host plant pathogenicity. Virology **519**: 23–32.
- Rosett, T., Sankhala, R. H., Stickings, C. E., Taylor, M. E. U., & Thomas, R. 1957. Biochemistry of microorganisms. CIII. Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct.: culture filtrate products. Biochem. J. **67**: 390–400.
- Sanchez, J. F., Entwistle, R., Corcoran, D., Oakley, B. R. & Wang, C. C. C. 2012. Identification and molecular genetic analysis of the cichorine gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Med. Chem. Comm. **3**: 997–1002.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. 2009. Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**: 14558–14563.
- Stroe, M. C., Netzker, T., Scherlach, K., Krüger, T., Hertweck, C., Valiante, V. & Brakhage, A. A. 2020. Targeted induction of a silent fungal gene cluster encoding the bacteria-specific germination inhibitor fumigermin. eLife **9**: e52541.
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E. & Cichewicz, R. H. 2008. Epigenetic remodeling of fungal secondary metabolome. Organ. Biomol. Chem. **6**: 1895–1897.
- Xu, S., Li, M., Hu, Z., Shao, Y., Ying, J., & Zhang, H. 2023. The potential use of fungal co-culture strategy for discovery of new secondary metabolites. Microorganisms. **11**: 464.
- Yamazaki, M. & Maebayashi, Y. 1982. Structure determination of violaceol-I and -II, new fungal metabolites from a strain of *Emericella violacea*. Chem. Pharm. Bull. **30**: 514–518.
- Yun, C.-S., Motoyama, T., & Osada, H. 2015. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. Nat. Commun. **6**: 8758.
- Yun, C.-S., Motoyama, T., & Osada, H. 2017. Regulatory mechanism of mycotoxin tenuazonic acid production in *Pyricularia oryzae*. ACS Chem. Biol. **12**: 2270–2274.
- Zhang, Y., Liang, X., Zhao, M. *et al.* 2022. A novel ambigrammatic mycovirus, PsV5, works hand in glove with wheat stripe rust fungus to facilitate infection. Plant Commun. **4**: 100505.

糸状菌に感染するマイコウイルスの多様性解析

浦山 俊一, 萩原 大祐

筑波大学生命環境系糸状菌相互応答講座

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

RNA virus diversity in filamentous fungi

Syun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577

In recent years, virus surveillance in filamentous fungi have revealed the existence of numerous novel viruses, which revolutionized our understanding of viral diversity on earth. In this study, we applied a novel virus discovery method to filamentous fungi, which has enhanced sensitivity and various advantages compared to conventional approaches. This enabled us to identify a large number of viruses that had been overlooked until now. In the present study, we discovered a divided RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), which is an essential RNA viral replication enzyme and empirically considered to be encoded by a single gene. Due to such diversity of viral structure and untapped fungal resources, filamentous fungi currently are a promising model host organism for the research of RNA viruses.

Key words: *Aspergillus*, Mycovirus, RNA virus, RdRp

緒 言

真菌に感染するウイルス（マイコウイルス）の存在は1960年頃に初めて明らかになり、ウイルスの発見からは約70年後のことである（Hollings., 1962）。マイコウイルス発見のきっかけは、マッシュルーム栽培における子実体の形成不良であり、その病原体を探索する過程で真菌にもRNAウイルスが感染していることがわかった。その後、パン酵母や種々の植物病原菌からもRNAウイルスが見出され、今では真菌一般にRNAウイルスが存在することが知られている（Ghabrial *et al.*, 2015）。現在、真菌は動物と植物に次いでそこに感染しているRNAウ

イルスの多様性の理解が進んでいる生物群となっている（Charon *et al.*, 2022）。

現在知られているマイコウイルスの大部分はRNAをゲノムとするRNAウイルスに属する。RNAマイコウイルスは一般に細胞外感染経路を持たないため、宿主真菌を殺すことなく、その細胞内に持続的に存在する。概して、ゲノムサイズは数-20kb程度で、1-複数本のRNAに少数の遺伝子をコードしている。また、自身のRNAゲノムを複製するのに必要不可欠なRNA依存RNA合成酵素（RNA-dependent RNA polymerase, 以下 RdRp）を有している。

真菌におけるRNAウイルス探索は当初、長鎖2本鎖RNA（以下 dsRNA）を生物試料から精製し、電気泳動で検出することで行われた（Kotta-Loizou & Coutts, 2017）。dsRNAはRNAウイルスのゲノムや複製中間体などに由来する核酸種であり、RNAウイルスのいない細胞試料からは検出されない。dsRNA電気泳動はこの原理を応用したRNAウイルス検出法で、1970年代に確立して以降、現在に至るまで使用されている。一方、シーケンシング能力の向上に伴い、近年ではRNA-seqを利用したRNAマイコウイルスの探索も広く行われるようになった（Kondo *et al.*, 2022）。さらに、ウイルスの探

E-mail: hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp

共同研究者：千葉 悠斗（筑波大学特別研究員DC2, 現 明治大学農学部）。

老木紗予子（筑波大学生命環境系, 現 京都大学農学研究科）。

長野由梨子（海洋研究開発機構）。

趙 彦杰（筑波大学生命環境系）。

黒木 美沙（筑波大学生命環境系, 現 東京大学農学生命科学研究科）。

矢口 貴志（千葉大学真菌医学研究センター）。

索ではなく真菌のトランスクリプトーム解析を目的に取得され、公共データベースにデポジットされているRNA-seqデータからも、RNAマイコウイルスの探索が行われている。

dsRNA電気泳動とRNA-seqテクノロジーは、マイコウイルスに限らずRNAウイルス多様性研究に大きな進展をもたらした技術であるが、いずれの技術にも無視できない限界がある。まず、dsRNA電気泳動には、検出感度以下の量のdsRNAしか存在しないものは見逃してしまうという限界がある。感度の高い染色剤を用いたとしてもngオーダーのdsRNAが必要であり、特にRNAウイルスの中でも一本鎖RNAウイルスは二本鎖RNA蓄積量が少なく検出しにくいとされている。後者のRNA-seqでは、十分なシーケンシングデプスが得られる場合はdsRNA電気泳動よりも高い感度が得られる。しかし、得られた配列情報からRNAウイルスに由来するすべての配列情報を正確に取り出すことが可能なのではない。RNA試料にはウイルス由来のRNAだけではなく、宿主由来のRNAなどの非ウイルス由来RNAも含まれてしまうため、一般に、得られた配列が何に由来するかを判定するために「既知配列との類似性」が用いられる。既知RNAウイルス配列と“有意”に当該配列が似ていれば、この配列はRNAウイルスに由来すると判定するというものである。そのため、RNAウイルス配列としてリストアップされていない未知のRNAウイルス配列については、原理的に捉えることができない。こ

れはすなわち、RNA-seqで得られる配列ベースでウイルス情報を拡張することの限界と言える。

著者らはこれらRNAウイルス探索手法の欠点を克服しつつ、極めて効率的に高品質なRNAウイルスゲノムを決定する手法を過去に確立している(Urayama *et al.*, 2018; Hirai *et al.*, 2021) (Fig.1)。当該手法はFragmented and primer-Ligated DsRNA Sequencing法 (FLDS) と命名し、dsRNAの完全長配列を解読可能な技術である。FLDSではまず、dsRNAをハイスループットシーケンサーによりシーケンシングすることで、電気泳動よりも高感度にRNAウイルスゲノムを解読 (RNAウイルスを検出) する。さらに、dsRNA分子の完全長配列を網羅的に決定することで、既知RNAウイルスとの配列類似性に依存することなくRNAウイルスゲノムを同定可能となっている (Fig.1)。本研究ではFLDSを適用し、糸状菌に感染するRNAマイコウイルス (以下単にマイコウイルスと表記) の完全かつ最高品質のリスト構築を目指した。これにより、糸状菌に潜むウイルスの実態とその多様性の理解につながることとなる。

実験方法

菌株と培養方法

本実験で使用した菌株をTable 1に示した。*Aspergillus fumigatus* およびその近縁種 *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. pseudoviridinutans*, *Neoartrya fischeri* は千葉大学真菌医

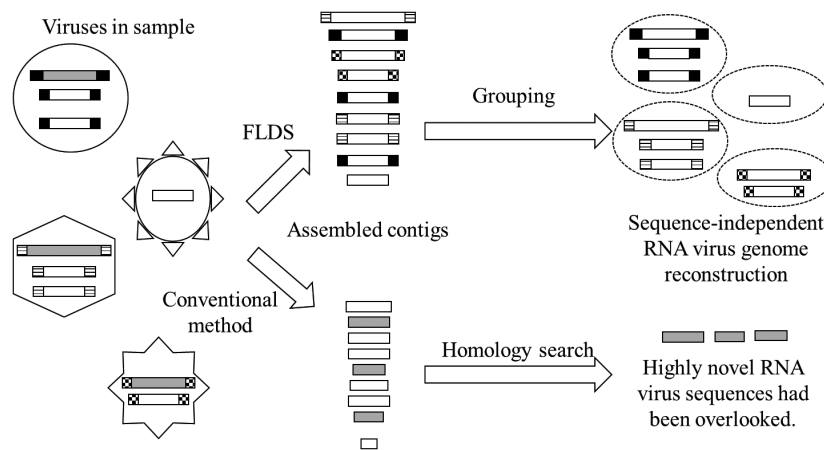


Fig. 1 Differences in FLDS and conventional method (RNA-seq). RNA viruses with a multi-segmented genome have conserved terminal sequences among their own genomic segments. FLDS allows us to obtain full-length RNA sequences containing the terminal sequences, which are difficult to obtain with RNA-seq, and to reconstruct RNA viral genomes based on the terminal sequences. RNA-seq has difficulty in obtaining the terminal sequence. The only sequences with similarity to reported RNA viral sequences can be extracted as RNA virus sequences. Highly novel RNA virus sequences which show no significant similarity to the reported RNA virus sequences may be overlooked in RNA-seq.

Table 1 Over view of mycovirus surveillance from *Aspergillus*

Species	No. of strains	AGE ^{*1} positive	FLDS positive ^{*2} (except for AGE positive)	RNA virus infected (%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	79	4	4	10
<i>Aspergillus lentulus</i>	27	5	0	19
<i>Aspergillus udagawae</i>	19	0	0	0
<i>Aspergillus pseudoviridinutans</i>	15	0	3	20
<i>Neosartorya fischeri</i>	15	0	0	0
<i>Aspergillus creber</i>	8	5	N.A.	63
<i>Aspergillus amoenus</i>	3	0	N.A.	0
<i>Aspergillus sydowii</i>	4	0	N.A.	0
<i>Aspergillus protuberus</i>	2	1	N.A.	50
<i>Aspergillus tennesseensis</i>	1	1	N.A.	100
<i>Aspergillus jensenii</i>	1	0	N.A.	0
total	174	16	7	13.2

*1 AGE: Agarose gel electrophoresis

*2 N.A.: Not analyzed

学研究センターが保有する株を使用した。 *A. creber*, *A. amoenus*, *A. sydowii*, *A. protuberus*, *A. tennesseensis*, *A. jensenii* は、海洋研究開発機構が保有する深海に分離源を持つ株を使用した。全ての菌株は適温にて potato dextrose broth 培地で振蕩培養した (120rpm)。液体培地からミラクロスやフィルター等を使用して菌体を回収し、ペーパータオル等で水分を除去後、使用するまで -80℃にて保存した。

dsRNA 精製と電気泳動による RNA ウイルス検出

菌体は、液体窒素存在下で乳鉢、またはビーズ式細胞破碎装置 (MP Biomedicals Inc) を用いて破碎した。破碎後の菌体約 0.1g から sodium dodecyl sulfate-phenol 法を用いて全核酸を抽出した。全核酸溶液から cellulose resin chromatography 法 (Morris & Dodds, 1979; Okada *et al.*, 2015) により dsRNA を精製した。精製した dsRNA をエタノール沈殿により濃縮し、1% アガロースゲル電気泳動に供した。検出には GelRed (Biotium) を用いた。

FLDS と RNA ウイルスゲノム配列決定

Urayama *et al.* (2018) および Hirai *et al.* (2021) に倣い、RNA ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。Cellulose resin chromatography 法により 1 度精製した dsRNA を再度同様に精製し、Illumina シーケンシングライブラリーを調製した。得られたライブラリーは Illumina platform でシーケンシングを行った。得られたリード配列から余分な配列を除去した後、de novo assembly (CLC Genomics Workbench Version 11) (CLC

Bio) によりコンティグ配列を作成した。カバレッジの高いコンティグについてはマッピング状況を確認しながらコンティグの伸長を行った。最終的に得られたコンティグ配列のマッピング状況から、各コンティグが dsRNA 分子の末端まで到達しているかどうかを判断し、両端が末端と判定されたコンティグを完全長配列とした。

系統解析

ORF 予測は ORFfinder によって行い、Pfam を用いたドメイン検索を実施した (Finn *et al.* 2016)。系統解析を行うために、NCBI nr データベースから取得したアミノ酸配列を加え、MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) 内の MUSCLE (Edgar, 2004) を用いてアライメントを作成した。アライメントの不明瞭な位置は、trimAl (Capella-Gutiérrez *et al.* 2009) を用いて削除した。RAxML (Stamatakis, 2006) を使用して最尤推定法に基づく系統解析を実施し、1,000 回のブートストラップテストを行った。アミノ酸置換モデルは Aminosan (Tanabe, 2011) を用いて選択した。系統樹は MEGA6 を用いて描画した。

ホモロジーモデリング

ホモロジーモデリングは SWISS-MODEL program (Waterhouse *et al.*, 2018) を用いて行った。AfuNV2, AtenNV1 のテンプレートには、それぞれ *Escherichia virus* Qbeta viral RdRp protein complexed with translational elongation factors EF-Tu and EF-Ts of *Escherichia coli* (PDB ID: 3MMP, 3AGP) を用いた。解析結果は、PyMOL software (DeLano, 2002) を用いて描画した。

結果および考察

dsRNA 電気泳動法と FLDS 法を用いたマイコウイルス探索の比較

アスペルギルス関連菌株におけるマイコウイルスのリストを構築するため、計 174 株の単離株について dsRNA の電気泳動を実施した。その結果、dsRNA 電気泳動により 16 株からマイコウイルスが検出された (Fig. 2)。続いて、電気泳動でウイルスが検出されなかった株を中心に 146 株を対象として、より好感度な FLDS による探索を実施し、8 株から新たにマイコウイルスが検出された。合計すると 23 株からウイルスが検出され、いくつかの株はウイルスが重複感染していたため、計 31 株のウイルス配列が得られた (Table 1)。以上より、1) 今回対象とした菌株セットのウイルス保有率は 13.2% (23/174) と、感度の高い技術を使用したものの、一般的に報告されるマイコウイルス感染率 (10–50%) に比べて少し低い結果となった (Ghabrial *et al.*, 2015; Kotta-Loizou & Coutts, 2017)、2) dsRNA 電気泳動で検出できないマイコウイルスが 29% (9/31 株) 存在した。FLDS でのみ検出されたマイコウイルスの多くは一本鎖 RNA (ssRNA) をゲノムとするタイプであった (Table 1)。マイコウイルスは概してゲノム核酸種により dsRNA タイプと ssRNA タイプに分類され、前者の方が細胞内での dsRNA の蓄積量が高い傾向にあることが知られている。そのため、以前より dsRNA 蓄積量の低

い ssRNA ウイルスが見逃されている可能性が指摘されていたが (Nerva *et al.*, 2016)、本研究によりこれが確かめられた。近年、FLDS 以外にも RNA-seq などの dsRNA 電気泳動よりも高感度かつ網羅的なマイコウイルス探索技術が広く使われるようになり、ssRNA タイプのマイコウイルスが多数見出されている。その結果、20 年ほど前まではマイコウイルスの多くは dsRNA タイプだと考えられていたが、現在では ssRNA ウイルスも同等数報告されている。

同定したマイコウイルスの完全長ゲノムと分類

マイコウイルスが検出された 23 株から、FLDS により 17 種のマイコウイルス完全長ゲノムを既知 RNA ウイルスとの配列類似性に依存せずに決定し (Table 2)、その代表例となるゲノム構造を示した (Fig. 3)。RdRp 配列のアミノ酸配列の類似性などから、検出したウイルスは 17 種中 14 種がこれまでに報告のない新規 RNA ウイルスであることが示唆された。

検出されたウイルスの中には、*Aspergillus fumigatus* polymycovirus 1 (AfuPmV1) や *Aspergillus fumigatus* chrysovirus (AfuCV) といった、完全長ゲノムがこれまでに決定されている既知の RNA ウイルスも含まれていた (Kotta-Loizou & Coutts, 2017)。これらに関しては、FLDS 法を用いた本研究においても同様のゲノム構造を示しており、このことは、本手法が既存の RNA ウイルスゲノムの決定方法と少なくとも同程度の正確性を有し

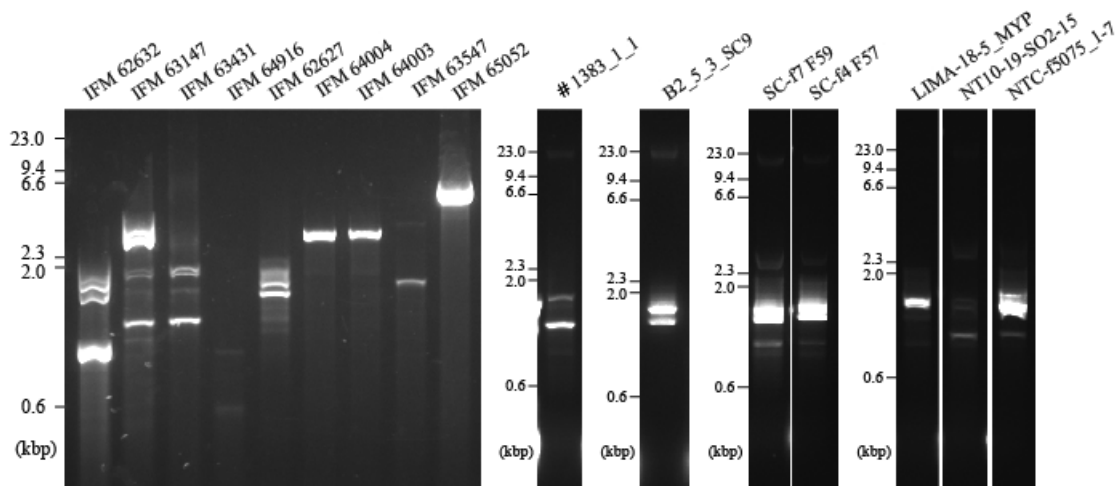


Fig. 2 Screening of mycovirus infected strains by the dsRNA agarose gel electrophoresis. The dsRNA was extracted from mycelia and examined in agarose gel electrophoresis. The gels contained GelRed to visualize dsRNA. *A. fumigatus*: IFM 62632, 63147, 63431, 64916; *A. lentulus*: IFM 62627, 64004, 64003, 63547, 65052; *A. tennesseensis*: #1383_1_1; *A. creber*: B2_5_3_SC9, SC-f7 F59, SC-f4 F57, NT10-19-SO2-15, NTC-f5975_1-7; *A. protuberus*: LIMA-18-5_MYP.

Table 2 Mycoviruses indentified in this study

Host species	Strain	Tentative virus name or similar viruses	Abbreviation of virus name	Detection method
<i>A. fumigatus</i>	IFM62632	Aspergillus fumigatus polycovirus 1	AfuPmV1	AGE
		Aspergillus fumigatus negative-stranded RNA virus 1	AfuNSRV1	FLDS
	IFM63147	Aspergillus fumigatus chrysovirus	AfuCV	AGE
		Aspergillus fumigatus narnavirus 2	AfuNV2	AGE
		Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1	AfuBOV1	FLDS
	IFM63431	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	AfuNV2	AGE
	IFM64916	Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1	AfuBOV1	AGE
	IFM62355	Aspergillus fumigatus mitovirus 1	AfuMV1	FLDS
	IFM62629	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	AfuNV2	FLDS
	IFM63439	Aspergillus fumigatus RNA virus 1	AfuRV1	FLDS
IFM64779	Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1	AfuBOV1	FLDS	
<i>A. lentulus</i>	IFM62627	Aspergillus lentulus partitivirus 1	AIPV1	AGE
	IFM63547	Aspergillus lentulus narnavirus 1	AINV1	AGE
	IFM64003	Aspergillus lentulus non-segmented dsRNA virus 1	AINdsRV1	AGE
	IFM64004	Aspergillus lentulus non-segmented dsRNA virus 1	AINdsRV1	AGE
	IFM65052	Aspergillus lentulus totivirus 1	AITV1	AGE
<i>A. pseudoviridimitans</i>	IFM59502	Aspergillus pseudoviridimitans botourmiavirus 1	ApvBOV1	FLDS
	IFM61377	Aspergillus pseudoviridimitans botourmiavirus 1	ApvBOV1	FLDS
	IFM61378	Aspergillus pseudoviridimitans botourmiavirus 1	ApvBOV1	FLDS
<i>A. creber</i>	B2_5_3_SC9	Aspergillus creber partitivirus 1	AcrePV1	AGE
		Aspergillus creber partitivirus 1	AcrePV1	AGE
	SC-f7 F59	Aspergillus creber narnavirus 1	AcreNV1	AGE
		Aspergillus creber ourmiavirus 1	AcreOV1	AGE
	SC-f4 F57	Aspergillus creber narnavirus 1	AcreNV1	AGE
		Aspergillus creber ourmiavirus 1	AcreOV1	AGE
	NT10-19-SO2-15	Aspergillus creber narnavirus 1	AcreNV1	AGE
		Aspergillus creber ourmiavirus 1	AcreOV1	AGE
	NTC-f5975_1-7	Aspergillus creber partitivirus 1	AcrePV1	AGE
Aspergillus creber narnavirus 1		AcreNV1	AGE	
Aspergillus creber ourmiavirus 1		AcreOV1	AGE	
<i>A. tennesseensis</i>	#1383 1 ⊕	Aspergillus tennesseensis narnavirus 1	AtenNV1	AGE
<i>A. protuberus</i>	LIMA-18-5 MYP	Aspergillus protuberus partitivirus 1	AproPV1	AGE

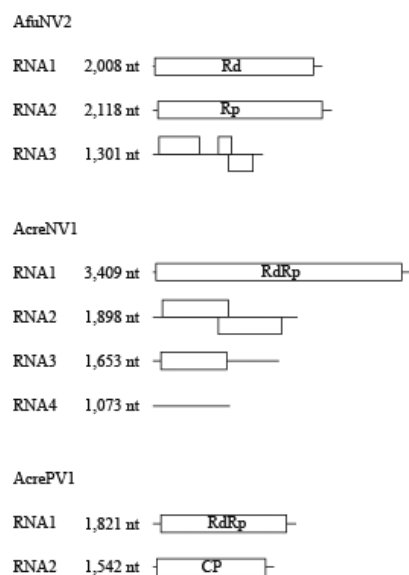


Fig. 3 Organization of representative RNA viral genomes. Straight lines indicate RNA segments. Boxes show predicted ORFs. Genes predicted by homology search are shown in boxes.

ていることを示唆している。

また、新規なマイコウイルスであっても、近縁なウイルスグループの完全長ゲノムが明らか場合は、従来の配列類似性に基づいた手法で、その完全長ゲノムを同定できる可能性がある。そのような例として、*Aspergillus creber partitivirus 1* (AcrePV1) が挙げられる (Fig. 3)。AcrePV1 は本研究で発見した Partitiviridae (科) に属する新規のマイコウイルスであり、FLDS 法により各分節の末端配列の類似性を指標に完全長ゲノムを同定したところ、そのゲノムは 2 分節の RNA 分子から構成されていた。Fig. 3 中にボックスで示されているのが推定 ORF であり、それらの推定アミノ酸配列を用いた配列相同性検索の結果、RNA1 には RdRp が、RNA2 にはウイルス粒子の殻を形成する外被タンパク質 (coat protein: CP) がそれぞれコードされていた。AcrePV1 のゲノム構造は Partitiviridae (科) ウイルスの典型的なゲノム構造であり、各タンパクは既知の Partitiviridae (科) に属するウイルスと十分な配列類似性を示していた。このような典型的なウイルスであれば FLDS を用いなくても、配列類似性からその完全長ゲノムを推定・同定することは可能である。

一方で、従来の配列類似性に基づいた手法では、既知のウイルス遺伝子と配列類似性を示さない遠縁なウイルス遺伝子は検出できないが、FLDSではそのような遺伝子も検出可能である。その例として、*Aspergillus crebernavirus 1* (AcreNV1) が挙げられる。AcreNV1は本研究で発見した、Narnaviridae (科) に属する新規のマイコウイルスであり、解析の結果、4分節のRNA分子からゲノムが構成されていた。典型的なNarnaviridae (科) のRNAウイルスは1本のRNAのみで構成され、そこにはRdRpがコードされている。推定アミノ酸配列を用いた類似性検索ではAcreNV1のRNA1にはRdRpがコードされており、配列類似性による従来の解析基準ではRNA1のみでも全長配列を取得すれば、“AcreNV1の完全長ゲノム”として報告しても異論は生じないと予想される。これに対し、FLDSを用いることで、RNA1の5'末端、3'末端の配列と共通配列を有するRNA2,3,4が見出された。当該配列は既知配列と有意な配列類似性を示さず、非FLDS解析の大部分で見落とされてしまうものである。このことは、当該手法を用いることで従来よりも格段に高品質な完全長ゲノム配列を取得可能であることを示している。

RdRpが分割コードされているRNAウイルスの発見

Aspergillus fumigatus narnavirus 2 (AfuNV2) は、以前に別の研究グループによって報告されたウイルスであり (Zoll *et al.*, 2018), 今回の研究では3つの異なる *A. fumigatus* 分離株 (IFM 63147, IFM 63431, IFM 62629) で同定された。既報のAfuNV2ゲノムは1本のRNAのみで構成されるとされていたが、FLDSを用いた本研究では、末端配列の類似性から、AfuNV2がRNA1 (RdRp) に加えて、RNA2とRNA3の2本のセグメントを有していることを明らかにした (Fig. 3)。RNA2およびRNA3には複数のORFが推定され、RNA2上のORF2は既知Narnaviridae (科) のRdRpとトップヒットした。RNA3上のORFは全て既知配列との有意な配列類似性を示さなかった。

AfuNV2のRNA1とRNA2それぞれがRdRpをコードしていることが示唆されたが、従来のRNAウイルス学に基づくこの状況には何らかの問題が存在していると考えられた。RdRpはRNAウイルスにおいて転写・複製を担う必須酵素であり、既知の (マイコウイルスに限らず人類が知る全ての) RNAウイルスは皆、ゲノム中にコードされているRdRp遺伝子数は1ウイルスにつき1コピーである。そのため、従来のRNAウイルス研究においては1種類のRdRpが1種類のRNAウイルスに相当するものとして扱われてきた。これに基づく、AfuNV2で新たに見出されたRdRpと類似性を示すRNA2はAfuNV2 (RNA1) とは末端配列が類似してい

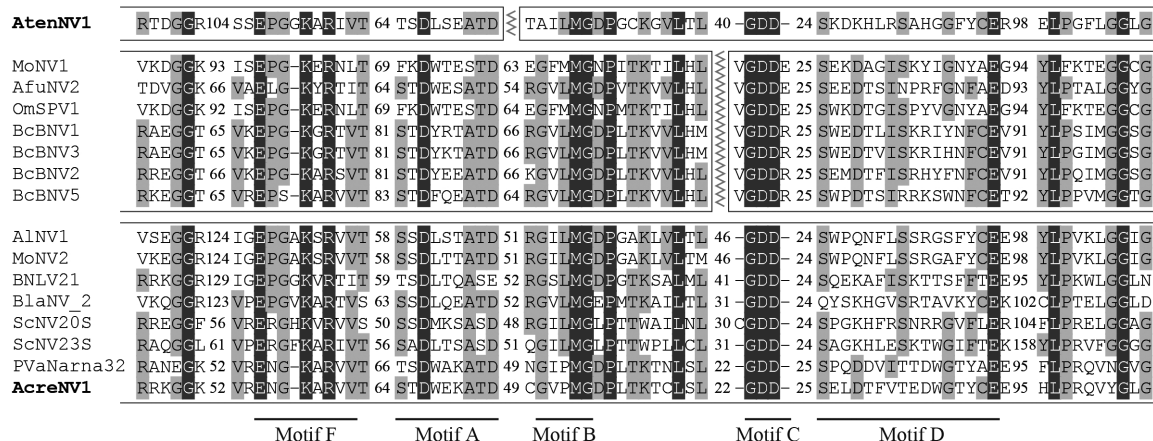
る別のRNAウイルスということになるが、詳細な解析を進めていくと、RNA2もAfuNV2に由来するということが明らかになった。RdRpにはA-Gの機能モチーフが存在しており、その中でも特にA-CはRdRpの活性中心に位置し、RdRpが活性を発揮する上で重要であると考えられている (Venkataraman *et al.*, 2018)。RNA1, 2上にコードされているRdRpそれぞれにおいてこのモチーフを探索すると、RNA1ではモチーフCが、RNA2ではモチーフAとBが欠けており (Fig. 4A), RNA1, RNA2は共に完全なRdRpをコードしておらず、一方で欠損しているモチーフがもう一方のセグメント上に存在することが明らかになった。この結果から、AfuNV2はRdRpのモチーフA+BをRNA1に、モチーフCをRNA2に分割してコードしており (Fig. 4B, Type I), これら2種類のたんぱく質が複合体を形成してRdRp活性を示すということが示唆された。加えて、ホモロジーモデリングによる構造予測からも (Fig. 5A), これら2種類のたんぱく質が水素結合やファンデルワールス力により相互作用し、RdRpの活性部位を形成していることが示唆された (Fig. 5B)。既知のRNAウイルスは全て単一のRNA分節上のORFにRdRpをコードしており、本研究では、別々の分節上の別のORF上にRdRpを分割してコードするRNAウイルスの存在を初めて明らかにした。

本研究で見出した *Aspergillus tennesseensis narnavirus 1* (AtenNV1) も、AfuNV2同様にRdRpを分割コードするRNAウイルスであることが示唆された (Figs. 4, 5)。しかし、アライメントに基づくモチーフ同定の結果、AtenNV1はRNA1にモチーフAを、RNA2にモチーフB+Cをコードしており、先のAfuNV2とはRdRpの分割場所が異なっていた (Fig. 4A)。このことから、分割型RdRpにはAfuNV2のようにモチーフBとCの間で切れているタイプ (Type I) とAtenNV1のようにモチーフAとBの間で切れているタイプ (Type II) の2タイプが存在することが明らかになった (Fig. 4B)。

公共データベース上のRNA-seqデータや別の探索で検出したマイコウイルス、同時期に報告された分割型RdRpを有する別のマイコウイルス (Sutela *et al.*, 2020; Ruiz-Padilla *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2021) などのデータを用いて、AfuNV2やAtenNV1のような分割型RdRpを有するRNAウイルスの分布や系統学的位置を調査した (Fig. 6)。まず、一連の解析で見出された分割型RdRpはすべてNarnaviridae (科) に由来するものであり、分割型RdRpはType I (モチーフBとCの間で分割) とType II (モチーフAとBの間で分割) の2つの分割タイプごとに、2つのクレードに分かれて存在していた (Fig. 6)。Type I, Type IIはそれぞれ非分割型RdRpを有するクレードと共に別々に分岐しており、Narnaviridae

糸状菌に感染するマイコウイルスの多様性解析

(A)



(B)

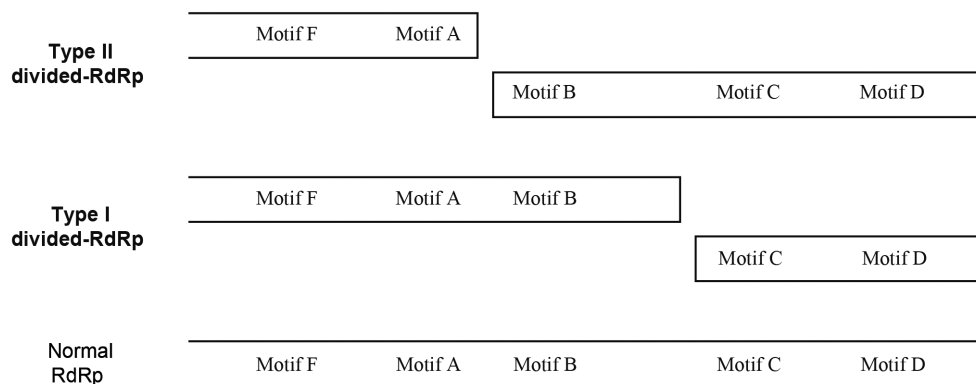


Fig. 4 Positions of the conserved motifs in normal RdRps and divided RdRps. (A) Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of the RdRp motifs for the family Narnaviridae. The amino acid positions with 100 per cent matches and >50 percent matches are depicted by dark gray and light gray shading, respectively. The numbers in the alignment indicate the number of amino acids not shown in the alignment. (B) Schematic overview of motif positions on viral ORF(s) encoding RdRp. This figure was adapted from Chiba *et al.* (2020).

(科)において少なくとも2度の独立したRdRpの分割が生じたことが示唆された。

実際にこれら分割型RdRpがRdRp活性を示すのかは明らかになっておらず、分離株を用いた解析などで明らかにしていく必要がある。また、これまでに見出された分割型RdRpはすべてNarnaviridae(科)に属するマイコウイルスであり、少なくとも子囊菌には広く分布していることが示唆されているが、他の宿主やウイルス科にも類似のものが存在するのことは明らかになっていない。一般的なRNAウイルス探索に用いられる非FLDS解析ではこのようなタイプのRNAウイルスを同定することは困難であることから、FLDSのより広範な適用により明らかにしていく必要がある。

RNAウイルスのマーカー遺伝子とされるRdRpが別々

の分節RNAに分割されてコードされるという発見は、100年以上続くRNAウイルス研究で不変とされた経験則を打ち破るものと言える。このような基礎科学における重大な発見が、ヒトを含む動物や植物の病原性RNAウイルス研究分野からではなくマイコウイルス研究によってもたらされたことは特筆に値する。近年、シーケンシング技術の発展により数万単位の新規RNAウイルスが毎年報告されるようになっており(Edgar *et al.*, 2022; Neri *et al.*, 2022; Zayed *et al.*, 2022), 2000年ごろに人類が認知していたRNAウイルスが数千種であることを考えると文字通り爆発的な増加を示している。しかし、これらRNAウイルスの大部分は技術的な制約から“RdRpの部分配列”しか明らかになっておらず、完全長ゲノムは勿論、その宿主や形状、機能についてほとんど

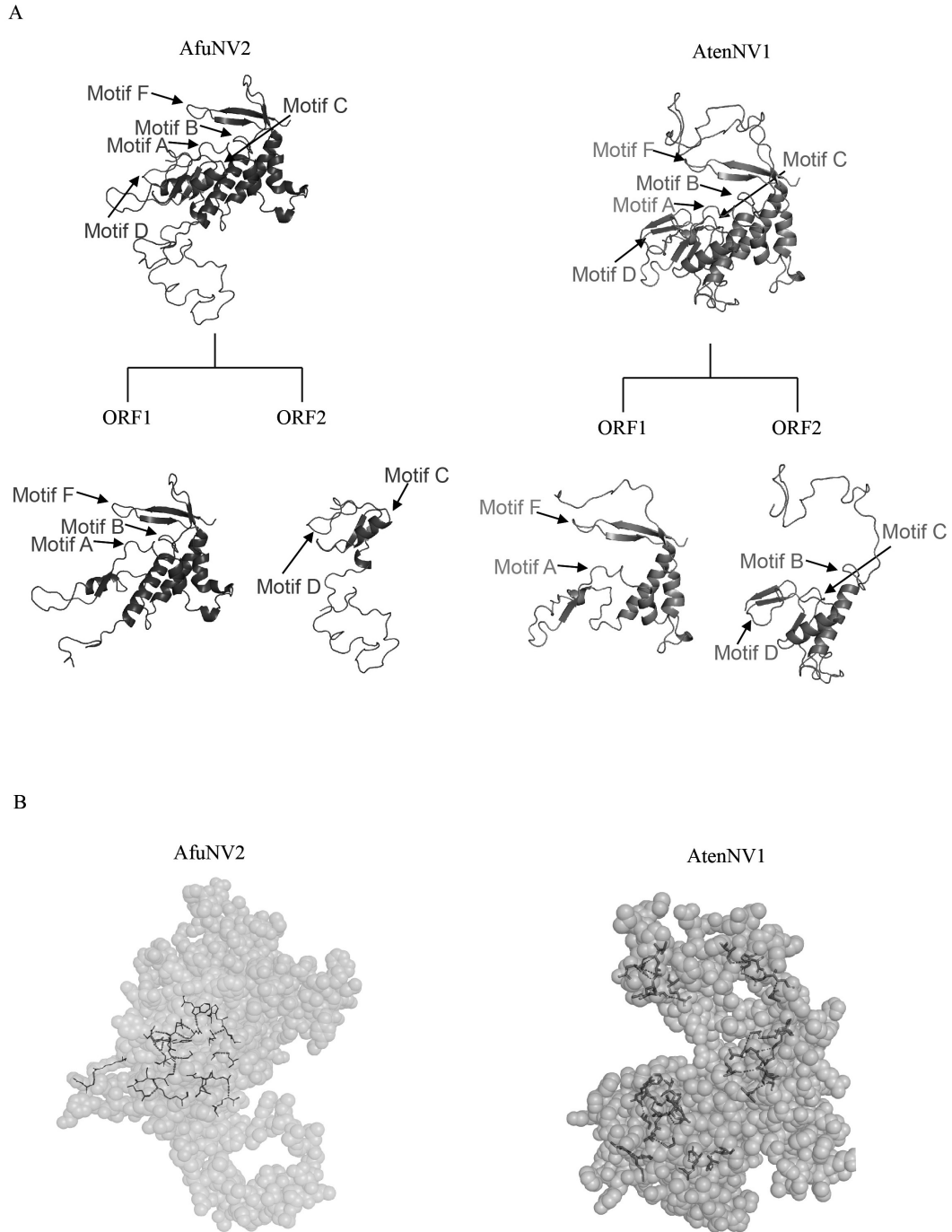


Fig. 5 3D structure prediction model of the two proteins that compose divided RdRp. (A) Overall structure and of AfuNV2 and AtenNV1 model. AfuNV2 ORF1, green; AfuNV2 ORF2, blue. AtenNV1 ORF1, pink; AtenNV1 ORF2, orange. Although the position of motif B is different between AfuNV2 and AtenNV1 (AfuNV2: ORF1, AtenNV1: ORF2), the structures of motif B are conserved between the two viral RdRp. (B) Hydrogen bonds and van der Waals contacts between the two viral RdRp. In AfuNV2, green and blue ball models show ORF1 and ORF2 residues, respectively. Stick models show amino acid residues of ORF1 and ORF2 that interact with each other by hydrogen bonding. Pink dashed lines indicate hydrogen bond between amino acid residues of ORF1 and ORF2. In AtenNV1, pink and orange ball models indicate ORF1 and ORF2, respectively. Stick models show amino acid residues of ORF1 and ORF2 that interact with each other. Cyan and blue dashed lines refer to hydrogen bonds and van der Waals contacts, respectively. This figure was adapted from Chiba *et al.* (2020) and Chiba *et al.* (2021).

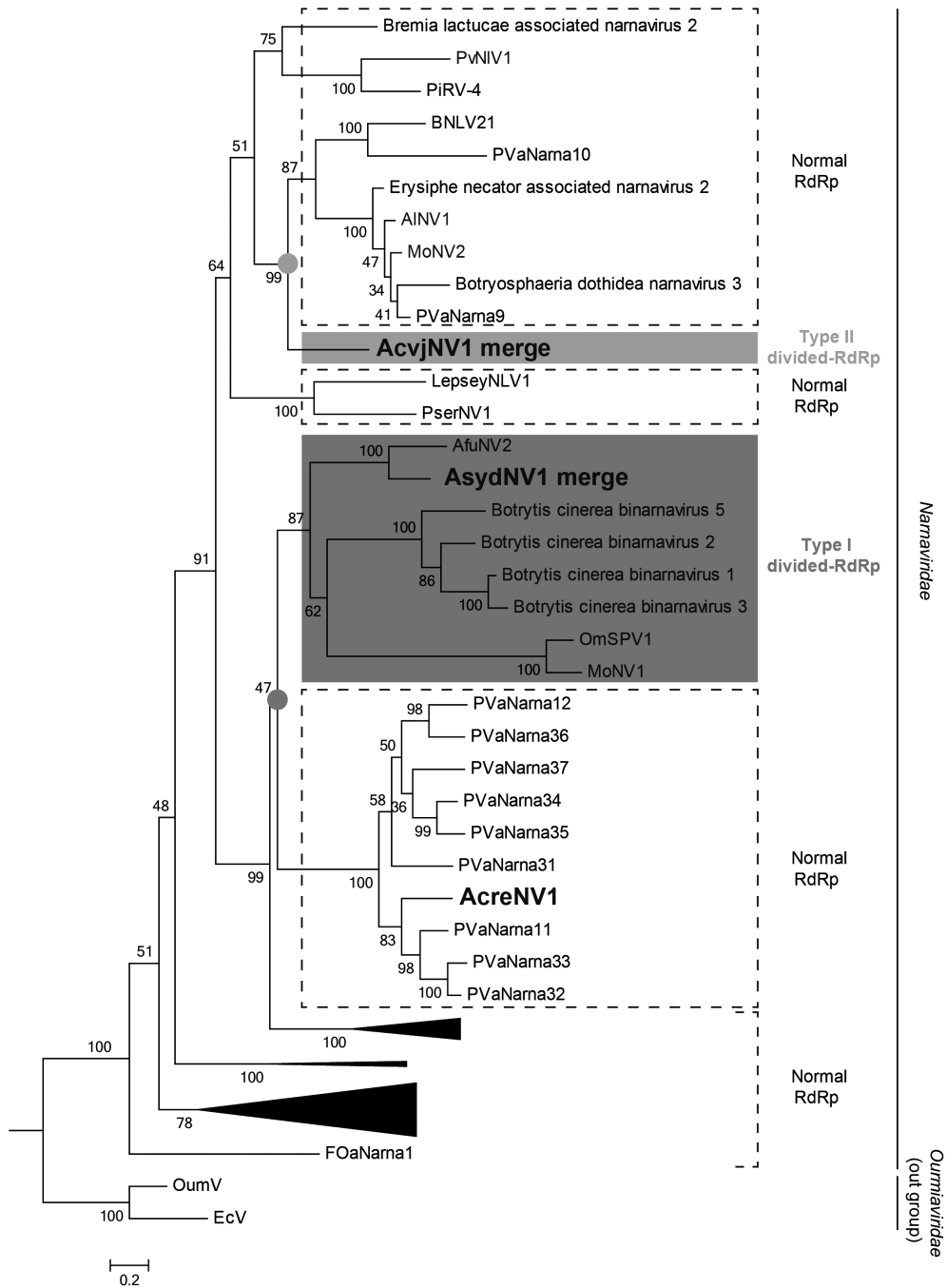


Fig. 6 Phylogenetic tree based on the RdRps from the family Narnaviridae. For viruses with divided RdRp, the two amino acid sequences of the first and second halves were merged. Then, the merged sequences aligned with other viruses that have normal RdRp. The numbers at the nodes are the percentage bootstrap support from 1,000 RAXML bootstrap replicates. The best-fitting amino acid substitution model was [BLOSUM62+ F+ G]. This figure was adapted from Chiba *et al.* (2021).

ど何も明らかになっていない。しかしマイコウイルス研究では、系統的にも多様な宿主糸状菌の分離株を対象に解析できる。そして、FLDSの技術によりRdRpおよびゲノムの完全長の取得が可能になり、上記の限界を打ち破り、地球上にどのようなRNAウイルスが存在しているのか、その解明を牽引していく可能性が高い。

要 約

糸状菌を対象としたウイルス研究は近年、それまで認知されてこなかった未開のウイルスが多数存在することを明らかにし、ウイルス多様性の解明を牽引している。本研究では、従来手法と比べて感度が高く、様々なアドバンテージを有する独自のウイルス探索手法を糸状菌に適用することで、これまでに見逃されてきたウイルスを多数同定した。特に、分割型のRdRpを有するウイルスが含まれており、100年以上にわたるRNAウイルス研究史上一貫して保たれていた経験則を打ち破る発見に至った。マイコウイルスを対象とした探索研究によりウイルス学が一段と拡張された。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 浦山俊一. 2018. 病気を起こさず宿主と共存するウイルス～生物相互作用の理解にウイルスの視点を～. 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会. (6月26日, 茨城)
- 2) 千葉悠斗, 浦山俊一, 矢口貴志, 萩原大祐. 2019. *Aspergillus fumigatus*とその近縁種に潜伏するRNAウイルスの網羅的な探索. 第13回ゲノム微生物学会. (3月6-8日, 東京)
- 3) 千葉悠斗, 浦山俊一, 矢口貴志, 萩原大祐. 2019. 糸状菌を用いたRNAウイルス多様性の再検証. 日本微生物生態学会 第33回大会. (9月10-13日, 山梨)
- 4) Chiba, Y., Yaguchi, T., Urayama, S., Hagiwara, D. 2019. RNA virus diversity in *Aspergillus* species revealed by FLDS, a comprehensive non-retro RNA virus surveillance method. Asian Mycological Congress. (October 1-4, Mie) .
- 5) 浦山俊一. 2019. 生態系構成要素としてのウイルスを考える—糸状菌に潜むマイコウイルスを例に—. 糸状菌相互応答学シンポジウム. (11月27日, 宮城)
- 6) 浦山俊一. 2020. 環境ウイルス生態学—自然界の生物に潜むウイルスのはなし—. 第19回みちのくウイルス塾. (7月24日, 宮城)
- 7) 浦山俊一, 布浦拓郎. 2020. 二本鎖RNAシーケンシングによるRNAウイルス研究の新展開. 第22回日本進化学会. (9月4日, オンライン)
- 8) 千葉悠斗, 老木紗代子, 矢口貴志, 浦山俊一, 萩原大祐. 2020. 菌類RNAウイルスの持つゲノム構造多様性の探索. ウイルス学若手研究集会. (12月19日, オンライン)
- 9) 浦山俊一. 2021. 真菌細胞内で“家畜化”されたウイルス. 第94回日本細菌学会総会. (3月23日, オンライン)

- 10) 萩原大祐. 2021. Virus world of fungal world. 第23回酵母合同シンポジウム. (9月2-3日, オンライン)
- 11) 浦山俊一. 2021. ウイルスは細胞外にデポジットされた細胞制御“自己複製子”. 生命情報科学若手の会第13回研究会. (10月23日, オンライン)
- 12) 浦山俊一. 2021. 糸状菌は何のためにRNAウイルスを育むのか?. 糸状菌分子生物学研究会若手の会第9回ワークショップ. (11月10日, オンライン)
- 13) 千葉悠斗, 高橋弘喜, 楠屋陽子, 渡邊哲, 浦山俊一, 萩原大祐. 2021. *Aspergillus fumigatus*と感染ウイルスのdual-genomicsによる進化的な関係性の解析. 糸状菌分子生物学コンファレンス. (11月11-12日, オンライン)
- 14) 浦山俊一, 池田彩乃, 千葉悠斗, 黒木美沙, 趙彦杰, 萩原大祐. 2021. RNAウイルスと真核微生物の共生的関係を俯瞰する. 日本共生生物学会第5回大会. (11月27-28日, オンライン)
- 15) Hagiwara, D. 2022. Virus infection among a fungal world. The 19th young Scientist Seminar. (November 26-27, Online) .
- 16) 浦山俊一. 2023. 真菌を操るウイルスのポテンシャルを俯瞰する. 日本マイコトキシ学会第88回学術講演会. (1月6日, 茨城)
- 17) 浦山俊一. 2023. 生物を変身させる秘密道具としてのウイルス. 微生物コンソーシアムG3定例会 (大隅基礎科学創成財団). (2月15日, オンライン)

原著論文

- 1) Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M., Urayama, S., Sakai, K., Chibana, H., Kamei, K., Moriyama, H., Gonoi, T. 2020. Analysis of an intrinsic mycovirus associated with reduced virulence of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **10**: 3045.
- 2) Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M., Urayama, S., Ninomiya, A., Chiba, Y., Sakai, K., Hagiwara, D., Chibana, H., Moriyama, H., Gonoi, T. 2020. Phenotypic and molecular biological analysis of polymycovirus AfuPmV-1M from *Aspergillus fumigatus*: Reduced fungal virulence in a mouse infection model. *Front. Microbiol.* **11**: 607795.
- 3) Chiba, Y., Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S., Hagiwara, D. 2020. Discovery of divided RdRp sequences and a hitherto unknown genomic complexity in fungal viruses. *Virus Evol.* **7**: veaa101.
- 4) Chiba, Y., Oiki, S., Zhao, Y. J., Nagano, Y., Urayama, S., Hagiwara, D. 2021. Splitting of RNA-dependent RNA polymerase is common in Narnaviridae: Identification of a type II Divided-RdRp from Deep-Sea Fungal Isolates. *Virus Evol.* **7**: veab095.
- 5) Ikeda, A., Chiba, Y., Kuroki, M., Urayama, S., Hagiwara, D. 2022. Efficient elimination of RNA mycoviruses in *Aspergillus* species using RdRp-inhibitors ribavirin and 2'-C-methylribonucleoside derivatives. *Front. Microbiol.* **13**: 1024933.
- 6) Chiba, Y., Yabuki, A., Takaki, Y., Nunoura, T., Urayama, S., Hagiwara, D. 2023. The first identification of a narnavirus in *Bigyra*, a marine-protist. *Microb. Environ.* **38**: ME22077.
- 7) Zhao, Y. J., Shirouzu, T., Chiba, Y., Hosaka, K., Moriyama, H., Urayama, S., Hagiwara, D. 2023. Identification of novel RNA mycoviruses from wild mushroom isolates in Japan. *Virus Research.* **325**: 199045.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 浦山俊一, 千葉悠斗, 高木善弘, 萩原大祐, 布浦拓郎. 2019. 再構築された“ウイルス生態像”. バイオテクノロジー学会. 19: 5-12
- 2) Urayama, S., Takaki, Y., Chiba, Y., Zhao, Y., Kuroki, M., Hagiwara, D., Nunoura, T. 2022. Eukaryotic microbial RNA viruses—Acute or persistent? Insights into their function in the aquatic ecosystem. *Microb. Environ.* **37**: ME22034

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筑波大学糸状菌相互応答講座の学生・構成員諸氏に感謝の意を表します。また、JSPS 科研費、挑戦的研究(開拓)(萩原大祐 20K20377)、新学術領域研究(研究領域提案型)(浦山俊一 20H05579, 22H04879)、特別研究員奨励費(千葉悠斗 21J10873)の支援にも感謝いたします。

文 献

- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, **25**: 1972–1973.
- Charon, J., Buchmann, J. P., Sadiq, S., & Holmes, E. C. 2022. A bioinformatic resource to identify and annotate divergent RNA viruses in metagenomic sequence data. *Virus Evol.* **8**: veac082.
- Chiba, Y., Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S., & Hagiwara, D. 2020. Discovery of divided RdRp sequences and a hitherto unknown genomic complexity in fungal viruses. *Virus Evol.* **7**: veaa101.
- Chiba, Y., Oiki, S., Zhao, Y., Nagano, Y., Urayama, S., & Hagiwara, D. 2021. Splitting of RNA-dependent RNA polymerase is common in Narnaviridae: Identification of a type II divided RdRp from deep-sea fungal isolates. *Virus Evol.* **7**: veab095.
- DeLano, W.L. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, **40**: 82–92.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.
- Edgar, R.C., Taylor, J., Lin, V., Altman, T., Barbera, P., Meleshko, D., *et al.* 2022. Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery. *Nature* **602**: 142–147.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., & Bateman, A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* **44**: D279–285.
- Ghabrial, S.A., Castón, J.R., Jiang, D., Nibert, M.L., & Suzuki, N. 2015. 50-plus years of fungal viruses. *Virology* **479**: 356–368.
- Hirai, M., Takaki, Y., Kondo, F., Horie, M., Urayama, S., & Nunoura, T. 2021. RNA viral metagenome analysis of subnanogram dsRNA using fragmented and primer ligated dsRNA sequencing (FLDS). *Microb. Environ.* **36**: ME20152.
- Hollings, M. 1962. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* **196**: 962–965.
- Jia, J., Fu, Y., Jiang, D., Mu, F., Cheng, J., Lin, Y., *et al.* 2021. Interannual dynamics, diversity and evolution of the virome in *Sclerotinia sclerotiorum* from a single crop field. *Virus Evol.* **7**: veab032.
- Kondo, H., Botella, L., & Suzuki, N. 2022. Mycovirus diversity and evolution revealed/inferred from recent studies. *Annu. Rev. Phytopathol.* **60**: 307–336.
- Kotta-Loizou, I. & Coutts, R.H.A. 2017. Mycoviruses in *Aspergilli*: A comprehensive review. *Front. Microbiol.* **8**: 1699.
- Morris, T. J., & Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, **69**: 854–858.
- Neri, U., Wolf, Y.I., Roux, S., Camargo, A.P., Lee, B., Kazlauskas, D., *et al.* 2022. Expansion of the global RNA virome reveals diverse clades of bacteriophages. *Cell* **185**: 4023–4037.
- Nerva, L., Ciuffo, M., Vallino, M., Margaria, P., Varese, G.C., Gnani, G., & Turina, M. 2016. Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Res.* **219**: 22–38.
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., & Natsuaki, T. 2015. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *J. Gen. Plant Pathol.* **81**: 103–107.
- Ruiz-Padilla, A., Rodríguez-Romero, J., Gómez-Cid, I., Pacifico, D., & Ayllón, M.A. 2021. Novel mycoviruses discovered in the mycovirome of a necrotrophic fungus. *mBio* **12**: e03705-20.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.
- Sutela, S., Forgia, M., Vainio, E. J. *et al.* 2020. The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. *Virus Evol.* **6**: veaa076.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- Tanabe, A. S. 2011. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol. Ecol. Res.* **11**: 914–921.
- Urayama, S., Takaki, Y., Nishi, S., Yoshida-Takashima, Y., Deguchi, S., Takai, K., & Nunoura, T. 2018. Unveiling the RNA virosphere associated with marine microorganisms. *Mol. Ecol. Res.* **18**: 1444–1455.
- Venkataraman, S., Prasad, B.V.L.S., & Selvarajan, R. 2018. RNA dependent RNA polymerases: Insights from structure, function and evolution. *Viruses* **10**: 76.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., *et al.* 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**: W296–W303.
- Zayed, A.A., Wainaina, J.M., Dominguez-Huerta, G., Pelletier, E., Guo, J., Mohssen, M., *et al.* 2022. Cryptic and abundant marine viruses at the evolutionary origins of Earth's RNA virome. *Science* **376**: 156–162.
- Zoll, J., Verweij, P.E., & Melchers, W.J. 2018. Discovery and characterization of novel *Aspergillus fumigatus* mycoviruses. *PLoS One* **13**: e0200511.

マイコウイルスが宿主糸状菌にもたらす作用の網羅解析

浦山 俊一, 萩原 大祐

筑波大学生命環境系糸状菌相互応答学講座

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

Comprehensive analysis of the impact of mycoviruses on their host filamentous fungi

Syun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577

Several mycoviruses that have a significant impact on fungal pathogenicity have been extensively studied over the years. However, researchers have also noticed that a number of mycoviruses that do not exhibit any noticeable effect on host phenotypes exist. This empirical fact suggests that the previously analyzed effects of mycoviruses represent exceptional cases and only provide a partial view of their function. Therefore, it is necessary to study the comprehensive effects of mycoviruses regardless of visible changes in the host phenotype. Firstly, to facilitate the study of a wide range of mycoviruses, we developed an efficient virus elimination system. In this regard, we conducted comparative analyses of virus elimination rates using various nucleoside analogs and observed that the efficacy of elimination depends on the specific combination of the analog and the viral genome type. Secondly, we also obtained virus-free strains from multiple virus-harboring fungal strains/species. Based on the comparative analyses, it was revealed that most mycoviruses induced host-phenotype change but it was limited to the specific conditions. Our data suggested that mycoviruses are not destructive but mild parasites of filamentous fungi, possibly to expand fungal phenotypic diversity without genetic change.

Key words: Mycovirus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, Secondary metabolism, Transcriptome

緒 言

初期のマイコウイルス研究は、ヒトや植物のウイルス研究と同様に、宿主に対する病原性などの表現型をもとに選抜したものを対象としてきた。しかし次第に、マイコウイルスの多くは“病気”を引き起こさず潜在的な存在である可能性が指摘されるようになってきた。例えば、明確な“表現型”を示していない真菌のメタトランスクリプトームデータから多数のマイコウイルスが検出されることから (Starr *et al.*, 2019; Sutela *et al.*, 2019; Hillary *et al.*, 2022)、宿主の表現型に影響を与えないウイルスの存在が示唆された。したがって、強烈な表現型の変化を与えるマイコウイルスが存在する一方で、その他の潜

在性のマイコウイルスについても捉えて統合的に理解することが、マイコウイルスと宿主糸状菌の関係性の解明に必要である (Larios *et al.*, 2023; Komatsu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018)。実際、目に見える表現型を与えない組み合わせであっても宿主の遺伝子発現や二次代謝生産が変わることが報告されている (Zhang *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2014)。また、これまでの多くの研究では、ウイルスが確認された株における表現型の観察のみから機能が評価されてきたが、近年になり、異なる菌種や菌株への導入による評価も進められている (Cordoba *et al.*, 2022; Ning *et al.*, 2022; Nuskern *et al.*, 2021; Kashif *et al.*, 2019)。これらの情報を蓄積していくことで、より俯瞰的かつ高解像度なマイコウイルスの機能解明が期待できるが、まだこのような視点を持った研究事例は少ないのが現状である。

実際、各論的なマイコウイルスの機能に関する報告は枚挙にいとまがない。代表的な例としては、宿主菌の植物に対する病原性が大きく変化するクリ胴枯病菌やフザ

E-mail: hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp

共同研究者：黒木 美沙 (筑波大学生命環境系, 現 東京大学農学生命科学研究科)。

矢口 貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)。

リウム属菌とマイコウイルスの関係については古くから研究が進められており、マイコウイルス感染による影響としてコロニー性状をはじめ菌糸生長、分生子形成、病原性、二次代謝生産などの変化について多くのレビューがまとめられている (García-Pedrajas, 2019; Li *et al.*, 2019; Nuss, 2005; Milgroom & Cortesi, 2004; Heiniger & Rigling, 1994). 近年ではそれら以外にも、*Alternaria alternata* の毒素生産促進や *Aspergillus ochraceus* でのオクラトキシンの生産促進、*Magnaporthe oryzae* でのテヌアゾン酸生産促進、*Stemphylium lycopersici* での Altersolanol A 生産抑制など、マイコウイルスによって二次代謝産物の生産量が変化する例が多く報告されている (Okada *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022; Ninomiya *et al.*, 2020; Nerva *et al.*, 2019). また、担子菌の *Pleurotus ostreatus* では *Pleurotus ostreatus virus1* の感染で各種酵素の生産が抑制されており、結果として子実体が矮小化する現象が報告されている (Song *et al.*, 2020). ヒト病原菌におけるマイコウイルスについても研究が進んできている。*Aspergillus* や *Rhizopus*, *Cladosporium* など 27 属の臨床分離株を対象に網羅的なマイコウイルス探索が行われた結果 11 種のウイルスが検出され、マイコウイルスが普遍的に存在していることが明らかになった (Kinsella *et al.*, 2022). 研究が進んでいる *Aspergillus fumigatus* では、宿主の病原性を低下させるウイルスが複数報告されている一方で、病原性を変化させないウイルスやむしろ病原性を増加させるウイルスの存在も報告されている (Takahashi-Nakaguchi *et al.*, 2020a; Takahashi-Nakaguchi *et al.*, 2020b; Ozkan & Coutts, 2015). 宿主のストレス耐性に影響を与えるウイルスもいる。ストレス耐性の変化は結果的に病原性発露の程度にも影響を与えることが多く、近年注目が集まっている。*A. fumigatus* では低酸素ストレスや酸化ストレス、浸透圧ストレスへの耐性が低下している *Aspergillus fumigatus* Chrysovirus 41362 感染株においてマウスへの病原性低下が確認されている (Takahashi-Nakaguchi *et al.*, 2020b). *Colletotrichum* 属では浸透圧ストレス耐性や植物病原性に影響を与えるウイルスが複数報告されている (Guo *et al.*, 2022; Olive & Campo, 2021). *Penicillium* 属菌では複数の菌株とウイルスの組み合わせで同様に prochloraz への耐性が低下することが明らかになっており、この効果が *Penicillium* 属菌に共通したものであることが示唆されている (Wang *et al.*, 2019; Niu *et al.*, 2018).

このように多数の報告はあるものの、俯瞰的かつ高解像度な研究事例が少ない一因として、研究材料の取得が難しいという点があげられる。マイコウイルスは細胞外からの感染経路をもたないため、任意の宿主に感染させてウイルスの影響を評価するということが難しいことが障壁になっていた (Nuss, 2005). そのため、ウイルスの

影響を観察するためにはウイルスに感染した株からウイルスを脱離して同じ遺伝的背景でウイルスの有無のみが異なる株同士を比較するということが行われてきた。ウイルスの脱離方法についても、長期培養やプロトプラスト化、菌糸先端の切断などの手法が考案され実施されてきたが、いずれも効率が低いことが課題であった (鈴木, 2014). 近年になり、ヒトのウイルス治療薬として使用されるタンパク合成阻害剤や核酸アナログが、マイコウイルスにも適用できることが示され利用が進んできた (Applen Clancey, 2020; Herrero & Zabalgoeazcoa, 2011; Niu *et al.*, 2018). しかし、論文ごとに条件や対象ウイルス種が異なるため、これらの薬剤の有効性の比較は困難である。

さらに、多くの研究はマイコウイルスの明確な影響を探すことに重点を置かれがちであり、ミクロなレベルの影響や、そもそも影響が見られないという点などが軽視されてきた。そのため、マイコウイルス保持株とその治療株の間で差異が見られた表現型については上記の通り多数の事例を見つけることができるが、差異が見られない組み合わせや条件を文献情報から多数得ることは難しい。また、多くの研究は異なる場所、手技、菌株、ウイルス種にて行われており、文献で報告されている結果同士を並べて比較することは事実上できない。このような状況は、マイコウイルスという存在が真菌に何をもたらしているのかという俯瞰的な機能解明を困難にしている。

そこで、本研究ではまず研究材料の取得を加速する目的で、マイコウイルス除去技術の確立を行った。具体的には、抗ウイルス薬を含む複数の核酸アナログを複数のマイコウイルスに処理し、体系的にウイルス脱離への効果を評価した。さらに、マイコウイルスが宿主菌にもたらす影響についてより俯瞰的なデータを得る目的で、特定菌種の多数の株を用いて様々なウイルス保持・非保持のセットを確立し、その影響を網羅解析した。本研究は、表現型の有無によらず公平な視点でマイコウイルスの影響を観察するための研究基盤を構築し、マイコウイルスが一般にどんな存在であるのかを解明する初の“俯瞰的”な報告になると期待される。

実験方法

菌株と培地

本研究で使用した菌株および RNA ウイルスは Table 1 に示した。菌株名が IFM から始まる菌株群はナショナルバイオリソースプロジェクト (<https://nbrp.jp>) を通して千葉大学真菌医学研究センターから提供された。*Penicillium chrysogenum* JCM2056 株は国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料

Table 1 Fungal strains and mycoviruses used in this study.

Host name	Host accession	Virus name	Virus abbreviation	Virus accession	Genome type
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM63439	Aspergillus fumigatus RNA virus 1	AfuRV1	txid2747487	positive-ssRNA
	IFM64916	Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1	AfuBOV1	txid2747486	positive-ssRNA
	IFM62355	Aspergillus fumigatus mitovirus 1	AfuMV1	txid2250451	positive-ssRNA
	IFM63431	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	AfuNV2	txid2250450	positive-ssRNA
	IFM62632	Aspergillus fumigatus polymycovirus 1	AfuPmV1	txid2250469	dsRNA
		Aspergillus fumigatus negative-stranded RNA virus 1	AfuNSRV1	txid2749925	negative-ssRNA
	IFM63147	Aspergillus fumigatus chrysovirus	AfuCV	txid607716	dsRNA
		Aspergillus fumigatus narnavirus 2	AfuNV2	txid2250450	positive-ssRNA
	IFM61469	Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1	AfuBOV1	txid2747486	positive-ssRNA
		Aspergillus fumigatus partitivirus 1	AfuPV1	txid1027415	dsRNA
<i>Aspergillus flavus</i>	Af293	Aspergillus fumigatus polymycovirus 1	AfuPmV1	txid2250469	dsRNA
	IFM 65242	Aspergillus flavus partitivirus1	AfPV1	txid2590841	dsRNA
	IFM 65241	Aspergillus flavus partitivirus1	AfPV1	txid2590841	dsRNA
	IFM 64473	Aspergillus flavus deltaflexivirus1	AfdFV1	txid2871715	positive-ssRNA
	IFM 63847	Aspergillus flavus partitivirus1	AfPV1	txid2590841	dsRNA
		Aspergillus flavus polymycovirus1	AfPmV1	txid2871720	dsRNA
	IFM 63449g	Aspergillus flavus narnavirus1	AfNV1	txid2871717	positive-ssRNA
	IFM 63449w	Aspergillus flavus narnavirus1	AfNV1	txid2871717	positive-ssRNA
	IFM 61879	Aspergillus flavus vivivirus1	AfVV1	txid2871722	positive-ssRNA
	IFM 61226	Aspergillus flavus partitivirus1	AfPV1	txid2590841	dsRNA
IFM 49866	Aspergillus flavus virga-like virus	AfVLV1	txid3030773	positive-ssRNA	
<i>Aspergillus lentulus</i>	IFM 62627	Aspergillus lentulus partitivirus 1	AfPV1	txid2747488	dsRNA
<i>Penicillium chrysogenum</i>	JCM2056	Penicillium chrysogenum virus	PcV	txid158372	dsRNA

開発室 (<https://jcm.brc.riken.jp/en/>) から提供された。各種菌株はポテトデキストロース寒天培地 (PDA; BD, Franklin Lakes, NJ, United States) 上で 37°C (*A. fumigatus*, *A. lentulus*) あるいは 25°C (*A. flavus*, *P. chrysogenum*) で培養し、0.05% Tween20 溶液で胞子を回収した。

ウイルス脱離法

ウイルス脱離法の概要を Fig.1 に示した。各種核酸アナログ試薬、リバビリン (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, United States) は終濃度 0.1mg/mL、7-Deaza-2'-C-Methyladenosine (7d2CMA; Carbosynth Ltd., United Kingdom), 2'-C-Methyladenosine (2CMA; Carbosynth), 2'-C-Methylcytidine (2CMC; Carbosynth) は終濃度 0.2mg/mL になるよう PDA に含め、胞子液を点植菌しコロニー生育させた。溶媒コントロールには、使用量と同量のジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。核酸アナログ試薬添加培地での培養後、胞子を回収し適宜希釈し、YPDA (1%乾燥酵母エキス, 2%ペプトン, 2%グルコース, 1.5%寒天) 培地上で単胞子分離した。単胞子由来のコロニーに対して、ワンステップ RT-PCR

[Super-Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)] でウイルス配列を増幅し、電気泳動によりウイルスの有無を判定した。ワンステップ RT-PCR 反応は以下の条件で行った: 逆転写 (55°C, 20min; 60°C, 10min); PCR 反応 94°C, 2min; (94°C, 15s; 55°C, 30s; 68°C, 1min) x40; 68°C, 5min。

生育, 胞子形成, 気中菌糸

コロニー生育は、PDA 培地, MM 培地 (70mM 硝酸ナトリウム, 1% グルコース, 0.052% 塩化カリウム, 0.052% 硫酸マグネシウム七水和物, 0.152% リン酸水素二カリウム, 0.0022% 硫酸亜鉛七水和物, 0.0011% ホウ酸, 0.0005% 塩化マンガン四水和物, 0.0005% 硫酸鉄七水和物, 0.00016% 塩化コバルト五水和物, 0.00016% 硫酸銅五水和物, 0.00011% モリブデン(VI) 酸アンモニウム四水和物, 0.005% エチレンジアミン四酢酸, pH 6.5), YPDA 培地のプレートの中心に、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個の胞子を点植菌し、25°C, 37°C, 45°C で培養した。いずれの培地でも、37°C は 3 日間, 45°C は 4 日間培養後にコロニー直径を計測した。25°C 培養について、PDA と YPDA

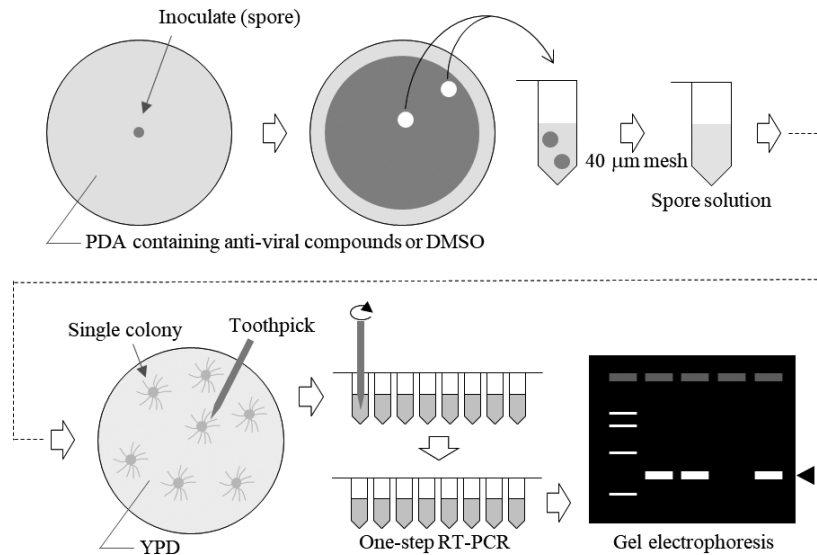


Fig. 1 Schematic workflow of method for virus eliminating and virus detection

Fungi were cultured on nucleoside analog-containing plate media, then spores were spread on YPD plate media to form single colonies. Using toothpicks as described previously (Urayama *et al.*, 2014), viral RNA was amplified by one-step RT-PCR. PCR products were detected by electrophoresis. (Modified from Ikeda *et al.*, 2022)

培地では4日間, MM培地では6日間培養しコロニーの直径を計測した. 培養は3連で行い, サンプル間で Student の t 検定を行い有意差判定した.

初期生育の評価は, レサズリンによる細胞活性の測定により行った. レサズリンは成長細胞の還元力によりレゾルフインに還元され, 溶液は青からピンク色に変化する. この原理を利用し初期生育(発芽から菌糸伸長まで)における細胞活性を測定した. 1×10^8 個/mL の孢子懸濁液 $2 \mu\text{L}$, レサズリンナトリウム (Wako Pure Chemical) $2 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{M}$) と培地 $196 \mu\text{L}$ を 96 ウェルプレートに添加し, プレートリーダーで培養と計測を行った. 培養条件はコロニー直径計測試験, 二次代謝解析に使用した条件と, 「 37°C MM 培地」をベースとしたストレス条件を設けた. その際, 培地由来の色味が強いので, Potato Dextrose Broth (PDB) 培地は 10 倍希釈, YPD (1% 乾燥酵母エキス, 2% ペプトン, 2% グルコース) 培地と SS (5% 醤油, 5% 砂糖) 培地は 40 倍希釈して使用した. 生育進行度の比較は, 培養前と培養後のレサズリンナトリウム (波長 600nm) の吸光度を計測し, その差分で評価した.

A. fumigatus の孢子形成数は, 15mL の PDA 培地に胞

子(終濃度 1×10^4 個/mL)を混合し, 50mL チューブに垂直に培地を入れ固化後に 37°C で 5 日間培養した. 培養は 3 連で行った. チューブに 5mL の 0.05% Tween20 と 0.5mm ガラスビーズを加え 30 秒混合した後 $40 \mu\text{m}$ セルストレナー (Falcon) を通過させて孢子を回収した. 取り残した孢子を回収するため同じ作業を繰り返し, 計 10mL の孢子懸濁液を作製し孢子数をカウントした. *A. flavus* の孢子形成数は, 約 10^3 個の孢子を PDA 上に全面塗布し, 25°C で 4 日間培養した. 培地上に 0.05% Tween20 を 3mL 添加し, コンラージ棒で全面から孢子を回収した. 適宜希釈したのち, 血球計算盤で計数し, 孢子懸濁液原液の濃度を算出した. ウイルス脱離株は 3 つの生物学的反復それぞれにつき 3 回の技術的反復で実施した.

A. flavus の気中菌糸の観察では, PDA 上に孢子を点植菌し 25°C で 4 日間培養した. スパテルで培地ごと菌体を切り出し, スライドガラス上に横たえたサンプルを実体顕微鏡で観察した. 気中菌糸の観察は 3 つの生物学的反復それぞれにつき 3 回技術的反復サンプルを用意し, 代表的な写真を示した.

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には7種類の薬剤を用いた。1×10⁸個/mLの孢子懸濁液を薬剤含有PDA培地の中心に1μL点植菌し、アムホテリシンBのみ72時間培養し、それ以外の薬剤については48時間培養後コロニーの直径を計測した。その際、コントロールとして、薬剤を溶かした溶媒であるDMSOのみを添加した培地でも同様に培養した。得られたコントロールのコロニーの大きさを100%としたときの薬剤含有培地で培養したコロニーの大きさ(%)を比較した。

化合物解析

5mLのYESA培地[2%乾燥酵母エキス, 15%砂糖(日新製糖), 1.5%寒天]上に*A. flavus*の10³個の孢子を全面植菌し、25℃で7日間培養した。培地ごと凍結乾燥したのち、10mLのアセトンを添加し10分間超音波破碎した。そのうち5mLを用いて、遠心エバポレーターでアセトンを揮発させ、1mLのメタノールに再溶解した。C18カラムを通過させ夾雑物を除去し、遠心エバポレーションで濃縮したのち100μLのDMSOに溶解した。抽出産物はPoroshell 120 EC-C18 column (φ3.0mm×100mm, particle size 2.7μm; Agilent Technologies, Inc.)を用いて1260 Infinity LC system (Agilent Technologies, Inc.)で解析した。HPLCの分析は、流速0.8mL/min, 0.5%酢酸含有アセトニトリルが18分間で5-100%になるようグラジエント条件で行った。それぞれ3つの生物学的反復に対して3回の技術的反復で解析を行った。

遺伝子発現解析

化合物分析と同条件で培養し、回収した菌体を液体窒素を用いて凍結破碎したのち、TRIzol (Invitrogen)によりRNAを抽出した。Pure Link RNA mini kit (Invitrogen)で精製後、DNase I処理を行い、ZYMO RNA clean & concentrator 5 (ZYMO RESEARCH)で精製濃縮し、Total RNAを取得した。このTotal RNAを用いてNEBNext poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs), NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Index Primer Set 1) (New England Biolabs)でシーケンスライブラリーを調製した。ライブラリーの品質及び濃度はAgilent 2100 バイオアナライザーで測定し、ペアエンドNGS解析はNovogeneに委託した。リードデータはCLC genomics workbench (QIAGEN)にてトリミング・マッピングを行い、発現量はTPMで評価した。1つの生物学的反復に対して2回の技術的反復でRNA抽出を行い、等量のTotal RNAを混合してライブラリーを作製した。

結果および考察

核酸アナログ処理によるウイルス脱離率の比較

マイコウイルスの影響解析では、遺伝的背景の同一なウイルス保有株およびフリー株のセットを用意する必要がある。そのためには、効率的なウイルス除去の手法が必要となるため、ウイルス感染が認められた複数の*A. fumigatus*株を対象に、近年ウイルス脱離例が報告されている複数の核酸アナログ試薬の効果を比較検証した。まず、抗ウイルス薬として最もよく利用されているリバビリンによるウイルスの脱離率を評価した (Fig.1)。*Aspergillus fumigatus* RNA virus 1 (AfuRV1)が宿主であるIFM 63439株から脱離する頻度は、リバビリン添加時はDMSO処理(コントロール)に対して6倍高かった (Fig.2A)。また、IFM 62632株において*Aspergillus fumigatus* polynucovirus 1 (AfuPmV1)はDMSO処理では全く脱離しなかったのに対し、リバビリン処理では脱離が確認された。その他のウイルスに対しては、DMSO処理とリバビリン処理とは同程度の効果であった。続いて、2CMCを用いて同様の実験を行った (Fig.2B)。2CMC処理ではAfuRV1およびAfuPmV1に加えてIFM 62355株の*Aspergillus fumigatus* mitovirus 1 (AfuMV1)、IFM 63147株の*Aspergillus fumigatus* chrysovirus 1 (AfuCV)もコントロールと比較してウイルスの脱離の頻度が高かった。その他のウイルスに対しては2CMC処理による効果は認められなかった。同様に、7d2CMAおよび2CMAについて検証すると、AfuRV1、AfuPmV1、AfuCVにおいてコントロールより高頻度でウイルスの脱離が起きた (Fig.2C)。特に、dsRNAをゲノムとするAfuPmV1とAfuCVにおいて脱離率が高かったことから、7d2CMAおよび2CMAはdsRNAに対して特異的な効果を示す脱離薬である可能性を考えた。そこで、同様にdsRNAウイルスである*Penicillium chrysogenum* virus (PcV)、*Aspergillus lentulus* partitivirus 1 (AlePV1)、およびAf293株のAfuPmV1、IFM 61469株のAfuPV1に対する7d2CMAおよび2CMAの効果を検証した (Fig.2C)。その結果、コントロールと比較してどのウイルスも高い脱離率を示し、7d2CMAおよび2CMAがdsRNAウイルスに対して幅広く高い脱離効果を示すことが確認できた。これらの比較解析の結果から、ウイルスの脱離の頻度はそのウイルス種と核酸アナログ試薬の組合せに依存していることが明らかになった (Ikeda *et al.*, 2022)。今後のマイコウイルス研究では、ウイルス脱離の際に複数の核酸アナログ試薬処理を検討することでウイルス脱離株の取得がより容易になることが期待できる。

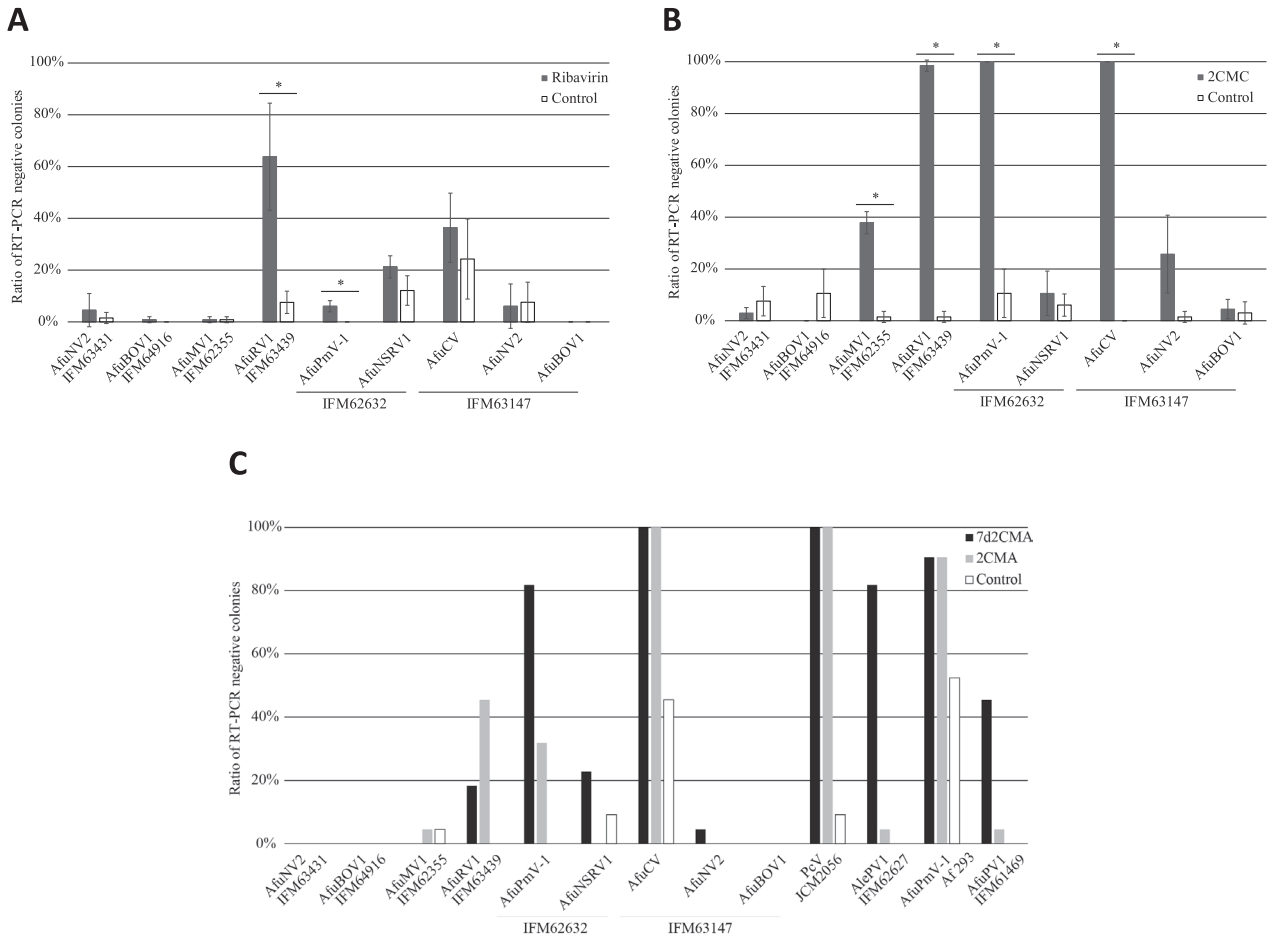


Fig. 2 Ratios of virus-free colonies after treatment by nucleoside analogues
 The treatments were performed by using ribavirin(A), 2CMC(B), 7d2CMA or 2CMA (C). Error bars represent SD and were calculated from three biological replicates. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$; Student's t test). (Modified from Ikeda *et al.*, 2022)

多様な培養条件における宿主生育に対するウイルスの影響

前項の実験から取得したウイルス脱離株と、その親株となるウイルス感染株を対象に、コロニー生育を比較することでマイコウイルスが宿主に与える影響を評価した (Fig.3)。AfuRV1 感染株は、37℃ および 25℃ の MM 培地において、脱離株に比べて早い生育を示した。Aspergillus fumigatus botourmiavirus 1 (AfuBOV1) 感染株は、25℃ の YPDA 培養において生育が遅延した。培地や温度条件が変わることで真逆の影響を示す例も観察された。AfuPmV1 感染株は、PDA および MM 培地で 37℃ で培養した場合、脱離株に比べて生育速度が上

昇したが、YPDA 培地では生育が遅延した。また AfuNV2 感染株は、MM 培地で 25℃ および 45℃ 培養すると生育速度は上昇したが、37℃ で PDA 培地にて培養した場合に生育が遅延した。これらの結果から、マイコウイルスが宿主の生育に対して正負両面の影響を与える場合があり、これらは培養条件に依存してダイナミックに変化しうることが明らかになった。

胞子形成へのウイルスの影響

Aspergillus fumigatus negative-strand RNA virus 1 (AfuNSRV1) の感染株は脱離株に比べて、宿主の胞子

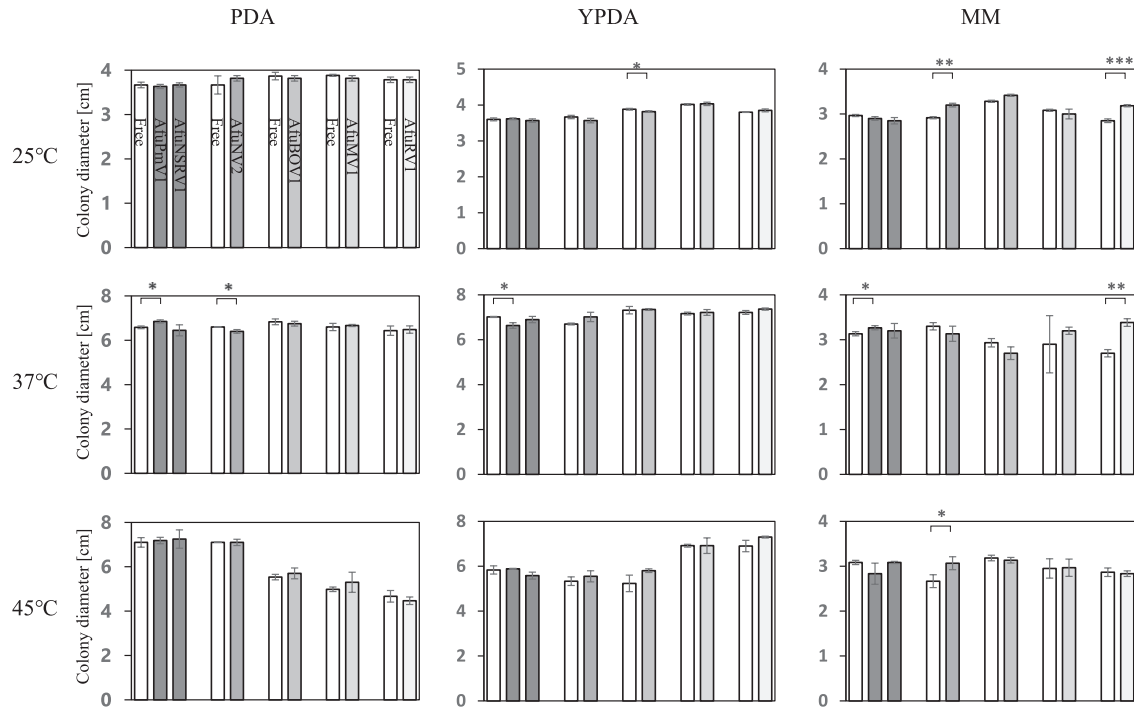


Fig. 3 Comparing the growth rate of virus-free or -infected isolates in various condition

The PDA, MM, and YPD agar media were used. Spore suspension was inoculated in the center of the media with a 1 μ L spot. The cultures were incubated at 25, 37 or 45 $^{\circ}$ C. The colony diameter was measured at 4 days for PDA and YPD media, and at 6 days for MM media. The cultures were performed in triplicate. Error bars indicate SD and were calculated from three biological replicates. Asterisks indicate significant differences (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; Student's t test).

形成数が上昇した (Fig.4A). ここから、マイコウイルス感染が認められた8株の *A. flavus* を対象を広げて解析した (Table 1) (未発表). *Aspergillus flavus virga-like virus 1* (AfVLV1) 感染株 (IFM 49866) は、25 $^{\circ}$ C培養時の孢子形成数が脱離株に比べて1.3倍に上昇したが (Fig.4B), その一方で30 $^{\circ}$ C培養では約2/3に減少した (data not shown). IFM 63847株では, *Aspergillus flavus partitivirus 1* (AfPV1) と *Aspergillus flavus polymycovirus* (AfPmV1) はそれぞれ単独感染では孢子形成に影響を与えないにもかかわらず、同一宿主に二重感染した場合に孢子形成は約1/10まで減少した (Fig.4B). またIFM 63847株では, AfPV1とAfPmV1の二重感染株で気中菌糸が極端に増加し、孢子形成数の低下と関係があると考えられた (Fig.4C). この結果から、宿主に対するマイコウイルスの影響が、培養環境だけでなく、複数のウイルスによる相互作用によって生じる可能性が示唆された.

薬剤感受性へのウイルスの影響

アゾール系抗真菌薬4種類、カンディン系抗真菌薬1種類、ポリエン系抗真菌薬2種類の計7種類の抗真菌薬とグルタリミド系抗生物質のシクロヘキシミドを用いて、*A. fumigatus*のウイルス感染株を対象に薬剤感受性試験を実施した (Table 2). AfuNV2感染した *A. fumigatus* は脱離株に比べて、全てのアゾール系抗真菌薬に対して高い感受性を示した. また, AfuRV1およびAfuBOV1はそれぞれ3剤, 2剤に対する高感受性を誘導した. 逆に, AfuPmV1はイトラコナゾールに対する耐性を誘導した. 一部のウイルスでは, ミカファンギンやアンフォテリシンBに対する感受性にも影響を及ぼした.

*A. fumigatus*のアゾール系抗真菌薬に対する耐性機序は、薬剤標的分子であるCyp51Aのタンパク質内の薬剤結合部位周辺のアミノ酸置換や *cyp51A* 遺伝子の過剰発現などが報告されている (Hagiwara *et al.*, 2016). 本研究では, AfuRV1保持によりポリコナゾールを除いた3

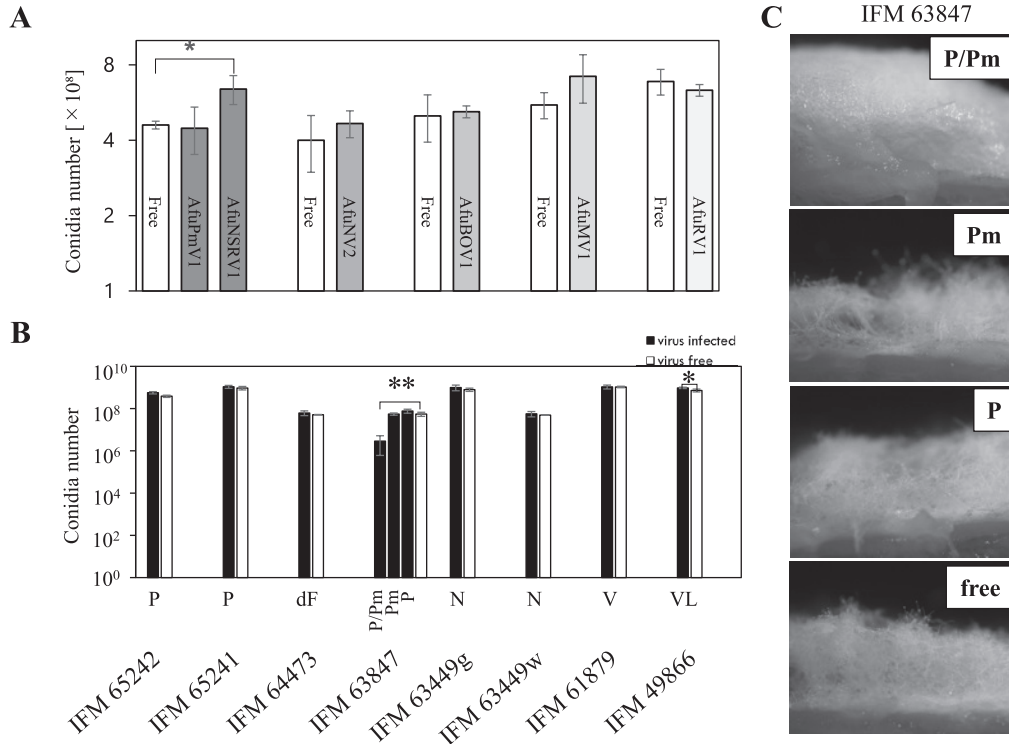


Fig. 4 Conidial formation in virus infected or eliminated isolates

(A) In *A. fumigatus*, number of conidia number per tube was counted after 5 days culture. (B) In *A. flavus*, number of conidia number per plate was counted using 4 day-old-colonies. Error bars indicate SD and were calculated from three biological replicates. Asterisks indicate significant differences (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; Student's t test). P: partitivirus 1, DF: deltaflexivirus 1, Pm: polymycovirus 1, N: narnavirus 1, V: vivivirus 1, and VL: virga-like virus 1. (C) Gross morphology under stereomicroscopy was investigated using 4-day-old colonies. The representative data was shown. (Modified from Kuroki *et al.*, 2023)

Table 2 Alterations in the drug susceptibility of filamentous fungi as a consequence of mycovirus infection.

	Voriconazole	Itraconazole	Tebuconazole	Miconazole	Micafungin	Amphotericin B
AfuRV1		↑	↑ ↑	↑	↓ ↓	
AfuPmV1		↑ ↑				
AfuNSRV1						
AfuNV2	↓ ↓ ↓	↓	↓	↓	↓	↑
AfuBOV1		↓	↓		↑	↓
AfuMV1						

※Accelerated growth due to viral infection: ↑, slowed growth: ↓

※↑: $P < 0.05$, ↑↑: $P < 0.01$, ↑↑↑: $P < 0.001$

種類の薬剤に対して耐性を示す結果が得られ、AfuNV2とAfuBOV1は宿主菌にアゾール系薬剤への感受性を与えた。これらはいずれも、標的分子であるCyp51Aタンパク質の変異による影響ではなく、ウイルス感染によって発現レベルが変動した可能性が挙げられる。また別の可能性として、ウイルス感染により真菌の細胞膜の構造が変化し、薬剤の透過や排出能に影響を及ぼしているかもしれない。今回の結果から、公衆衛生上重要な病原真菌の薬剤耐性に影響を及ぼすマイコウイルスの存在が明らかになった。これまでに臨床的に分離された耐性菌株の中にも、AfuRV1のようなウイルスが関与して薬剤耐性を示す株が含まれている可能性は十分に考えられる。

二次代謝化合物へのマイコウイルスの影響

A. flavus はアフラトキシンやシクロピアゾン酸など多

くのカビ毒を生産することが知られており、それらの生産に対するウイルス感染の影響を解析した。しかし、今回解析対象とした*A. flavus* 菌株において、カビ毒生産に対するウイルスの影響はみられなかった。一方で、HPLCチャート上には、ウイルスの影響を受ける代謝物のピークが多数見られた (Fig.5)。たとえば *Aspergillus flavus delaflexivirus 1* (AfdFV1) 感染株 (IFM 64473) では RT: 8.1min のピークが上昇する一方で、脱離株に比べて、RT: 8.8min のピークは低下した。AfVV1 感染株 (IFM 61879) では複数のピークが同様に増大しており、全体的に二次代謝の活性が上昇していると考えられた。IFM 63847 株では、AfPV1とAfPmV1それぞれの単独感染株では HPLC チャートに大きな変化は見られないが、二重感染株では RT: 1.0min および RT: 6.1min のピークが低下した。

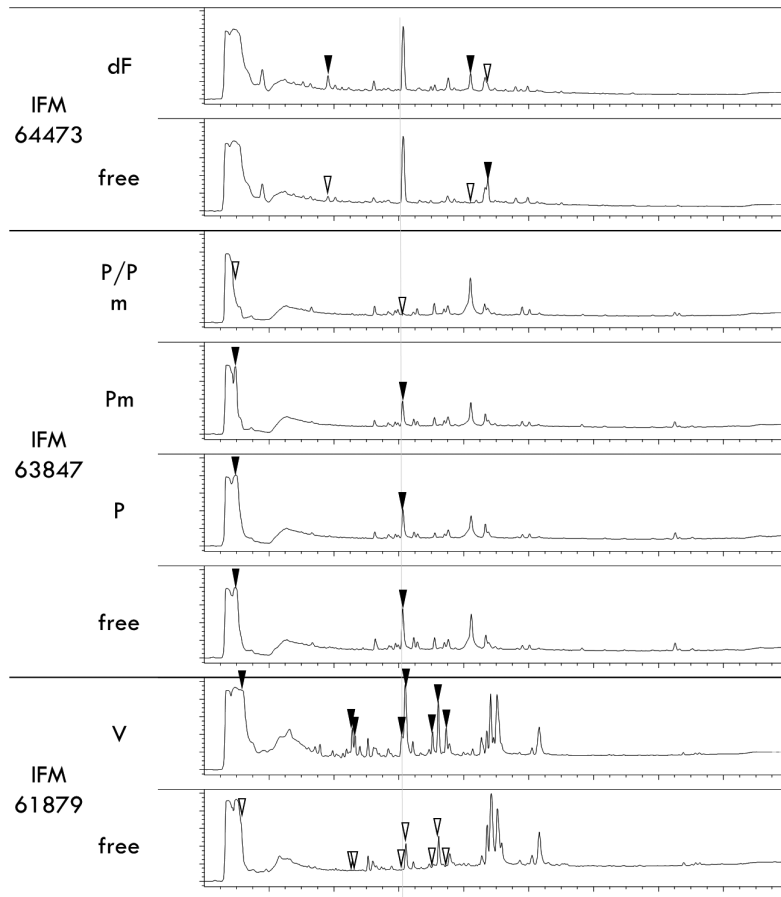


Fig. 5 Secondary metabolite profiles of virus-infected and -free isolates

Culture extracts of virus-infected and -free isolates of three *A. flavus* strains; IFM 64473, IFM 63847, and IFM 61879 were analyzed by HPLC. Arrow heads indicate the peak showing increased (black) or decreased (white) metabolite production between virus-infected and -free isolates. Metabolite production was detected at 214nm. The representative data was shown. (Modified from Kuroki *et al.*, 2023)

AfPV1とAfPmV1の二重感染株は前述のように目視で観察できる表現型を与えていたが, AfdFV1やAfVV1は宿主に対する外観的な影響は見られなかった. すなわち, 生育や形態への影響がない場合でも, 代謝物生産への影響を示すことが明らかになった. したがって, 今後, ウイルス感染を利用して新規二次代謝物の探索を行う場合, 外観的な性状にとらわれずに, 代謝物を直接検証する必要がある.

遺伝子発現へのマイコウイルスの影響

*A. flavus*のウイルス感染株/非感染株を用いたトランスクリプトームの比較解析により, ウイルスに対する宿

主の応答反応を解析した. 各遺伝子の発現レベルの類似性から系統樹を作成すると, 各ウイルス脱離株はその親株である感染株と最も近い発現パターンを示した (Fig.6A). 同種内の異なる株間では, 遺伝的背景の違いから異なる遺伝子発現パターンを示すが, ウイルス感染の有無によりさらに細かいバリエーションを生み出していることが示唆された.

ウイルス感染株/非感染株の間で, 発現が2.5倍以上に上昇あるいは減少した遺伝子 (DEGs) を抽出した. その数は株によって異なり, 100~1000遺伝子が発現変動していた (Fig.6B). 例外として, IFM 63847株において, AfPV1およびAfPmV1単独感染時のDEGsは

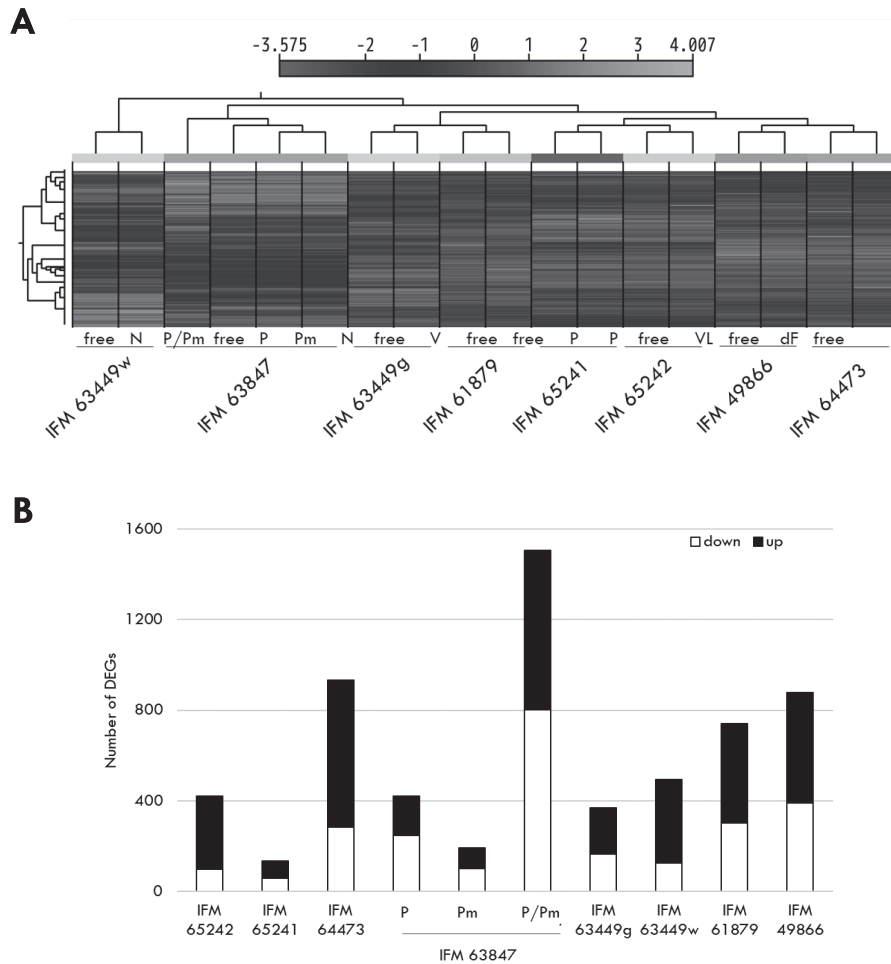


Fig. 6 Comparative transcriptome analysis between virus-infected and -free isolates in *A. flavus*

(A) Heat map of gene expression levels in virus-infected strains and the corresponding virus-free isolates. The heat map was generated according to TPM data for the whole genome. The color bar shows the range of log₂ (TPM) for each gene. A phylogenetic tree presented above the heat map shows the relationships in expression patterns among samples. (B) Number of differentially expressed genes (DEGs) affected by virus infection in each strain. Genes in which TPM was up- or down-regulated >2.5 times by virus infection were regarded as DEGs. (Modified from Kuroki *et al.*, 2023)

それぞれ422個と192個であったが、二重感染株とウイルス脱離株の間では1507個のDEGsが検出された。前述の性状解析や二次代謝産物解析において観察された二重感染株での大規模な表現型変化はこれらの遺伝子発現変動を反映したものと推測できる。つまり、ウイルスの種類や宿主菌株の種類だけでなく、複数のウイルス種が共存することによっても宿主の応答反応が大きく変化すると考えられる。同様のウイルス属をもつ株間でDEGsを比較しても75%以上のDEGsは共通しておらず、それぞれの菌株に特有の宿主応答であることが示された (data not shown)。以上の結果から、マイコウイルスに対する宿主の応答の多くは宿主とウイルスの組合せ特異的に起こったと考えられ、同種ウイルスでも異なる株であれば、宿主に異なる影響を与えることが示唆された。本研究では二次代謝産物の解析を行った条件と同様の条件でのみ遺伝子発現解析を行っており、性状解析を行っていた条件とは培地条件・生育日数ともに異なっている。そのため本遺伝子発現データは性状解析時の状況を反映した結果とは言えないが、それぞれの性状解析と同様の条件での遺伝子発現を解析することで表現型と遺伝子発現情報の関連を紐づけることができると考えられる。

要 約

マイコウイルス研究は宿主の表現型が大きく変わる例に限定されて解析が進められてきた歴史があり、それ以外の潜在的なウイルスについての報告例はほとんどなかった。近年になりウイルス検出技術が発展したことから、それ以外のウイルス感染例にも目が向けられるようになってきた。本研究はマイコウイルスを体系的に評価するべく、生育性状のような目に見える表現型に限らず、より広範にかつ高解像度にウイルスの影響を見ることが狙いにある。今回の結果から、見た目に影響をほとんど与えない潜在的なウイルスであっても、遺伝子発現としては大きな影響を与えていることがわかった。ウイルス感染細胞では多様な応答が起きており、限定的な条件において宿主の表現型が表出する例を示したことが本研究の大きな収穫である。そして、宿主糸状菌の遺伝子発現バリエーションを生み出す存在として、マイコウイルスの新たな価値を見出す足がかりになった。現在、産業利用される糸状菌の機能は、培養条件や薬剤添加などで制御されているが、マイコウイルスを利用することで、新たな遺伝子発現パターンや形質を宿主菌に与える可能性がある。宿主糸状菌の機能強化や制御技術の確立につながることを期待する。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 浦山俊一. 2018. 病気を起こさず宿主と共存するウイルス～生物相互作用の理解にウイルスの視点を～. 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会. (6月26日, 茨城)
- 2) 萩原大祐. 2019. Exploring fungal potential to produce novel compounds toward drug discovery. 第63回日本医真菌学会学術集会. (10月11-12日, 千葉)
- 3) 二宮章洋, 浦山俊一, 周防玲, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐. 2020. トテウイルスによるイネいもち病菌のカビ毒テヌアゾン酸産生誘導. 2020年度日本農芸化学学会大会. (3月26日, 要旨集での発表)
- 4) 二宮章洋, 浦山俊一, 周防玲, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐. 2021. 菌類ウイルスがイネいもち病菌の二次代謝に与える影響の解析. 日本農芸化学学会2021年度仙台大会. (3月18-21日, オンライン)
- 5) 浦山俊一. 2021. 真菌細胞内で“家畜化”されたウイルス. 第94回日本細菌学会総会. (3月23日, オンライン)
- 6) 萩原大祐. 2021. Virus world of fungal world. 第23回酵母合同シンポジウム. (9月2-3日, オンライン)
- 7) 池田彩乃, 千葉悠斗, 浦山俊一, 萩原大祐. 2021. 糸状菌における菌類ウイルスの多面的な影響評価. 日本微生物生態学会. (10月30日-11月2日, オンライン)
- 8) 浦山俊一. 2021. 糸状菌は何のためにRNAウイルスを育むのか?. 糸状菌分子生物学研究会若手の会第9回ワークショップ. (11月10日, オンライン)
- 9) 黒木美沙, 浦山俊一, 矢口貴志, 萩原大祐. 2021. マイコウイルスが*Aspergillus flavus*の表現型に与える影響の普遍性を解明する. 糸状菌分子生物学コンファレンス. (11月11-12日, オンライン)
- 10) 浦山俊一, 池田彩乃, 千葉悠斗, 黒木美沙, 趙彦杰, 萩原大祐. 2021. RNAウイルスと真核微生物の共生的関係を俯瞰する. 日本共生生物学会第5回大会. (11月27-28日, オンライン)
- 11) 黒木美沙, 浦山俊一, 矢口貴志, 萩原大祐. 2022. *A. flavus*のアフラトキシン生産を促進するマイコウイルスの発見. 日本マイコトキシン学会第87回学術講演会. (1月7日, オンライン)
- 12) Kuroki, M., Urayama, S., Yaguchi, T., Hagiwara, D. 2022. Comparing fungal response to mycovirus infection between some strain of *Aspergillus flavus*. V International Mycovirus Symposium. (May 30-June 2, Italy)
- 13) Hagiwara, D. 2022. Virus infection among a fungal world. The 19th young Scientist Seminar. (November 26-27, Online)
- 14) 浦山俊一. 2023. 真菌を操るウイルスのポテンシャルを俯瞰する. 日本マイコトキシン学会第88回学術講演会. (1月6日, 茨城)
- 15) 浦山俊一. 2023. 生物を変身させる秘密道具としてのウイルス. 微生物コンソーシアムG3定例会 (大隅基礎科学創成財団). (2月15日, オンライン)

原著論文

- 1) Ninomiya, A, Urayama, S, Suo, R, Itoi, S, Fuji, S, Moriyama, H, & Hagiwara, D. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* **11**: 1641.

- 2) Ikeda, A., Chiba, Y., Kuroki, M., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2022. Efficient elimination of RNA mycoviruses in *Aspergillus* species using RdRp-inhibitors ribavirin and 2'-C-methylribonucleoside derivatives. *Front. Microbiol.* **13**: 1-9.
- 3) Kuroki, M., Yaguchi, T., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2023. Experimental verification of strain-dependent relationship between mycovirus and its fungal host. *iScience.* **8**: 107337.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 浦山俊一. 2020. 天然のウイルスを使った微生物の“調和的”な活性化. *生物工学会誌.* **98**: 680.
- 2) Urayama, S., Takaki, Y., Chiba, Y., Zhao, Y., Kuroki, M., Hagiwara, D., Nunoura, T. 2022. Eukaryotic microbial RNA viruses—Acute or persistent? Insights into their function in the aquatic ecosystem. *Microb. Environ.* **37**: ME22034.
- 3) 浦山俊一, 黒木美沙, 二宮章洋, 萩原大祐. 2023. 真菌を操るマイコウイルスのポテンシャル—二次代謝を中心に—. *マイコトキシン.* **73**, 25-28.

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筑波大学糸状菌相互応答講座の学生・構成員諸氏に感謝の意を表します。また、JSPS 科研費スタート支援 (黒木美沙 21K20567)、挑戦的研究 (開拓) (萩原大祐 20K20377)、新学術領域研究 (研究領域提案型) (浦山俊一 20H05579, 22H04879) の支援にも感謝いたします。

文 献

Applen Clancey, S., Ruchti, F., LeibundGut-Landmann, S., Heitman, J., & Ianiri, G. 2020. A novel mycovirus evokes transcriptional rewiring in the fungus *Malassezia* and stimulates beta interferon production in macrophages. *mBio* **11**: e01534-20.

Córdoba, L., Ruiz-Padilla, A., Rodríguez-Romero, J., & Ayllón, M. A. 2022. Construction and Characterization of a Botrytis Virus F Infectious Clone. *J. Fungi* **8**: 459.

García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. 2019. Mycoviruses in biological control: From basic research to field implementation. *Phytopathol.* **109**: 1828-1839.

Guo, J., Zhou, X., Xie, F., Cao, J., Liu, S., Zhong, J., & Zhu, H. 2022. Hypovirulence caused by mycovirus in *Colletotrichum fructicola*. *Front. Plant Sci.* **13**: 1038781.

Hagiwara, D., Watanabe, A., Kamei, K., & Goldman, G.H. 2016. Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi. *Front. Microbiol.* **7**: 1382.

Heiniger, U., & Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. phytopathol.* **32**: 581-599.

Herrero, N., & Zabalgozeazcoa, I. 2011. Mycoviruses infecting the endophytic and entomopathogenic fungus *Tolyposcladium*

cylindrosporium. *Virus Res.* **160**: 409-413.

Hillary, L. S., Adriaenssens, E. M., Jones, D. L., & McDonald, J. E. 2022. RNA-viromics reveals diverse communities of soil RNA viruses with the potential to affect grassland ecosystems across multiple trophic levels. *ISME commun.* **2**: 34.

Ikeda A., Chiba Y., Kuroki M., Urayama S. & Hagiwara D. 2022. Efficient elimination of RNA mycoviruses in *Aspergillus* species using RdRp-inhibitors ribavirin and 2'-C-methylribonucleoside derivatives. *Front. Microbiol.* **13**: 1-9.

Kashif, M., Jurvansuu, J., Vainio, E. J., & Hantula, J. 2019. Alphapartitiviruses of Heterobasidion wood decay fungi affect each other's transmission and host growth. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**: 64.

Kinsella, C. M., Deijs, M., Gittelbauer, H. M., van der Hoek, L., & van Dijk, K. 2022. Human clinical isolates of pathogenic fungi are host to diverse mycoviruses. *Microbiol. Spectr.* **10**: e01610-22.

Komatsu, A., Kondo, H., Sato, M., Kurahashi, A., Nishibori, K., Suzuki, N., & Fujimori, F. 2019. Isolation and characterization of a novel mycovirus infecting an edible mushroom, *Grifola frondosa*. *Mycoscience* **60**: 211-220.

Kuroki, M., Yaguchi, T., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2023. Experimental verification of strain-dependent relationship between mycovirus and its fungal host. *iScience.* **8**: 107337.

Villan Larios, D. C., Diaz Reyes, B. M., Pirovani, C. P. *et al.* 2023. Exploring the Mycovirus Universe: Identification, Diversity, and Biotechnological Applications. *J. Fungi* **9**: 361.

Lee, K. M., Cho, W. K., Yu, J. *et al.* 2014. A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *PLoS one* **9**: e100989.

Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, S., Zhang, L., Ahmed, I., & Guo, L. 2019. Mycoviruses in *Fusarium* species: An update. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**: 257.

Liu, H., Wang, H., Liao, X. L. *et al.* 2022. Mycoviral gene integration converts a plant pathogenic fungus into a biocontrol agent. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **119**: e2214096119.

Milgroom, M. G., & Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 311-338.

Nerva, L., Chitarra, W., Siciliano, I. *et al.* 2019. Mycoviruses mediate mycotoxin regulation in *Aspergillus ochraceus*. *Env. Microbiol.* **21**: 1957-1968.

Ning, S., Kang, Q., Liu, H. *et al.* 2022. Interspecific spread of dsRNA mycoviruses in entomogenous fungi *Beauveria* spp. *Virus Res.* **322**: 198933.

Ninomiya, A., Urayama, S. I., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S. I., Moriyama, H., & Hagiwara, D. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* **11**: 1641.

Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., ... & Liu, D. 2018. Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Sci. Rep.* **8**: 5513.

Nuskern, L., Tkalec, M., Srezović, B., Ježić, M., Gačar, M., & Čurković-Perica, M. 2021. Laccase activity in fungus *Cryphonectria parasitica* is affected by growth conditions and fungal-viral genotypic interactions. *J. Fungi* **7**: 958.

- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 632-642.
- Okada, R., Ichinose, S., Takeshita, K. *et al.* 2018. Molecular characterization of a novel mycovirus in *Alternaria alternata* manifesting two-sided effects: Down-regulation of host growth and up-regulation of host plant pathogenicity. *Virology* **519**: 23-32.
- Olivé, M., & Campo, S. 2021. The dsRNA mycovirus ChNRV1 causes mild hypervirulence in the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Arch. Microbiol.* **203**: 241-249.
- Özkan, S., & Coutts, R. H. 2015. *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. *Fungal Genet. Biol.* **76**: 20-26.
- Song, H. Y., Kim, N., Kim, D. H., & Kim, J. M. 2020. The PoV mycovirus affects extracellular enzyme expression and fruiting body yield in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Sci. Rep.* **10**: 1-10.
- Starr, E. P., Nuccio, E. E., Pett-Ridge, J., Banfield, J. F., & Firestone, M. K. 2019. Metatranscriptomic reconstruction reveals RNA viruses with the potential to shape carbon cycling in soil. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **116**: 25900-25908.
- Sutela, S., Poimala, A., & Vainio, E. J. 2019. Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **95**: fiz119.
- Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M. *et al.* 2020a. Phenotypic and molecular biological analysis of polymycovirus AfuPmV-1M from *Aspergillus fumigatus*: Reduced fungal virulence in a mouse infection model. *Front. Microbiol.* **11**: 607795.
- Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M. *et al.* 2020b. Analysis of an intrinsic mycovirus associated with reduced virulence of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **10**: 3045.
- Urayama, S., Katoh, Y., Fukuhara, T., Atie, T., Moriyama, H., & Teraoka, T. 2014. Rapid detection of Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-a from fungal colonies on agar plates and lesions of rice blast. *J. Ge. Plant Pathol.* **81**: 97-102.
- Wang, L., He, H., Wang, S., Chen, X., Qiu, D., Kondo, H., & Guo, L. 2018. Evidence for a novel negative-stranded RNA mycovirus isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* **518**: 232-240.
- Wang, S., Yang, Z., Zhang, T. *et al.* 2019. Molecular characterization of a chrysovirus isolated from the citrus pathogen *Penicillium crustosum* and related fungicide resistance analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**: 156.
- Zhang, Y., Liang, X., Zhao, M. *et al.* 2022. A novel ambigrammatic mycovirus, PsV5, works hand in glove with wheat stripe rust fungus to facilitate infection. *Plant Commun.* **4**: 100505.
- 鈴木信弘. (2014). マイコウイルス宿主としてのクリ胴枯病菌～知られざるマイコウイルスの世界を紐解く新たな解析ツール～. *ウイルス*, **64**: 11-24.

略語一覧

- AfdFV1: *Aspergillus flavus* deltaflexivirus1
 AfNV1: *Aspergillus flavus* narnavirus1
 AfPmV1: *Aspergillus flavus* polymycovirus1
 AfPV1: *Aspergillus flavus* partitivirus1
 AfuBOV1: *Aspergillus fumigatus* botourmiavirus 1
 AfuCV: *Aspergillus fumigatus* chrysovirus
 AfuMV1: *Aspergillus fumigatus* mitovirus 1
 AfuNSRV1: *Aspergillus fumigatus* negative-stranded RNA virus 1
 AfuNV2: *Aspergillus fumigatus* narnavirus 2
 AfuPmV1: *Aspergillus fumigatus* polymycovirus 1
 AfuPV1: *Aspergillus fumigatus* partitivirus 1
 AfuRV1: *Aspergillus fumigatus* RNA virus 1
 AfVLV1: *Aspergillus flavus* virga-like virus
 AfVV1: *Aspergillus flavus* vivivirus1
 AIPV1: *Aspergillus lentulus* partitivirus 1
 AmpB: Amphotericin B
 2CMA: 2'-C-Methyladenosine
 2CMC: 2'-C-Methylcytidine
 7d2CMA: 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine
 DEGs: Differentially expressed genes
 HPLC: high performance liquid chromatography
 ICZ: itraconazole
 MCFG: micafungin
 MM: minimal medium
 NGS: next generation sequencing
 PcV: *Penicillium chrysogenum* virus
 PDA: potato dextrose agar medium
 RT: retention time
 RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
 TCZ: tebuconazole
 TPM: transcripts per million
 VCZ: voriconazole
 YESA: yeast extract sucrose agar medium

マイコウイルスによる糸状菌二次代謝の誘導

浦山 俊一, 萩原 大祐

筑波大学生命環境系糸状菌相互応答講座

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

Mycovirus-induced fungal secondary metabolism

Syun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577

Fungi produce various secondary metabolites, and thus are exploited as a source of useful compounds. Studies of fungal genomes have revealed that fungi have the potential to produce more secondary metabolites than expected, as they have a large number of genes for secondary metabolism. To date, some knowledge on control of fungal secondary metabolite production by mycoviruses has accumulated. In this study, we evaluated the influence of mycoviruses on fungal secondary metabolism using a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* that is infected with three types of mycoviruses: a totivirus, a chrysovirus, and a partitivirus. As a result, it was revealed that a mycotoxin tenuazonic acid was produced in a manner dependent on the totivirus infection. Transcriptome analysis revealed the regulatory mechanism under viral induction of tenuazonic acid: the totivirus activates the transcription factor gene *TAS2* that upregulates the tenuazonic acid biosynthetic gene *TAS1*. To the best of our knowledge, this is the first report that confirmed mycovirus-associated regulation of secondary metabolism at a transcriptional level. Our finding highlights the potential of mycoviruses as an epigenomic factor activating fungal secondary metabolism.

Key words: secondary metabolism, mycovirus, rice blast fungus

緒 言

糸状菌は多様な生物活性物質を産生することから、長年にわたって新規有用物質の探索源として利用されてきた。近年、糸状菌のゲノム中には、既知の二次代謝産物の数を遥かに越える二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが含まれるが、その多くは研究室の培養条件では発現しないことが明らかになった。このように休眠状態にある遺伝子（休眠遺伝子）を発現させることができれば新規物質を得ることができると期待されるため、培養条件の最適化、薬剤の添加、遺伝子の異種発現、および共

培養等、休眠遺伝子を覚醒させる様々な手法が考案されてきた。しかしながら、あらゆる休眠遺伝子に適用可能な手法は存在しないため、新たな手法を拡充することが望まれる。また、糸状菌が産生する有用物質を我々が利用する一方で、糸状菌の二次代謝産物は我々に害を与え得る。例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 糸状菌が産生するアフラトキシンやオクラトキシンは穀物を毒化させ、肺アスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus fumigatus* が産生するグリオトキシンは感染に深く関与する。従って、「有用な二次代謝の促進」と「有害な二次代謝の抑制」を目的とした、糸状菌二次代謝の制御技術が、我々の健康増進のために必要であると言える。

糸状菌にはマイコウイルスと呼ばれるウイルスが感染する。マイコウイルスは植物病原糸状菌の病原力を低下させ得ることから生物防除剤として期待されており、このような背景から、特に植物病原菌に感染するマイコウイルスの機能解析が進んでいる。マイコウイルスは宿主の有性生殖、菌糸の成長、およびコロニーの形態等、様々

E-mail: hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp

共同研究者：二宮 章洋（筑波大学生命環境系、現 東京大学農学部）。

周防 玲（日本大学生物資源科学部）。

糸井 史朗（日本大学生物資源科学部）。

藤 晋一（秋田県立大学生物生産科学科）

森山 裕充（東京農工大学大学院農学研究院）

な形質に影響を与え得ることが明らかになっている。マイコウイルスが糸状菌二次代謝に与える影響は、特にマイコトキシン産生に関していくつかの報告がある。初期の研究では、*Aspergillus flavus* のアフラトキシン産生がマイコウイルスによって抑制されるとの報告があり (Schmidt *et al.*, 1986), *Fusarium graminearum* によるトリコセシン産生がRNAウイルスによって抑制されるという報告がこれに続いた (Chu *et al.*, 2002)。これに対して、クライソウイルスによる *Alternaria alternata* の毒素産生促進 (Okada *et al.*, 2018), パルティティウイルスによる *Aspergillus ochraceus* のオクラトキシン産生促進 (Nerva *et al.*, 2019) など、マイコウイルスが物質産生を促進する例もある。このオクラトキシン産生促進の例では、Nerva *et al.* (2019) はどのようなわけかオクラトキシンの生合成遺伝子が用いた株のゲノム中に見つからなかったと報告しており、従って、ウイルスによる物質産生制御のメカニズムは不明である。これまでのところ、ウイルスが物質産生に影響を与えるとの報告は散見されるが、その制御メカニズムはほとんど理解されていない。

このような背景をもとに、本研究では、ウイルスによる二次代謝制御のメカニズムについて知見を得ることを目的とした。本研究ではイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* APU10-199A 株を研究対象として用いた。当該株はトティウイルス、クライソウイルス、パルティティウイルスという3種類のウイルスに感染した株である (Higashiura *et al.*, 2019)。これら3種のウイルスは糸状菌に広く分布するが、宿主の二次代謝に与える影響は、先述の例を除いて理解が進んでいない。本研究で我々は、トティウイルスがイネいもち病菌のマイコトキシン、テヌアゾン産の産生を促進することを明らかにした。さらに、トティウイルスがテヌアゾン酸の生合成遺伝子を調節することを示す結果を得たので、併せて報告する。本研究は、ウイルスが宿主の二次代謝を転写レベルで制御することを世界で初めて示すものであり、マイコウイルスを糸状菌の二次代謝を制御する因子として利用できることを示唆している。

実験方法

微生物株と培養条件

M. oryzae APU10-199A 株は、先行研究で秋田県にて「あきたこまち」の病斑から分離されたものを用いた (Higashiura *et al.*, 2019)。当該株はトティウイルス、クライソウイルス、およびパルティティウイルスに感染している。これら3種のウイルスのうちトティウイルスとクライソウイルスを欠いた株を単分子分離によって単離した (以下 APU10-199A_P と呼ぶ)。APU10-199A 株

に3種のウイルス、APU10-199A_P 株にパルティティウイルスが感染していることは、先行研究において逆転写PCRによって確認した (Higashiura *et al.*, 2019)。*M. oryzae* はポテトデキストロース寒天培地 (PDA; BD, Franklin Lakes, NJ, United States) 上で生育させ、菌糸を寒天培地ごと切り出して液体培地に植菌した。液体培養にはポテトデキストロース培地 (PDB; BD, Franklin Lakes, NJ, United States), 醤油白砂糖培地 (SS; 5% 醤油と5% スクロースを水道水に溶解) (Nukina, 1999), または IPN 培地 (20% 野菜ジュース; 野菜一日これ一本, カゴメ, 愛知, 日本; 0.3% 炭酸カルシウム) を用いた。

二次代謝プロファイルの分析

いもち病菌を PDB, SS, および IPN 培地を用いて、40rpm で振盪しながら 25°C で2週間、もしくは150rpm で振盪しながら 25°C で5日間培養した。ミラクロス (Merck Millipore, Burlington, MA, United States) を用いて培養液を濾過した後、濾液を等量の酢酸エチルで抽出し、抽出液の溶媒を留去した。抽出物をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、1260 Infinity LC system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, United States) と Poroshell 120 EC-C18 カラム (ϕ 3.0mm \times 100mm, particle size 2.7 μ m; Agilent) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分析した。移動相の初期条件は0.5% 酢酸を含む5% アセトニトリルで、18分かけてアセトニトリルの濃度を100%まで上昇させるグラジエント溶出をおこなった。

テヌアゾン酸の単離

トティウイルスに感染した *M. oryzae* を1.2LのSS培地を用いて150rpm で振盪しながら25°C で5-7日間培養した。培養上清を酢酸エチルで抽出した後、ODS フラッシュクロマトグラフィーによって抽出物を分画し、0, 20, 40, 60, および100% メタノール画分を得た。この20%と40%メタノール画分を、先述したHPLCシステムとCOSMOSIL 5C18-AR-II カラム (ϕ 10mm \times 250mm; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて精製し、6.0mgのテヌアゾン酸を得た。移動相は0.5%の酢酸を含む32%アセトニトリルであった。

核磁気共鳴と高分解能質量分析

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは500-MHz ECA500 NMR spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。¹Hと¹³Cの化学シフトはCD₃ODの溶媒ピーク (それぞれ δ_{H} 3.30と δ_{C} 49.0) を基準とした。高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析 (HRESIMS) はUPLC-SYNAPT G2 HDMS (Waters, Milford, MA,

United States) を用いた。

定量的逆転写 PCR

M. oryzae APU10-199A と APU10-199A_P を SS 培地を用いて 150rpm で振盪しながら 25℃ で 7 日間培養した。乳鉢と乳棒を用いて菌糸を破碎し、TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) を用いて RNA を抽出した後、PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher) を用いて精製した。得られた RNA を DNase I (Thermo Fisher) で処理した後、さらに RNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, United States) を用いて精製した。そして、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) を用いて定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) をおこなった。遺伝子の発現量は β -チューブリン遺伝子の発現量に対する相対値として算出した。

マイコウイルス再感染

マイコウイルスの感染実験はウイルスのドナーとして APU10-199A、レシピエントとして APU10-199A_P を用い、先行研究にならって (Yaegashi *et al.*, 2011) 菌糸融合により実施した。先行研究にならって (Higashiura *et al.*, 2019) APU10-199A_P 株にハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) を導入した。ドナーとレシピエント株を PDA 上に互いに 1cm 離して植菌し、25℃ で 14 日間培養した。そして、2 つのコロニーが接する部分から菌糸を切り出し、ハイグロマイシン B (200 μ g/mL) を含む PDA に植菌した。さらに 3 回、ハイグロマイシン含有培地にコロニーを植え継いだ。得られたハイグロマイシン耐性株について、逆転写 PCR (RT-PCR) によってウイルス感染の有無を確認した。

RNA-シーケンシング解析

M. oryzae の各株を SS 培地を用いて 150rpm で振盪しながら 25℃ で 5 日間培養した。先述の方法で RNA を抽出し、精製した。Novogene (Beijing, China) にライブラリ調製とシーケンシングを委託した。CLC Genomics Workbench (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてリードを *M. oryzae* 70-15 のゲノム配列 (GCA_000002495.2) にマッピングし、transcripts per million (TPM) を算出した。

結 果

マイコウイルスがテヌアゾン酸産生に与える影響

まず、三重感染株 APU10-199A と パルティティ感染株 APU10-199A_P の二次代謝プロファイルと比較した。一般的に糸状菌の二次代謝は培養条件によって影響を受け

ると言われているため、*M. oryzae* を 3 種の培地 (SS, PDB, IPN) で、2 つの異なる速度で振盪培養 (40rpm と 150rpm) した。各条件について三重感染株とパルティティ感染株の二次代謝プロファイルと比較した結果、40rpm の振盪速度で培養した時に、パルティティ感染株は産生するが三重感染株はほとんど産生しない化合物 (Fig.1 中の矢印) を認めた。一方、SS 培地を用いて振盪速度 150rpm で培養した時、パルティティ感染株は産生しないが三重感染株は著量産生する化合物 (1) を発見した。マイコウイルスが化合物 1 の産生に影響を与えることが示唆されたため、化合物 1 に着目することとした。

化合物 1 を同定するため、APU10-199A 株を 1.2L の SS 培地で培養し、培養上清から 6.0mg の化合物 1 を得た。化合物 1 の分子式を HRESIMS によって $C_{10}H_{15}NO_3$ と決定し、NMR データを基に、テヌアゾン酸と同定した (Fig. 2A)。化合物 1 の NMR スペクトルはテヌアゾン酸のものとよい一致を示し (Nolte *et al.*, 1980)、化合物 1 とテヌアゾン標品の逆相 HPLC における保持時間は一致した (Fig. 2B)。テヌアゾン酸は過去にアルタナリア属 (*Alternaria*) やマグナポルテ属 (*Magnaporthe*) の糸状菌から報告されているマイコトキシンである (Rosett *et al.*, 1957)。テヌアゾン酸は哺乳類細胞においてペプチド結合形成を阻害することでタンパク質合成を阻害することが報告されている (Carrasco & Vazquez, 1973)。

マイコウイルスがテヌアゾン酸生合成遺伝子とその調節遺伝子に与える影響

テヌアゾン酸は、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) とポリケチド合成酵素 (PKS) のハイブリッド酵素であるテヌアゾン酸合成酵素 TAS1 によって生合成される (Yun *et al.*, 2015)。TAS1 遺伝子の発現は $Zn(II)_2$ -Cys₆ 型転写因子である TAS2 によって正に制御される (Yun *et al.*, 2017)。マイコウイルスが TAS1 と TAS2 の転写に与える影響を調べるために、三重感染株 APU10-199A とパルティティ感染株 APU10-199A_P におけるこれらの遺伝子の発現量を qRT-PCR によって定量した。その結果、TAS2 の発現量はパルティティ感染株よりも三重感染株において 2 倍以上の高い値を示し、TAS1 は 100 倍以上の高い発現量であった (Fig. 3)。このデータは、マイコウイルスが転写因子 TAS2 を正に制御することによって TAS1 の発現量を増幅し、テヌアゾン酸産生を誘導することを示唆するものである。Yun *et al.* (2015) は *M. oryzae* の培地に 1% DMSO を添加することによってテヌアゾン酸産生を誘導したと報告しているが、我々の培養条件では、DMSO 添加はテヌアゾン酸の産生を誘導せず、また、TAS1 あるいは TAS2 を活性化することもなかった (Fig. 3)。

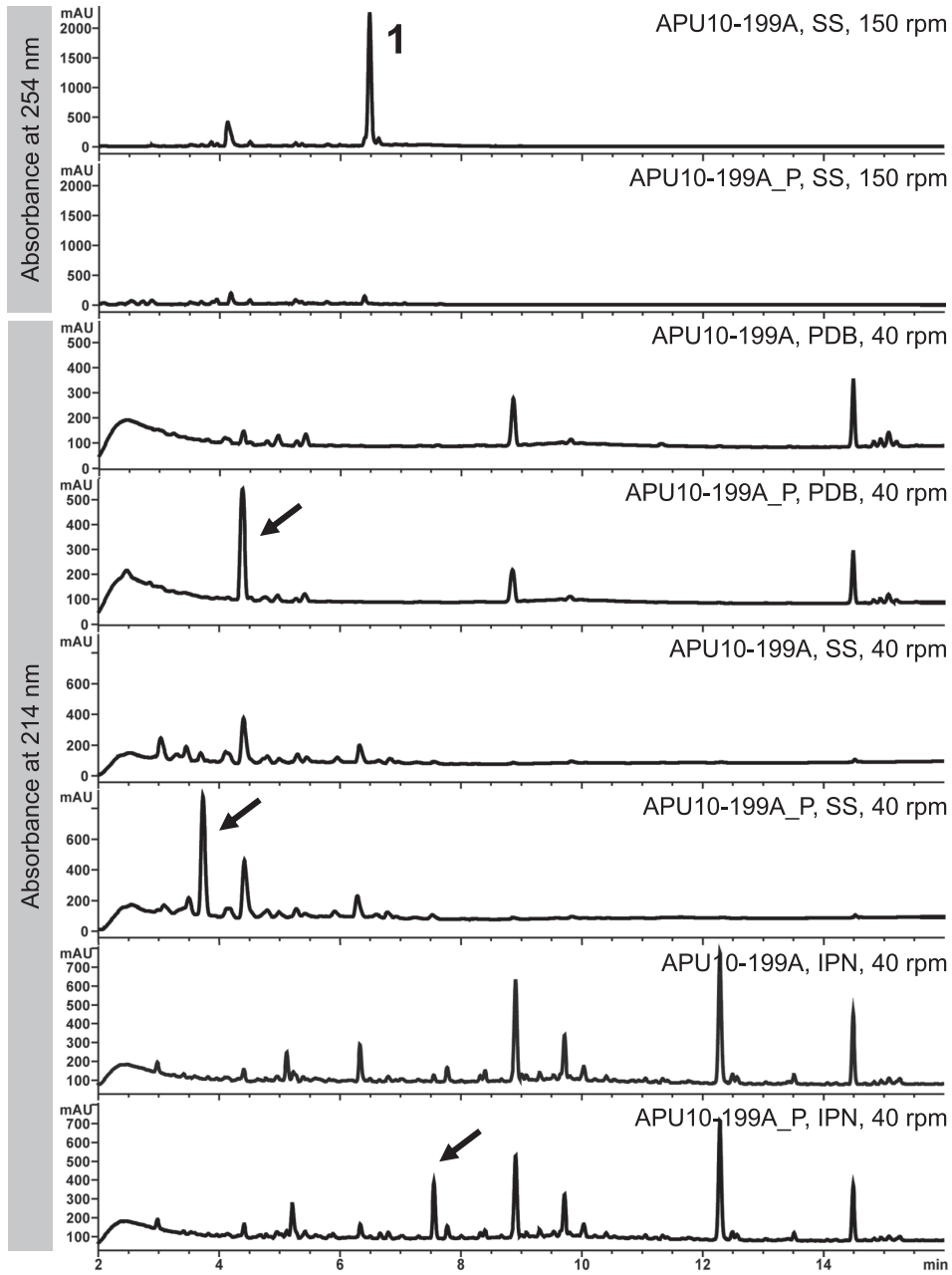


Fig.1 Secondary metabolite profiles of APU10-199A and APU10-199A_P

The strains were cultured in soy sauce-sucrose medium (SS), potato dextrose broth (PDB), and IPN medium. The culture extracts were analyzed by HPLC. This data shows a representative profile from three independent cultures. This figure is adapted from Ninomiya *et al.* 2020.

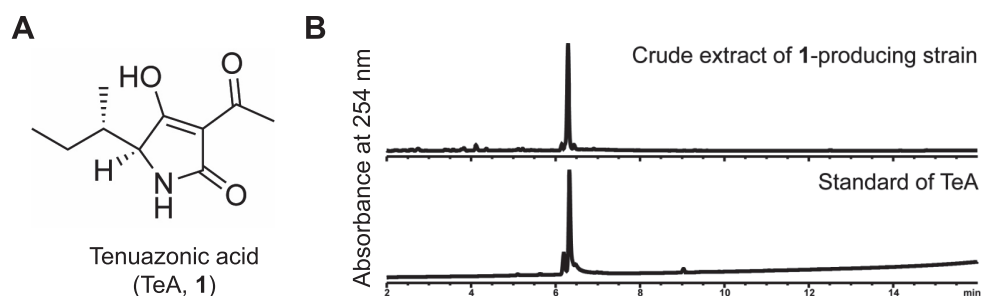


Fig. 2 Chemical structure and production of tenuazonic acid
 (A) Chemical structure of tenuazonic acid (TeA). (B) HPLC chart of the extract of TeA producing strain and TeA standard. This figure is adapted from Ninomiya *et al.* 2020.

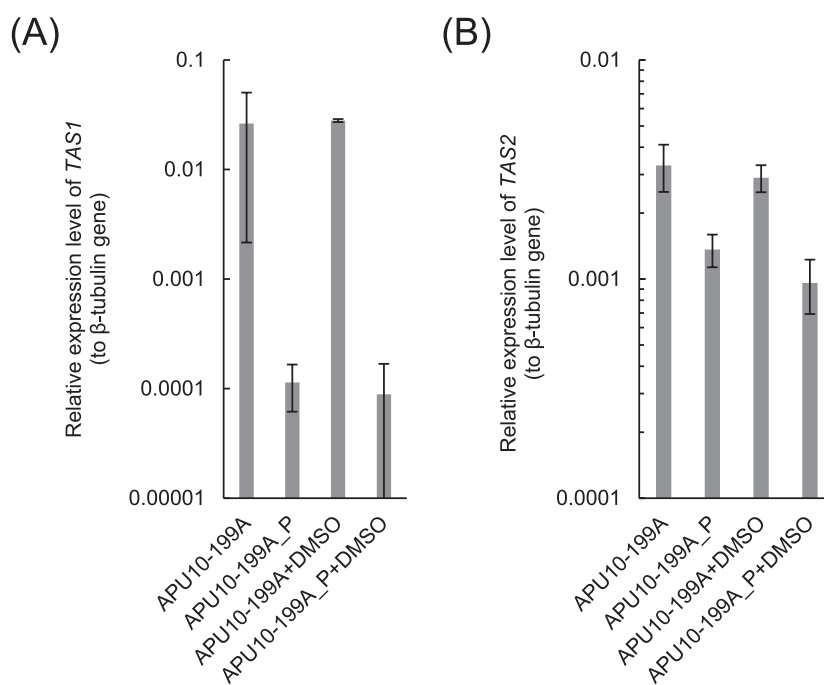


Fig. 3 Expression levels of *TAS1* and *TAS2* in APU10-199A and APU10-199A_P
 The strains were cultured in soy sauce-sucrose medium, and the expression levels of (A) *TAS1* and (B) *TAS2* were determined by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). This experiment was performed on three independent biological replicates each containing three technical replicates. Error bars represent the standard deviation. This figure is adapted from Ninomiya *et al.* 2020.

テヌアゾン酸産生を誘導するマイコウイルスの同定

パルティティ感染株 APU10-199A_P は、三重感染株 APU10-199A と比べてトティウイルスとクライソウイルスを欠いている。テヌアゾン酸産生に影響を与えるのがどのウイルスであるのかを明らかにするために、我々は以下に示す再感染実験をおこなった。パルティティ感染株に選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を導入し、得られたハイグロマイシン耐性パルティティ感染株と三重感染株の菌糸融合によってパルティティ感染株にウイルスを再感染させた。その結果、6つの再感染株 (RI株), RI-1-60, RI-4-49, RI-4-51, RI-4-53, RI-4-59, および RI-4-61 を得た。RI株のウイルス感染プロファイルは RT-PCR (Fig.4) とウイルス由来二本鎖 RNA (dsRNA) の電気泳動によって確認した。RI-4-49 と RI-4-53 は3つのウイルスに感染しており、テヌアゾン酸を産生したことから、ハイグロマイシン耐性遺伝子と再感染の操作はテヌアゾン酸産生に影響を与えないことが示された。RI-4-51 と RI-4-59 はトティウイルスとパルティティウイルスに感染しており、テヌアゾン酸を産生したことから、クライソウイルスもテヌアゾン酸産生に影響を与えないことが示唆された。RI-4-61 株はクライソウイルスとパルティティウイルスに感染しており、テヌアゾン酸を産生しなかったことから、テヌアゾン酸産生はトティウイルス依存的であると結論付けた。

マイコウイルスが二次代謝産物の生合成遺伝子の発現に与える影響

マイコウイルスが *M. oryzae* の二次代謝に与える影響を包括的に理解するため、三重感染株 APU10-199A, パルティティ感染株 APU10-199A_P, 再感染株 RI-4-49, および RI-4-51 について、RNA シーケンシング解析をおこなった。RI-4-49 はトティウイルスとクライソウイルスに再感染しており (パルティティウイルスと合わせて三重感染となる), RI-4-51 はトティウイルスのみに再感染 (同様に二重感染となる) している。まず、antiSMASH (Blin *et al.*, 2019) を用いて、*M. oryzae* のゲノム配列から二次代謝産物の骨格形成を担う遺伝子 (以下コア遺伝

子と呼ぶ) を探索した。その結果、7つのテルペン合成酵素, 16の NRPS, 21の PKS, および7つの PKS-NRPS ハイブリッドがコードされていることがわかった。次に、RNA シーケンシング解析によって遺伝子の発現量を決定した。三重感染株 APU10-199A とパルティティ感染株 APU10-199A_P について、51のコア遺伝子の発現量を比較し、発現量の比が >10 あるいは <0.1 であり、なおかついずれかにおいて TPM 値が全遺伝子の TPM 平均値の 1/10 を超えるものを探索した。その結果、三重感染株とパルティティ感染株で3つのコア遺伝子 (*TAS1*, *MGG_10671*, *MGG_14767*) の発現量に差があることを明らかにした (Table 1)。テヌアゾン酸生合成遺伝子 *TAS1* は三重感染株で、発現量が高かった。また、再感

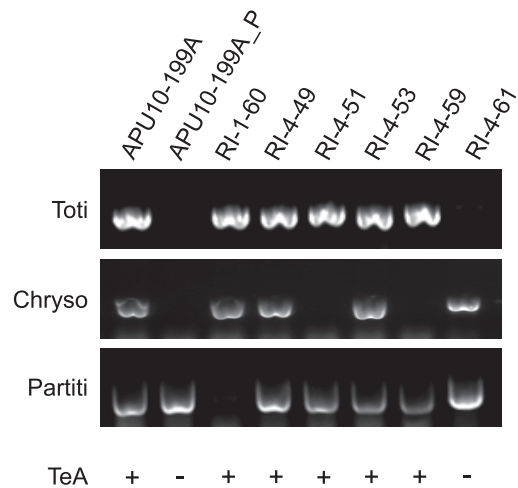


Fig. 4 Virus infection profiles and tenuazonic acid production of the strains obtained by virus reinfection experiments.

Through anastomosis experiment, several candidate strains were segregated. For the colonies, presence of viruses (Toti, Chryso, and Partiti) was directly confirmed by reverse transcription PCR (RT-PCR) with primer set specific to each virus. TeA represents tenuazonic acid production. This figure is adapted from Ninomiya *et al.* 2020.

Table 1 Expression levels (TPM) of core genes for secondary metabolism determined by RNA-sequencing analysis.

Type	Name	Description	APU10-199A	APU10-199A_P	RI-4-49 (TCP)	RI-4-51 (TP)
TS	MGG_10671	pentalenene synthase	0.0	13.9	0.0	2.0
NRPS	MGG_07803 (<i>TAS1</i>)	TeA synthetase	163.0	0.1	47.9	107.0
NRPS	MGG_14767	non-ribosomal peptide synthetase	0.1	270.0	1.3	3.9
TF	MGG_07800 (<i>TAS2</i>)	transcription factor for TeA biosynthesis	30.3	8.0	30.7	41.1

TS: terpene synthase; NRPS: non-ribosomal peptide synthetase; TF: transcription factor

染株 RI-4-49 と RI-4-51 においても三重感染株と同様に *TAS1* の発現量は高かった。また、転写因子 *TAS2* の発現量はパルティティ感染株よりも三重感染株と再感染株で高かった。以上の結果から、トティウイルスがテヌアゾン酸生成遺伝子の転写を正に制御することでテヌアゾン酸産生を促進すると結論付けた。

考 察

近年、マイコウイルスが糸状菌の物質産生に影響を与えるとの報告が僅かながらも挙がっている。マイコウイルスがマイコトキシン産生を促進する (Okada *et al.*, 2018; Nerva *et al.*, 2019) 例もあれば、抑制する (Schmidt *et al.*, 1986; Chu *et al.*, 2002) 例もある。しかしながら、これらの知見は、ウイルス感染株とウイルス治癒株の表現型を比較することのみによって得られている。本研究では、ウイルスが宿主の二次代謝に与える影響を、ウイルス感染株と治癒株の比較によって推定した後、ウイルス再感染株を作製することによって確認している。さらに、本研究は世界で初めて、マイコウイルスによる糸状菌二次代謝の転写レベルでの調節を明らかにした。本研究は、有用な二次代謝産物の探索研究にマイコウイルスを応用できる可能性を示している。

トティウイルスは長さ 5.2kb の dsRNA セグメントをゲノムとして有し、当該セグメントにはコートタンパク質と RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) がコードされている。詳細な分子メカニズムは明らかではないが、これら 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) のうちいずれか、あるいは両方がテヌアゾン酸産生誘導に関わる可能性がある。ゲノム中のどの因子がテヌアゾン酸産生を誘導するか、および、*TAS2* の活性化に至るシグナル伝達経路を明らかにするためには、更なる研究が必要となる。また、テヌアゾン酸以外にも、いくつかの化合物の産生がトティウイルスあるいはクライソウイルスの影響を受けることが示唆された (Fig.1)。ウイルスが二次代謝に与える影響は、培地の種類と振盪速度の違いによる影響を受けた。本研究ではトティウイルスのみに感染した株が得られなかったため、トティウイルスとパルティティウイルス、あるいはトティウイルスとクライソウイルスの組み合わせがテヌアゾン酸産生誘導に必要である可能性は排除できていない。この可能性を検証するためには、更なる研究が必要である。

テヌアゾン酸は古くから知られているマイコトキシンであり、抗菌、抗ウイルス、植物毒性など、多様な生物活性が報告されている (Miller *et al.*, 1963; Gitterman, 1965; Chen *et al.*, 2010)。アルタナリア属糸状菌ではテヌアゾン酸が病原性因子として感染に関わることが報

告されているが (Kang *et al.*, 2017)、これまでのところ、*M. oryzae* のイネへの感染にテヌアゾン酸が関わるかどうかは明らかになっていない。Yun *et al.* (2015) は *M. oryzae* のテヌアゾン酸生成遺伝子を同定し、2 つのテヌアゾン酸産生誘導条件 (1% DMSO 添加と浸透圧応答性 MAP キナーゼ遺伝子 *OSM1* の破壊) を発見した。本研究では初めて、薬剤添加や遺伝子操作等の人為的な条件に依らず、内在性のウイルスによってテヌアゾン酸の産生が誘導されることを明らかにした。本研究は、ウイルスによって機能未知の休眠遺伝子を内在性の遺伝子によって活性化できる可能性を示すものである。マイコウイルスの中には、菌糸融合、プロトプラスト融合 (Lee *et al.*, 2011)、やエレクトロポレーション (Moleleki *et al.*, 2003) 等によって容易に感染可能なものがあり、二次代謝を活性化する因子としての利用が期待される。

要 約

本研究では、マイコウイルスが糸状菌の二次代謝に与える影響を理解することを目的として、3 種のウイルス (トティウイルス、クライソウイルス、パルティティウイルス) に感染したイネもち病菌 *Magnaporthe oryzae* APU10-199A 株と、当該株からトティウイルスとクライソウイルスを除いた株 APU10-199A_P 株の物質産生を比較した。その結果、*M. oryzae* がウイルス依存的にテヌアゾン酸というマイコトキシンを産生することが示唆された。テヌアゾン酸産生を誘導するウイルスを同定するため、ウイルス再感染によって様々な感染プロファイルを示す株を取得し、それらの株の物質産生を比較することによって、トティウイルスがテヌアゾン酸産生を誘導することを明らかにした。さらに、RNA-シーケンシング解析によって、トティウイルスがテヌアゾン酸の生成遺伝子 *TAS1* の発現を正に制御する転写因子 *TAS2* を活性化することによってテヌアゾン酸産生を誘導する、という機構が示唆された。本研究は、ウイルスによる糸状菌の二次代謝制御を転写レベルで捉えた初の研究であり、二次代謝の活性化因子としてマイコウイルスを利用できる可能性を示す。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 二宮章洋, 浦山俊一, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐. 2019. ウイルスがイネもち病菌の物質産生に与える影響の解析. 日本農芸化学会関東支部2019年度支部大会 (9月7日, 茨城)
- 2) 萩原大祐. 2019. Exploring fungal potential to produce novel compounds toward drug discovery. 第63回日本医真菌学会学術集会. (10月11-12日, 千葉)

- 3) 二宮章洋, 浦山俊一, 周防玲, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐. 2020. トテウイルスによるイネいもち病菌のカビ毒テヌアゾン酸産生誘導. 日本農芸化学会2020年度大会 (3月25-28日, 福岡)
- 4) 二宮章洋, 浦山俊一, 周防玲, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐. 2021. 菌類ウイルスがイネいもち病菌の二次代謝に与える影響. 日本農芸化学会2021年度大会 (3月18-21日, 宮城)
- 5) 浦山俊一, 二宮章洋, 千葉悠斗, 池田彩乃, 趙彦杰, 老木紗予子, 萩原大祐. 2021. 真菌細胞内で“家畜化”されたウイルス. 第94回日本細菌学会総会 (3月23-25日, オンライン)
- 6) 二宮章洋. 2021. ウイルスゲノムを利用した糸状菌の二次代謝機能開発. ACT-X「環境とバイオテクノロジー」領域-新学術領域「ポストコホ生態」合同シンポジウム (9月1日, オンライン)
- 7) 萩原大祐. 2021. Virus world of fungal world. 第23回酵母合同シンポジウム (9月2-3日, オンライン)
- 8) 萩原大祐. 2021. 生態システム理解を目指した糸状菌相互作用研究. 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス, (11月11-12日, オンライン)
- 9) Hagiwara, D. 2022. Virus infection among a fungal world. The 19th young Scientist Seminar, (26-27 Nov. Online)

原著論文

- 1) Ninomiya, A., Urayama, S., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S., Moriyama, H. & Hagiwara, D. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* **11**: 1641.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 浦山俊一, 黒木美沙, 二宮章洋, 萩原大祐. 2023. 真菌を操るマイコウイルスのポテンシャル. *マイコトキシ* **73**: 25-28.

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筑波大学糸状菌相互応答講座の学生・構成員諸氏に感謝の意を表します. JSPS 科研費スタート支援 (二宮章洋 18H05999), 特別研究員奨励費 (二宮章洋 21J00311), 挑戦的研究 (開拓) (萩原大祐 20K20377), JST ACT-X (二宮章洋 JPMJAX20BF) の支援にも感謝いたします.

文 献

Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemart, N., Lee, S. Y., Medema, M. H. & Weber, T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **47**: W81-W87.
 Carrasco, L., & Vazquez, D. 1973. Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic.

Biochim. Biophys. Acta **319**: 209-215.
 Chen, S., Yin, C., Qiang, S., Zhou, F. & Dai, X. 2010. Chloroplastic oxidative burst induced by tenuazonic acid, a natural photosynthesis inhibitor, triggers cell necrosis in *Eupatorium adenophorum* Spreng. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 391-405.
 Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, S.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W. & Kim, K.-H. 2002. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2529-2534.
 Gitterman, C. O. 1965. Antitumor, cytotoxic, and antibacterial activities of tenuazonic acid and congeneric tetramic acids. *J. Med. Chem.* **8**: 483-486.
 Higashiura, T., Katoh, Y., Urayama, S. *et al.* 2019. Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 strain D confers growth inhibition to the host fungus and exhibits multifunctional structural proteins. *Virology* **535**: 241-254.
 Kang, Y., Feng, H., Zhang, J., Chen, S., Valverde, B. E. & Qiang, S. 2017. TeA is a key virulence factor for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler infection of its host. *Plant Physiol. Biochem.* **115**: 73-82.
 Lee, K.-M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.-W. & Kim, K.-H. 2011. Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS One* **6**: e21629.
 Miller, F. A., Richtsel, W. A., Sloan, B. J., Ehrlich, J., French, J. C., Bartz, Q. R. & Dixon, G. J. 1963. Antiviral activity of tenuazonic acid. *Nature* **200**: 1338-1339.
 Moleleki, N., van Heerden, S. W., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D. & Preisig, O. 2003. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3952-3956.
 Nerva, L., Chitarra, W., Siciliano, I., Gaiotti, F., Ciuffo, M., Forgia, M., Varese, G. C. & Turina, M. 2019. Mycoviruses mediate mycotoxin regulation in *Aspergillus ochraceus*. *Environ. Microbiol.* **21**: 1957-1968.
 Ninomiya, A., Urayama, S., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S., Moriyama, H. & Hagiwara, D. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* **11**: 1641.
 Nolte, M. J., Steyn, P. S., & Wessels, P. L. 1980. Structural investigations of 3-acylpyrrolidine-2,4-diones by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **10**: 1057-1065.
 Nukina, M. 1999. The blast disease fungi and their metabolic products. *J. Pesticide Sci.* **24**: 293-298.
 Okada, R., Ichinose, S., Takeshita, K. *et al.* 2018. Molecular characterization of a novel mycovirus in *Alternaria alternata* manifesting two-sided effects: down-regulation of host growth and up-regulation of host plant pathogenicity. *Virology* **519**: 23-32.
 Rosett, T., Sankhala, R. H., Stickings, C. E., Taylor, M. E. U., & Thomas, R. 1957. Biochemistry of microorganisms. CIII. Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct.: culture filtrate products. *Biochem. J.* **67**: 390-400.
 Schmidt, F. R., Lemke, P. A. & Esser, K. 1986. Viral influences on aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 248-252.
 Yaegashi, H., Sawahata, T., Ito, T., & Kanematsu, K. 2011. A

- novel colony-print immunoassay reveals differential patterns of distribution and horizontal transmission of four unrelated mycoviruses in *Rosellinia necatrix*. *Virology* **409**: 280-289.
- Yun, C.-S., Motoyama, T., & Osada, H. 2015. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nat. Commun.* **6**: 8758.
- Yun, C.-S., Motoyama, T., & Osada, H. 2017. Regulatory mechanism of mycotoxin tenuazonic acid production in *Pyricularia oryzae*. *ACS Chem. Biol.* **12**: 2270-2274.

略語一覧

DMSO	ジメチルスルホキシド
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HRESIMS	高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析
NMR	核磁気共鳴
NRPS	非リボソームペプチド合成酵素
ORF	オープンリーディングフレーム
PDA	ポテトデキストロース寒天
PDB	ポテトデキストロース培地
PKS	ポリケチド合成酵素
qRT-PCR	定量的逆転写PCR
RdRp	RNA依存性RNA複製酵素
RT-PCR	定量的逆転写PCR
SS	醤油白砂糖培地
TPM	Transcripts per million

糸状菌間相互作用による抗生物質ジフェニルエーテル類の産生誘導

浦山 俊一, 萩原 大祐

筑波大学生命環境系糸状菌相互応答講座

〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

Antibacterial diphenyl ether production induced by fungal-fungal interaction

Syun-ichi Urayama, Daisuke Hagiwara

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577

Fungi have the potential to produce various biologically active secondary metabolites. Fungal genomes contain far more genes for secondary metabolites than the number of metabolites that have been identified. In several studies, novel fungal metabolites were discovered on co-culturing fungus with another microorganism. Therefore, the co-culturing method has attracted much attention in this field. However, study of the molecular mechanisms underlying this effect is in its infancy. In this research, we used strains of the fungal genus *Aspergillus* in co-culture to enhance secondary metabolites production. *Aspergillus nidulans* showed enhanced production of antibacterial compounds called diphenyl ethers when it was co-cultured with *Aspergillus fumigatus*. We identified a gene cluster (the *ors* cluster) that are involved in production of these metabolites. Notably, this cluster was previously demonstrated to be responsible for production of a different compound, orsellinic acid, when *Aspergillus nidulans* was co-cultured with the bacterium *Streptomyces rapamycinicus*. To gain insight into the differences in metabolite biosynthesis during fungal-bacterial and fungal-fungal interaction, the biosynthetic pathway of co-culture-induced metabolites were analyzed and reconstructed in *Aspergillus oryzae*. Our model co-culture system serves as a foundation for understanding fungal secondary metabolic response to fungal-fungal interaction.

Key words: Co-culture, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, Secondary metabolism, Diphenyl ether

緒 言

糸状菌は、フレミングらによる世界初の抗生物質ペニシリンの発見以降、有用物質の探索供給源として利用されてきた。近年、糸状菌のゲノム中には膨大な数の未知化合物の生合成遺伝子が存在することが明らかになったが (Khaldi *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2012a), そのうち研究室条件で発現するものは一部に過ぎない (Brakhage & Schroeckh, 2011)。休眠状態にある二次代謝産物の生合成遺伝子は新たな有用物質の探索源として有望視されており、休眠遺伝子を活性化する方法がいくつも考案されてきた。例えば、培養条件の検討 (OSMAC 法; Bode *et al.*, 2002), DNA メチル基転移酵素やヒストンアセチ

ル基転移酵素の阻害剤を加える方法 (Williams *et al.*, 2008), および、生合成遺伝子の異種発現 (Kennedy *et al.*, 1999; Heneghan *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2010) 等が挙げられる。中でも最も簡便な方法のひとつが共培養法である (Arora *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Liu & Kakeya, 2020; Kim *et al.*, 2021)。初期の研究では、海洋天然物化学者である Fenical らのグループが、海洋由来の糸状菌と細菌との共培養が糸状菌の物質産生を促進することを報告している (Cueto *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2005, 2007)。Cueto *et al.* (2001) は海洋由来の真菌 *Pestalotia* sp. と未同定細菌 CNJ-328 を共培養し、新規ベンゾフェノン化合物ペスタロンを発見した。ペスタロンは真菌を単独培養しても産生せず、共培養でのみ産生が確認された。細菌の培養上清や抽出物を真菌に与えても化合物の産生が誘導されなかったことから、化合物産生は化学物質によって制御されているのではないと考えられた。当該研究に続いて、Oh *et al.* (2005, 2007) は、海洋由来真菌

E-mail: hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp
共同研究者: 二宮 章洋 (筑波大学生命環境系, 現 東京大学農学部)。

Libertella sp. と CNJ-328 の共培養から新規ジテルペン libertellenones を、海洋由来真菌 *Emericella* sp. と海洋放線菌 *Salinispora arenicola* の共培養から新規抗菌物質 emericellamides を単離した。以上の先駆的な研究によって細菌との競争が糸状菌の二次代謝を刺激することが示唆され、これが契機となって共培養による糸状菌からの新規化合物の報告が多数後に続いている (Arora *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020)。

共培養における糸状菌二次代謝の制御機構を明らかにすることは、人為的に二次代謝を活性化する技術を開発するために不可欠であるが、そのような分子機構に関しては理解が進んでいない。先行研究のほとんどは新規物質の獲得を目的としており、そのため非モデル生物を研究対象としている。この制限が、二次代謝活性化の分子機構の解析を難しくしている。例外は Brakhage の研究グループによる糸状菌と細菌の相互作用に関する先駆的な研究である。Schroeckh *et al.* (2009) はモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* と放線菌 *Streptomyces rapamycinicus* との共培養が、*A. nidulans* のオルセリン酸合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター) の発現を促し、いくつかのポリケチド化合物の産生を誘導することを報告した。透析実験と顕微鏡観察の結果、糸状菌と放線菌の物理的相互作用が二次代謝活性化に必要であることが示唆された。Nützmann *et al.* (2011) は、*S. rapamycinicus* が引き起こすヒストンアセチル化が二次代謝の誘導に必要であることを、Fischer *et al.* (2018) は、BasR という転写因子が *S. rapamycinicus* による二次代謝誘導に深く関わることを明らかにした。さらに、*S. rapamycinicus* は *A. nidulans* のみならず、同属他種のモデル糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の二次代謝も誘導することが明らかになっている (König *et al.*, 2013; Stroe *et al.*, 2020)。産生が誘導された化合物 fumigermin は *S. rapamycinicus* の発芽を抑制することから、放線菌からの防御物質と考えられている (Stroe *et al.*, 2020)。糸状菌と細菌の相互作用については、先述した *A. nidulans*-*S. rapamycinicus* と *A. fumigatus*-*S. rapamycinicus* の系をモデルとして解析が進んでいるが、それに対して、糸状菌同士の相互作用によって二次代謝が活性化する分子メカニズムについては一部の例外を除いて理解が進んでいない (Liu *et al.*, 2022)。

本研究で我々は、糸状菌同士のモデル共培養系 (*A. fumigatus*-*A. nidulans*) を確立し、共培養に伴う二次代謝の制御を解析した。その結果、*A. fumigatus*-*A. nidulans* 共培養によって、*A. nidulans* の *ors* クラスターが活性化し、抗菌性ジフェニルエーテル類の産生が誘導されることが明らかになった。当該クラスターは *A. nidulans* と放線菌 *S. rapamycinicus* の共培養によっても活性化するクラ

スターである (Schroeckh *et al.*, 2009)。興味深いことに、*A. fumigatus*-*A. nidulans* 共培養と *S. rapamycinicus*-*A. nidulans* 共培養はいずれも *ors* クラスターを活性化するが、生成する代謝産物は異なっていた。また、我々は、*S. rapamycinicus* によって誘導されるポリケチドはポリケチド合成酵素のみによって生合成されるが、それに対して、*A. fumigatus* によって誘導されるポリケチドの産生にはポリケチド合成酵素に加えて最大3つの修飾酵素が必要であることを明らかにした。*A. nidulans* が細菌と真菌に応答して、2つの異なる種類のポリケチドを作り分ける機構を明らかにした本研究は、糸状菌の微生物に対する代謝応答の理解を深めるものである。

実験方法

モデル糸状菌の寒天培地を用いた共培養と代謝物分析

二次代謝産物の産生を促進する糸状菌間相互作用を探索するため、4種のモデル糸状菌 (*A. fumigatus* Af293, *Aspergillus niger* CBS 513.88, *A. nidulans* FGSC A4, *Aspergillus oryzae* RIB40) を用いた。共培養の場合、それぞれの糸状菌の分生子をポテトデキストロース寒天 (PDA: BD, Franklin Lakes, NJ, USA) に 5.0×10^3 個/mL の割合で加え、30℃で3日間培養した。単独培養の場合、 1.0×10^4 J/mL の割合で分生子を培地に加えた。培養後の寒天プレートを凍結融解し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を乾固した後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。HPLC 分析には 1260 Infinity LC system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) と Poroshell 120 EC-C18 カラム ($\phi 3.0$ mm \times 100 mm, particle size 2.7 μ m; Agilent) を用いた。HPLC の初期条件は 0.5% 酢酸を含む 5% アセトニトリルで、18分かけてアセトニトリル濃度を 100% まで高めるグラジエント溶出をおこなった。化合物は 214 nm の UV の吸収で検出した。

A. fumigatus と *A. nidulans* の液体培地における共培養と代謝物分析

A. fumigatus (1.0×10^5 /mL), *A. nidulans* (1.0×10^5 /mL), または *A. fumigatus*-*A. nidulans* (それぞれ 1.0×10^5 /mL) をポテトデキストロース培地 (BD) に植菌し、30℃, 120rpm の振盪速度で3日間培養した。培養液をミラクロス (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) で濾過し、濾液を酢酸エチルで抽出した。抽出物を乾固した後、DMSO に溶解して、先述の HPLC システムと Poroshell 120 EC-C18 カラムを用いた HPLC 分析に供した。

ピオラセオール, ジオルシノール, およびコルジオール C の単離

A. fumigatus-*A. nidulans* 共培養の培養液をミラクロスで濾過し, 濾液を酢酸エチルで抽出した. 抽出物を乾固した後, DMSO に溶解し, 前述の HPLC システムと COSMOSIL 5C18-AR-II カラム (ϕ 10mm \times 250mm; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いた逆相 HPLC によって分画し, ピオラセオール I と II, ジオルシノール, およびコルジオール C を得た. HPLC の条件は, 0.5% 酢酸を含む 24% アセトニトリルを用いた 35 分間のアイソクラティック溶出 (ピオラセオール類), または 0.5% 酢酸を含む 36% アセトニトリルを用いた 25 分間のアイソクラティック溶出 (ジオルシノールとコルジオール C) とした.

RNA-シーケンシング解析

乳鉢と乳棒を用いて, 液体培養 (独立した培養 \times 2) から得た菌糸を破碎した. TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて RNA を抽出し, PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher) を用いて精製した. 得られた RNA を DNase I (Thermo Fisher) 処理し, RNA Clean & Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA, USA) で精製した. 2 つの独立した培養由来の RNA を等量ずつ混合し, RNA-シーケンシング解析に供した. ライブラリ調製, シーケンシング, および一部のデータ解析は Novogene (Beijing, China) に委託した. リードを *A. fumigatus* Af293 と *A. nidulans* FGSC A4 のリファレンスゲノム配列 (それぞれ GCA_000002655.1 と GCA_000149205.2) にマッピングし, CLC Genomics Workbench (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて遺伝子の発現量を transcripts per million (TPM) で算出した.

遺伝子破壊

醤油白砂糖培地 (SS; 5% 醤油と 5% 白砂糖を水道水に溶解) を用いて *A. nidulans* を一晩 37°C で培養した. ミラクロスを用いて菌糸を回収し, プロトプラスト化溶液 ((10mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0), 0.8M NaCl, 5mg/mL Yatalase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 5mg/mL lysing enzyme (L1412, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) に加えて 30°C で 3 時間反応させた. セルストレナー (40 μ m) で濾過し, 菌糸塊を取り除いた. プロトプラストを遠心分離 (1000 \times g, 5 分) で集め, 0.8M NaCl で 2 回洗浄し, 200 μ L の solution I (0.8M NaCl, 10mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 8.0)) に再懸濁した.

ガイド RNA (gRNA) は Guideit sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara) を用いて作製した. ピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*) カセットは pPTRI (Kubodera

et al., 2002) から PCR によって増幅した. Cas9 タンパク質 (20 μ g; Takara) と gRNA (4 μ g) に滅菌水を加えて全量を 18.4 μ L とし, 室温で 5 分反応させた. Cas9-gRNA 溶液, インサート DNA (4 μ L), および 15 μ L の solution II (40% (w/v) PEG4000, 50mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl (pH 8.0)) を, 50 μ L のプロトプラスト懸濁液に加え, 混合液を 20 分間氷上に置いた. プロトプラストを, ピリチアミン (0.1 μ g/mL), 0.8M NaCl, 0.5% 寒天を含む最小培地 (MM; Barratt *et al.*, 1965) に植菌した.

異種発現のためのベクター作製

pAdeAN

PCR によって pUARA2 (Tagami *et al.*, 2014) から *PamyB-TamyA* カセット (0.9kb) を増幅した. In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いて, *PamyB-TamyA* カセットを pAdeA (4.9kb) (Jin *et al.*, 2004a) の *EcoRI* サイトに挿入し, pAdeAN (5.8kb) を得た.

pUSAN

PCR によって pUARA2 から *PamyB-TamyB-PamyB-TamyA* カセット (1.9kb) を増幅した. PCR によって pUSA (Yamada *et al.*, 2003) から ATP スルフリラーゼ遺伝子 *sC* を含む長さ 6.4kb の領域を増幅した. *PamyB-TamyB-PamyB-TamyA* カセットと 6.4kb のフラグメントを In-Fusion システムによって連結し, pUSAN (8.3kb) を得た.

pUARA2-*orsA*

A. nidulans FGSC A4 のゲノム DNA から, イントロンを含む *orsA* 遺伝子 (6.5kb) を増幅した. In-Fusion システムを用いて *orsA* 遺伝子を pUARA2 (8.0kb) の *KpnI* サイトと *ClaI* サイトに導入し, pUARA2-*orsA* (13.7kb) を得た.

pAdeAN-*orsF*

PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて, 共培養の菌体由来 RNA から *orsF* 遺伝子の cDNA (0.6kb) を合成した. PCR で cDNA から増幅した *orsF* 遺伝子を In-Fusion システムを用いて pAdeAN の *NheI* サイトに導入し, pAdeAN-*orsF* (6.5kb) を得た.

pUSAN-*orsB*

orsB 遺伝子の cDNA (1.0kb) を合成し, PCR で cDNA から増幅した *orsB* 遺伝子を In-Fusion システムを用いて pUSAN の *KpnI* サイトに導入し, pUSAN-*orsB* (6.5kb) を得た.

pUSAN-*orsBC*

orsC 遺伝子の cDNA (1.2kb) を合成し, PCR で cDNA から *orsC* 遺伝子を増幅した. In-Fusion システムを用いて *orsB* と *orsC* をそれぞれ pUSAN の *KpnI* サイトと *ClaI* サイトに導入し, pUSAN-*orsBC* (10.5kb) を得た.

A. *oryzae* の形質転換

A. oryzae NSAR 1 株を、2% グルコース、0.05% 硫酸アンモニウム、0.02% アルギニン、0.01% アデニン、および0.15% メチオニンを含むMMを用いて、30℃で3日間培養した。菌糸からプロトプラストを作製し、200 μ Lの solution I に懸濁した。懸濁液 200 μ L に対して40 μ Lの solution II を加えた。この懸濁液 200 μ L に、20 μ L の solution I に懸濁したプラスミド (70–100 μ g) を加え、氷上に30分静置した。懸濁液に1mLの solution II を加え、さらに室温で15分静置した。Solution I を8.5mL加え、プロトプラストを遠心分離 (1000 \times g, 5分) によって集めた後、100 μ L の solution I に懸濁した。プロトプラスト懸濁液を、2% グルコース、0.5% 寒天、0.8M NaCl、および適切な栄養素を含むMMに混和し、30℃で5–7日間培養した。

A. *oryzae* 形質転換体の代謝物分析

A. oryzae 形質転換体は、2% マルトースと適切な栄養素を含むMMを用いて、30℃で5日間、120rpmで振盪培養した。菌糸を回収し、超音波処理によって代謝産物を抽出した。抽出物を乾燥させ、DMSOに溶解した後、先述のHPLCシステムとPoroshell 120 EC-C18 カラムを用いた逆相HPLC分析に供した。形質転換体が産生したオルセリン酸とレカノール酸の同定は、HPLC分析における保持時間を標品と比較することによっておこなった。

Diorcinolic acid と C10-deoxy gerfelin の単離

orsA 遺伝子を導入した *A. oryzae* (*A. oryzae-orsA*)、および、*orsA* と *orsF* を導入した *A. oryzae* (*A. oryzae-orsAF*) を、2% マルトースと適切な栄養素を含むMMでそれぞれ合計1Lずつ培養した。菌糸をアセトンで抽出し、抽出物を上述のHPLCシステムとCOSMOSIL 5C18-AR-II カラムを用いて分画した結果、diorcinolic acid (6.3mg) と C10-deoxy gerfelin (18.1mg) を得た。HPLCの条件は、0.5% 酢酸を含む24% アセトニトリルを20分流すアイソクラティック溶出 (C10-deoxy gerfelin)、または0.5% 酢酸を含む36% アセトニトリルを27分流すアイソクラティック溶出 (C10-deoxy gerfelin) とした。

核磁気共鳴と質量分析

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルはJNM-ECS-400 NMR Spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)、あるいはAVANCE-500または-600 NMR Spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) を用いて測定した。¹Hと¹³Cの化学シフトはDMSO-*d*₆の溶媒ピーク (それぞれ δ_{H} 2.49と δ_{C} 39.5) を基準とした。高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析 (HRESIMS) 分析はUPLC-SYNAPT

G2 HDMS (Waters, Milford, MA, USA) を用いた。

ビオラセオール生合成遺伝子を有する菌類の探索

BlastPを用いてOrsAに相同性を示すタンパク質を検索した。以下、互いに>55%の同一性を示すタンパク質を推定上のホモログとして扱う。*orsA*のオルソログを有する真菌のゲノム配列について、antiSMASHを用いて二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを検索した。その結果、*orsA*、*orsB*、*orsC*、*orsD*、*orsE*、および*orsF*のオルソログを含むクラスターを発見した。

結 果

二次代謝産物産生を促進する糸状菌間相互作用の探索

糸状菌間相互作用を理解するためのモデル共培養系を構築するために、二次代謝産物産生を促進する糸状菌同士の組み合わせを探索した。スクリーニングには4つのモデル糸状菌 (*A. fumigatus* Af293, *A. niger* CBS 513.88, *A. nidulans* FGSC A4, *A. oryzae* RIB40) を用いた。これら4種の糸状菌は二次代謝に関してよく研究が進んでおり、従って多くの二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの産物が同定されている。さらに、これらの菌には様々な遺伝学的分子ツールが適用可能である (Son & Park, 2021)。PDAを用いて先述の4株のうちそれぞれ1組を共培養した。培養3日目の寒天プレートを回収し、単独培養と共培養の二次代謝プロファイルと比較した。その結果、*A. fumigatus* と *A. nidulans* の共培養サンプルで、いずれの株の単独培養でもほとんど検出されない化合物の産生を認めた (Fig.1)。この結果は、*A. fumigatus* と *A. nidulans* の相互作用が二次代謝産物の産生を促したことを示唆する。これ以外の菌の組み合わせでは、共培養特異的な二次代謝産物の産生は見られなかった。

共培養によるジフェニルエーテル産生の促進

次に、*A. fumigatus*-*A. nidulans* 相互作用が液体培養における二次代謝産物産生に与える影響を解析した。その結果、単独培養ではほとんど検出されない3つの主要な産物 (Fig.2Aの1, 2, 3) を発見した。HRESIMSとNMR解析を基に、化合物1, 2, および3をそれぞれ、ビオラセオール II, I, およびジオルシノール (Fig.2B) と同定した。また、化合物1-3に加えて産生量が比較的小さい化合物コルジオールC (4; Fig.2B) を認めた。化合物1-4は共通してジフェニルエーテル骨格を有している。ビオラセオールは *Emericella violacea* から報告された化合物であり、マウスに対する毒性と抗微生物活性が報告されている (Yamazaki & Maebayashi, 1982)。ジオルシノールは *Emericella falconensis* から単離された、

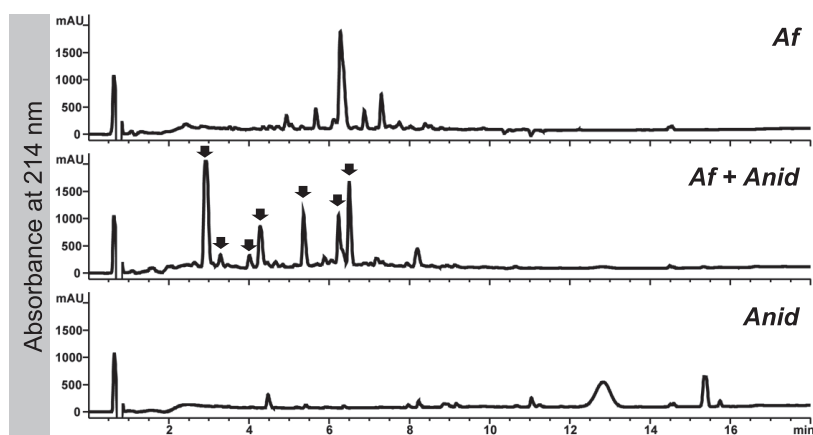


Fig. 1 Secondary metabolite profiles of monoculture, and co-culture in PDA.

Af and *Anid* indicate *A. fumigatus* and *A. nidulans*, respectively. The compounds marked by arrowheads were observed in the co-culture, but hardly detectable in monoculture. This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

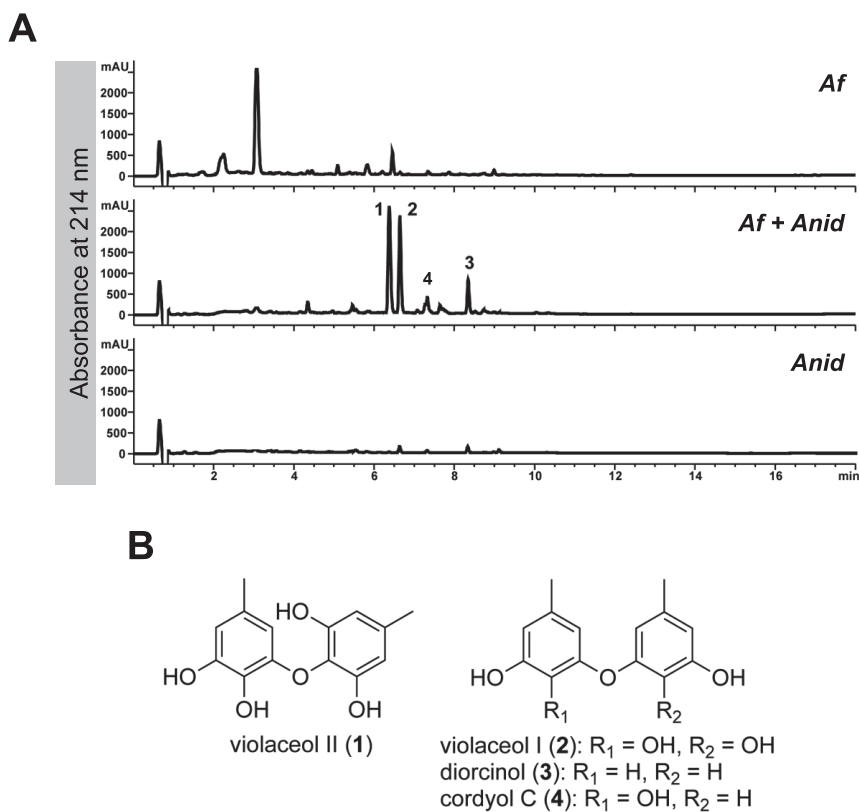


Fig. 2 Secondary metabolite profiles and the compounds produced.

(A) Secondary metabolite profiles of *Af* monoculture, *Af/Anid* co-culture, and *Anid* monoculture in potato-dextrose broth. Compounds 1 and 3 were observed in the co-culture, but were hardly detectable in monoculture. Compound 2 was detected at lower amount in the mono-culture. Two independent cultures were performed. (B) Structures of violaceols II (1) and I (2), diorcinol (3), and cordyol C (4). This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

抗微生物活性を示すジフェニルエーテルである (Itabashi *et al.*, 1993). コルジオール C は昆虫病原糸状菌 *Cordyceps* sp. から発見された化合物で, 抗マイコバクテリア活性を示す (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2007). 我々の知る限り, *A. fumigatus*-*A. nidulans* 相互作用はジフェニルエーテル産生を誘導する初の糸状菌間相互作用である.

共培養による *A. fumigatus* のシデロフォア生合成遺伝子活性化

A. fumigatus-*A. nidulans* 共培養が *A. fumigatus* の二次代謝に与える影響を理解するため, 単独培養と共培養の比較トランスクリプトーム解析を実施した. antiSMASH version 5.2.0 (Blin *et al.*, 2019) を用いて, *A. fumigatus* Af293 のゲノム配列に含まれる, 二次代謝産物の骨格形成を担う遺伝子 (以下コア遺伝子と呼ぶ) を探索した. その結果, 7つのポリケチド合成酵素 (PKS), 16の非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS), 1つの PKS-NRPS ハイブリッド, 8のテルペン合成酵素 (TS) を発見した. これら 32 のコア遺伝子の単独培養と共培養における発現量を RNA-シーケンシングによって決定した. そして, 単独培養と共培養の TPM の比 >5 または <0.2 であり, なおかついずれかの TPM > 全遺伝子の TPM の平均 (>10) である遺伝子を探索した. その結果, 2つの NRPS 遺伝子, AFUA_1G17190 (*sidI*) と AFUA_3G13700 が, 単独培養と共培養で発現量が異なることが明らかになった.

sidI は共培養で発現量が高かった. SidI は NRPS のアデニル化ドメインに相同性を示し, メバロン酸をメバロニル CoA に変換するアシル CoA リガーゼである. この反応はシデロフォアであるフザリニン C (FSC) の生合成経路の一部である (Yasmin *et al.*, 2012). トリアセチルフザリニン C (TAFC) は FSC から生合成され, シデロフォアとして機能する. FSC と TAFC の生合成に関係する *sidI* 以外の遺伝子 (*sidA*, *sidD*, *sidF*, *sidG*, および *sidH*) もまた共培養で発現量が高かった (Table 1). この結果は, 共培養によってシデロフォアである FSC と TAFC の生合成が促進されたことを示唆する. AFUA_3G13700 は単独培養で発現量が高く, これは共培養によって発現が抑制されたことを示唆するが, 当該遺伝子の機能は未知である.

共培養が *A. nidulans* の二次代謝産物の生合成遺伝子の発現に与える影響

A. fumigatus と同様にして, 共培養が *A. nidulans* のコア遺伝子の発現に与える影響を調べた. antiSMASH による解析の結果, *A. nidulans* FGSC A4 のゲノム中に, 25 の PKS, 16 の NRPS, 1つの PKS-NRPS ハイブリッド, および 9 の TS がコードされていることがわかった. これら 51 のコア遺伝子の, 単独培養と共培養における発現量を RNA-シーケンシング解析によって決定した. *A. fumigatus* の場合と同様にして, 発現量が単独培養と

Table 1 Expression levels of the biosynthetic genes induced by co-culture

Species	Gene ID	Description	Mono-culture	Co-culture	Ratio (co/mono)
<i>A. fumigatus</i> Genes involved in iron uptake	AFUA_2G07680	<i>sidA</i> , L-ornithine oxygenase (Schrettl <i>et al.</i> , 2004)	300	910	3.0
	AFUA_3G03420	<i>sidD</i> , NRPS involved in fusarinine C biosynthesis (Reiber <i>et al.</i> , 2005)	41	96	2.3
	AFUA_3G03400	<i>sidF</i> , hydroxyornithine transacylase (Schrettl <i>et al.</i> , 2007)	73	200	2.7
	AFUA_3G03650	<i>sidG</i> , fusarinine C acyltransferase (Schrettl <i>et al.</i> , 2007)	0	28	-
	AFUA_3G03410	<i>sidH</i> , mevalonyl-CoA hydratase (Yasmin <i>et al.</i> , 2012)	30	250	8.3
	AFUA_1G17190	<i>sidI</i> , acyl-CoA ligase involved in siderophore metabolism (Yasmin <i>et al.</i> , 2012)	81	700	8.6
	AFUA_3G03660	<i>estB</i> , triacetyl-fusarinine C esterase (Kragl <i>et al.</i> , 2007)	2.8	13	4.6
	AFUA_3G03640	<i>mirB</i> , siderophore iron transporter (Raymond-Bouchard <i>et al.</i> , 2012)	4.0	210	53
<i>A. nidulans</i> Cichorine biosynthetic gene cluster	AN6443.2 (<i>cicA</i>)	transporter	27	90	3.3
	AN6444.2 (<i>cicB</i>)	hypothetical protein	6.4	130	20
	AN6445.2 (<i>cicC</i>)	oxidoreductase	4.0	28	7.0
	AN6446.2 (<i>cicD</i>)	transcriptional activator	0	29	-
	AN6447.2 (<i>cicE</i>)	O-methyltransferase	16	300	19
	AN6448.2 (<i>cicF</i>)	PKS	2.2	29	13
<i>A. nidulans</i> Orsellinic acid biosynthetic gene cluster	AN6449.2 (<i>cicH</i>)	cytochrome P450	7.4	300	41
	AN7909.2 (<i>orsA</i>)	PKS	14	370	26
	AN7910.2 (<i>orsF</i>)	decarboxylase (Feng <i>et al.</i> , 2019)	28	880	31
	AN7911.2 (<i>orsB</i>)	decarboxylase (Feng <i>et al.</i> , 2019)	11	120	11
	AN7912.2 (<i>orsC</i>)		31	500	16
	AN7913.2 (<i>orsD</i>)	hypothetical protein	74	820	11
	AN7914.2 (<i>orsE</i>)	dehydrogenase	210	28000	130

共培養で異なる遺伝子を探索した結果、2つのPKS, AN6448 (*cicF*)とAN7909 (*orsA*)が共培養で高く発現していた (Table 1).

*cicF*はシコリン生合成遺伝子クラスター (*cic* クラスター)に含まれ (Fig. 3A), 当該クラスターには他にトランスポーター (*cicA*), 転写活性化因子 (*cicD*), および修飾酵素 (*cicB*, *cicC*, *cicE*, および *cicH*) がコードされている (Sanchez *et al.*, 2012b). これら7つの遺伝子がシコリン生合成に必要な。 *cic* クラスターは共培養で協調的に発現量が上がっており (Table 1), 共培養によってシコリン生合成が誘導されたことを示唆する。

*orsA*はオルセリン酸生合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター)に含まれ (Fig. 3B), 当該クラスターは他に5つの遺伝子 *orsB*, *orsC*, *orsD*, *orsE*, および *orsF* を含み, いずれも共培養により発現が誘導された (Table 1). *orsA*はオルセリン酸 (5) の生合成遺伝子であり, *A. nidulans* と *S. rapamycinicus* との共培養によって産生が誘導されるオルセリン酸, オルセリン酸の二量体であるレカノール酸 (6), 構造的にオルセリン酸から派生する

と考えられるF-9775A, およびF-9775Bの生合成に必要な遺伝子として同定された (Schroeckh *et al.*, 2009). その後, *ors* クラスターが1, 2, および3を含むジフェニルエーテルの生合成に関わることが, 遺伝子破壊実験により示唆されている (Sanchez *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2011). 近年, Feng *et al.* (2019) は *Saccharomyces cerevisiae* を異種発現の宿主として用いて, *orsA*, *orsB*, および *orsF* の機能を明らかにした. PKSであるOrsAのみによって5, 6, およびジフェニルエーテルであるdiorcnicolic acid (7; Fig. 3C)が生合成される. OrsFとOrsBが順次脱炭酸反応を触媒し, 7から3が生じる (Fig. 3C). 我々は, *orsA*が *A. fumigatus*-*A. nidulans* 共培養系においても, ジフェニルエーテル1, 2, および3の産生に関与していると予想した。

PKS遺伝子 *orsA* が共培養におけるジフェニルエーテル産生に必要な

我々の共培養系で *ors* クラスターがジフェニルエーテル産生に関与するという仮説を検証するために,

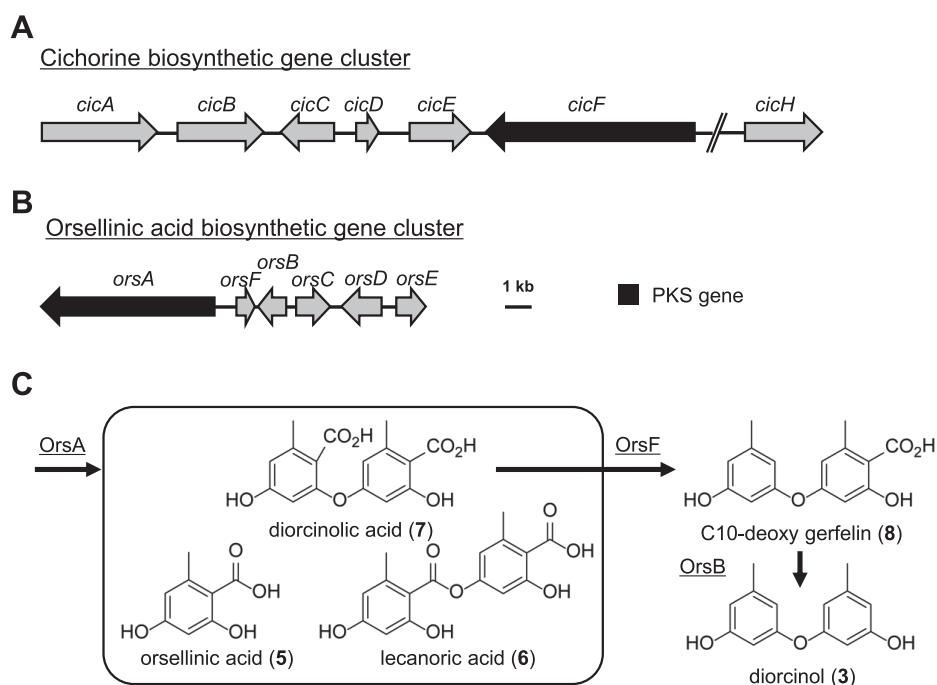


Fig. 3 Schematic biosynthetic gene cluster and proposed pathway of diorcinol biosynthesis. Biosynthetic gene cluster for (A) cichorine and (B) orsellinic acid. The black genes show polyketide synthase (PKS) genes. See Table 3 for the function of each gene in the clusters. (C) Biosynthesis pathway of diorcinol proposed by Feng *et al.* (2019). This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

CRISPR/Cas9 システムを用いて *A. nidulans* の PKS 遺伝子 *orsA* を破壊した。独立して3つの *orsA* 変異株 ($\Delta orsA$ -1, -2, および-3) を得た。寒天培地での生育の様子は野生株と変異株に差は見られなかった。野生株と変異株をそれぞれ *A. fumigatus* と液体培地中で共培養し、二次代謝プロファイルをもとに HPLC で分析した (Fig. 4)。その結果、ジフェニルエーテル **1**, **2**, **3**, および **4** の産生は *A. nidulans* $\Delta orsA$ と *A. fumigatus* の共培養ではまったく確認できなかったため、我々の共培養系において、*orsA* がジフェニルエーテル産生に必要なことが明らかになった。

チロシナーゼ OrsC がビオラセオール産生に必要な

細菌-糸状菌相互作用 (Scroeckh *et al.*, 2009) と糸状菌間相互作用 (本研究) がいずれも *ors* クラスターを活性化する。細菌-糸状菌共培養の主産物はオルセリン酸 (**5**) とレカノール酸 (**6**) (細菌誘導ポリケチド) であるが、一方、糸状菌同士の共培養の主産物はジフェニルエーテルであるビオラセオール II (**1**), I (**2**), およびジオルシノール (糸状菌誘導ポリケチド) である。我々は、*A. nidulans* が細菌と糸状菌に応答して、異なる種類のポリ

ケチドを産生する分子機構に着目した。*ors* クラスターによるポリケチド生合成機構を明らかにするため、当該クラスターに含まれる遺伝子を *A. oryzae* に導入し、その機能を解析した。

まず、PKS 遺伝子 *orsA* を、四重栄養要求性の *A. oryzae* NSAR1 (Jin *et al.*, 2004b) に導入した。*orsA* 遺伝子を導入した *A. oryzae* (*A. oryzae-orsA*) は細菌誘導ポリケチドである **5** と **6**, そしてそれに加えてジフェニルエーテルである diorcinolic acid (**7**; Fig. 5) を産生した。続いて、脱炭酸酵素をコードする *orsF* を *A. oryzae-orsA* に導入し、*A. oryzae-orsAF* を得た。*A. oryzae-orsAF* は C10-deoxy gerfelin (**8**; Fig. 5) を産生した。そして、もう一方の脱炭酸酵素をコードする遺伝子 *orsB* を *A. oryzae-orsAF* に導入し、*A. oryzae-orsABF* を得た。*A. oryzae-orsABF* はジオルシノールを産生した (**3**; Fig. 5)。以上の結果は、(I) OrsA がオルセリン酸 (**5**), レカノール酸 (**6**), およびジフェニルエーテルである diorcinolic acid (**7**) の生合成を担うこと、および、(II) OrsB と OrsF が位置選択的な脱炭酸酵素であることを示唆する。

化学構造の比較から、ビオラセオール (**1** と **2**) の生合成はジオルシノール (**3**) の生合成と関連があると予想

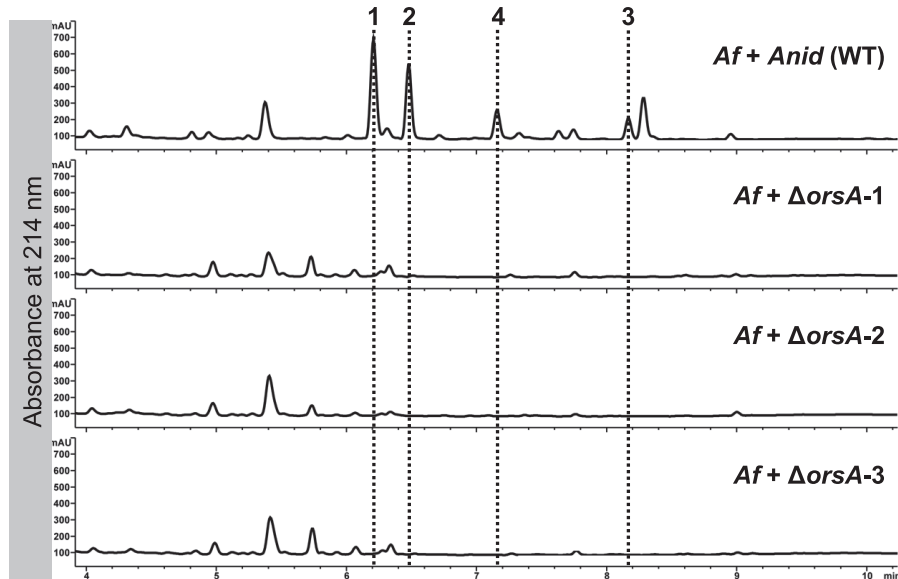


Fig. 4 Secondary metabolite profiles of *orsA* mutant strains.

The production of diphenyl ethers was abolished in co-culture of the mutant strains and *A. fumigatus*. This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

されたが、ビオラセオール生合成機構は不明だった。我々は、**1**と**2**の生合成の過程で、何らかの酵素が2つのヒドロキシ基を導入すると考えた。orsクラスターに含まれる遺伝子のうち、orsC、orsD、およびorsEの機能が未知であった。このうちOrsCがチロシナーゼドメインを含んでいたことから、OrsCがヒドロキシ基導入を担うと予想した。OrsCの機能を明らかにするため、orsBとorsCをAo-orsAFに導入し、orsA、orsB、orsC、およびorsFを発現するA. oryzaeを得た(A. oryzae-orsABCF)。A. oryzae-orsABCFが**3**に加えて**1**、**2**、および**4**を産生したことから、OrsCがビオラセオール生合成においてヒドロキシ基導入を担うことが示された。

ビオラセオール、ジオルシノール、およびコルジオールCの抗菌活性

抗菌試験の結果、我々の糸状菌同士の共培養の産物(**1**、**2**、**3**、および**4**)は*Bacillus subtilis* PCI 219に対して抗菌活性を示した。化合物**1**、**2**、**3**、**4**、およびクロラムフェニコールのMIC値($\mu\text{g}/\text{mL}$)は、それぞれ50、13、100、100、 $6.3\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。ビオラセオール(**1**と**2**)の*B. subtilis*に対する抗菌活性はジオルシノールとコルジオールCよりも高かった。また、ビオラセオールI、II、およびクロラムフェニコールの*Escherichia coli* ATCC25922に対するMIC値($\mu\text{g}/\text{mL}$)は、それぞれ>200、>200、 $6.3\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。

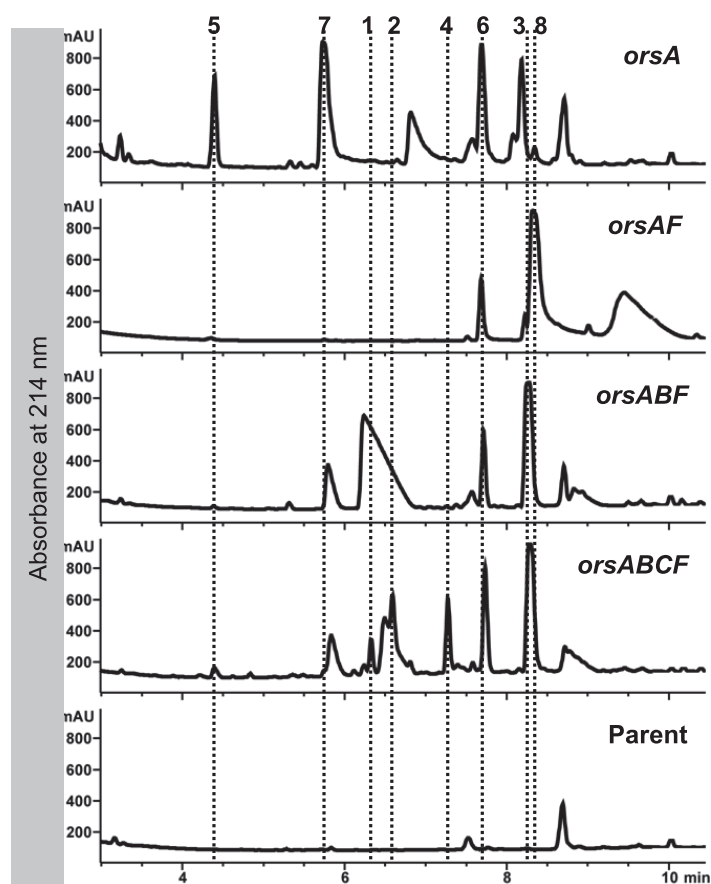


Fig. 5 Secondary metabolite profiles of *A. oryzae* expressing some genes in *A. nidulans* *ors* gene cluster.

The strains were cultured in maltose minimal medium supplemented with appropriate nutrients for 5 days at 30 °C before extraction. *orsAF* indicates *A. oryzae* expressing *orsA* and *orsF*. Accordingly, *orsABF* and *orsABCF* indicate the host expressing the corresponding genes. Two independent cultures were performed. This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

ビオラセオール生合成遺伝子を有する真菌

BLAST 検索と antiSMASH による解析を組み合わせ、ビオラセオール生合成に必要な遺伝子 (*orsA*, *orsB*, *orsC*, および *orsF*) を有する真菌を探索した (Fig.6). その結果, *ors* クラスターに含まれる 6 つの遺伝子のオルソログが, *Aspergillus* section *Versicolores* に属する 3 種の糸状菌 (*Aspergillus versicolor*, *Aspergillus puulaauensis*, および *Aspergillus sydowii*) のゲノム中に見つかった. 実際に, ビオラセオール類は海洋由来の *A. versicolor* (Fremlin *et al.*, 2009; Salendra *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020), および *A. sydowii* (Liu *et al.*, 2017; Hamed *et al.*, 2019) から報告されている. また, ビオラセオール生合成遺伝子のオルソログは, クロイボタケ綱 (Dothideomycetes) に属する 4 つの子囊菌 (*Melanomma pulvis-pyrius*, *Lentithecium fluviatile*, *Pseudogymnoascus* sp., および *Clohesyomyces aquaticus*) のゲノム中に見出された. これは, ビオラセオール生合成遺伝子が子囊菌に広く分布していることを示唆する.

考 察

本研究で我々は, *A. fumigatus* と *A. nidulans* からなる糸状菌-糸状菌共培養のモデル系を確立した. 当該系を用いて, *A. fumigatus*-*A. nidulans* 共培養が *A. nidulans* のオルセリン酸生合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター) の転写を活性化し, 抗菌性ジフェニルエーテルの産生を誘導することを明らかにした. 本研究は, 複雑な糸状菌同士のコミュニケーションに対する二次代謝の応答の理解に寄与する.

RNA シーケンシング解析の結果, 共培養において *A. nidulans* と *A. fumigatus* はいずれも二次代謝産物の生合成遺伝子を活性化することが明らかになった. *A. fumigatus* のシデロフォア FSC と TAFC の生合成に関わる 6 つの遺伝子の発現量が共培養によって上昇していた. これらのシデロフォアは鉄が乏しい条件下で分泌され, 細胞外の鉄に結合する. TAFC-鉄複合体はトランスポーター MirB を介して細胞内に取り込まれる (Raymond-

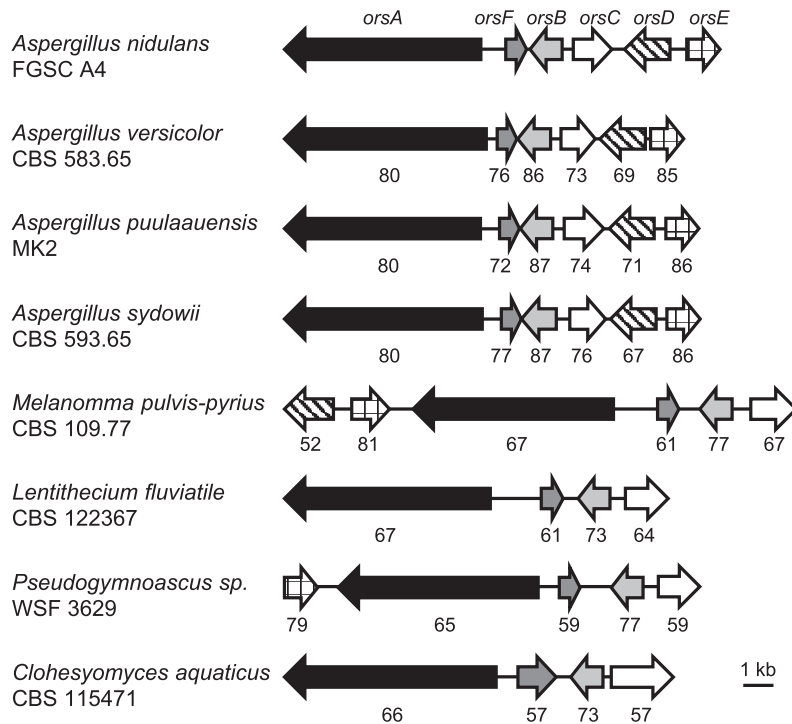


Fig.6 *ors* cluster in other fungi.

Solid arrows indicate genes that are orthologous to *orsA*, *orsB*, *orsC*, *orsD*, *orsE*, and *orsF*. The numbers below genes indicate percentage identity of the corresponding protein to the ortholog in *A. nidulans* FGSC A4. This figure is adapted from Ninomiya *et al.*, 2022.

Bouchard *et al.*, 2012). サイトゾルにおいてエステラーゼ (EstB) がT AFCを加水分解し、遊離した鉄は代謝に使われるか、あるいは細胞内に貯蔵される (Kragl *et al.*, 2007). この鉄取込みシステムが鉄欠乏条件下での糸状菌の生存を助ける. 興味深いことに、MirBとEstBはいずれも *A. fumigatus* の単独培養と比べて共培養で高く発現しており (Table 1), これは共培養が鉄の取込みを促進することを示唆する. Moree *et al.* (2012) はFSCとT AFCの生合成が *A. fumigatus* と *Pseudomonas aeruginosa* の共培養においてフェナジンによって誘導されることを報告している. この知見と今回得られた結果を併せて考えると、*A. fumigatus* は他の微生物との共培養において、鉄をめぐる競争の中で生き残るためにシデロフォアを産生することが示された.

ビオラセオール (Yamazaki & Maebayashi, 1982), ジオルシノール (Itabashi *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2014), コルジオール (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2007), および pestheic acid (Shimada *et al.*, 2001) 等、糸状菌からは多様なジフェニルエーテルが報告されている. 糸状菌が産生するジフェニルエーテルは植物の成長促進活性 (pestheic acid; Shimada *et al.*, 2001), 抗単純ヘルペスウイルス1型活性と細胞毒性 (コルジオールC; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2007), アクチン阻害活性 (ビオラセオールIとII; Asami *et al.*, 2012), アミロイド β_{42} 凝集抑制活性 (ビオラセオールIとII; Zhao *et al.*, 2014), および抗卵菌活性 (ジオルシノール, ビオラセオールIおよびII; Takahashi *et al.*, 2018) 等、幅広い生物活性を示す. 従って真菌ジフェニルエーテルは創薬シード化合物として有用であると言える. 本研究で我々は、特に幅広い生物活性を示すジフェニルエーテルであるビオラセオールIとIIの生合成遺伝子を明らかにした. また、異種発現により、チロシナーゼOrsCが芳香環にヒドロキシ基を導入することが示された. ヒドロキシ化はジフェニルエーテルの構造と生物活性を多様化させる. 従って、本研究は多様な構造を生み出す糸状菌のジフェニルエーテル生合成の理解を深めるものである. 我々はまた、4つのヒドロキシ基を有するジフェニルエーテル (ビオラセオールIとII) が、2つまたは3つのヒドロキシ基を有するジフェニルエーテル (それぞれジオルシノールとコルジオールC) よりも、*B. subtilis* に対して高い抗菌活性を示すことを明らかにした. これは、OrsCが糸状菌のジフェニルエーテルの抗菌活性を高めることを示唆する.

S. cerevisiae を用いた異種発現 (Feng *et al.*, 2019) と *A. oryzae* を用いた異種発現 (本研究) は、ポリケチド合成酵素OrsAのみによって、*S. rapamycinicus*-*A. nidulans* 共培養の主な産物であるオルセリン酸とレ

カノール酸 (Schroeckh *et al.*, 2009) が生合成されることを示した. また、我々は *A. fumigatus*-*A. nidulans* 共培養の主な産物であるビオラセオールの生合成には、修飾酵素であるOrsB, OrsC, およびOrsFが必要であることを明らかにした. これらの結果は、*S. rapamycinicus* と共培養した時と *A. fumigatus* と共培養した時で、*A. nidulans* の酵素活性が異なる調節を受けることを示唆している.

本研究では、2つのモデル糸状菌 *A. fumigatus* と *A. nidulans* からなる糸状菌同士のモデル共培養系を確立し、当該共培養がジフェニルエーテル産生を誘導することを明らかにした. さらに、*A. nidulans* が放線菌 *S. rapamycinicus* と *A. fumigatus* に応答して、異なる種類のポリケチドを産生する機構の一端を明らかにした. これは、糸状菌の微生物に対する二次代謝応答の理解を深める手掛かりとなるものである.

要 約

糸状菌は二次代謝産物の生合成遺伝子を多数ゲノム中に有するが、実験室の環境下で発現するものは少数に過ぎない. 糸状菌の潜在的な物質産生能を活性化するための最も簡便な方法のひとつが共培養である. 共培養によって新規化合物を得たとの報告は多数挙がっているが、先行研究の多くは新規物質の獲得を目的としており、物質産生促進の分子メカニズムについては理解が進んでいない. 我々はそのような分子メカニズムについて理解を深めるため、モデル糸状菌 *A. fumigatus* と *A. nidulans* からなるモデル共培養系を確立した. 当該共培養は、*A. nidulans* のオルセリン酸生合成遺伝子クラスター (*ors* クラスター) を活性化することによって、抗菌性ジフェニルエーテルの産生を誘導することを明らかにした. 興味深いことに、放線菌 *S. rapamycinicus* も *A. nidulans* の *ors* クラスターを活性化するが、主な産物はオルセリン酸とレカノール酸であることが報告されている. すなわち、糸状菌-糸状菌共培養と放線菌-糸状菌共培養とで、*ors* クラスターの生合成産物が異なる. 我々は、*A. oryzae* 異種発現系を用いて、2つの共培養が異なる産物を生じるメカニズムを検討した. その結果、放線菌-糸状菌共培養の主産物はポリケチド合成酵素のみによって生合成されるが、糸状菌-糸状菌共培養の主産物の生合成にはそれに加えて最大3つの酵素が必要であることを示した. 本研究は、糸状菌の微生物に対する複雑な二次代謝応答を理解する手掛かりとなるものである.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐. 2018. 二次代謝を活性化する糸状菌間相互作用の探索. 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス (11月15-16日, 新潟)
- 2) 二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐. 2019. 糸状菌間相互作用による二次代謝活性化の機構解明を目指したモデル共培養系の確立. 日本農芸化学会2019年度大会 (3月24-27日, 東京)
- 3) 萩原大祐. 2019. 糸状菌の未利用遺伝子資源にアクセスする複雑系培養の研究. 第65回日本放線菌学会学術講演会. (5月24日, 山梨)
- 4) 萩原大祐. 2019. 生物間相互作用研究から糸状菌の真の生態に迫る. 微生物ウィーク2019. (7月25日, 東京)
- 5) 萩原大祐. 2019. Exploring fungal potential to produce novel compounds toward drug discovery. 第63回日本医真菌学会学術集会. (10月11-12日, 千葉)
- 6) 二宮章洋, 浦山俊一, 萩原大祐. 2020. 糸状菌 *Aspergillus nidulans* と *Aspergillus fumigatus* の共培養が抗生物質産生を促進する機構の解析. 日本農芸化学会関東支部2020年度支部大会 (11月28日, オンライン)
- 7) 萩原大祐. 2021. 生態システム理解を目指した糸状菌相互作用研究. 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス, (11月11-12日, オンライン)

原著論文

- 1) Ninomiya, A., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2022. Antibacterial diphenyl ether production induced by co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**: 4169-4185.

その他 (総説・書籍・特許など)

- 1) 萩原大祐. 2018. 糸状菌ゲノムから紐解く二次代謝の多様性. *JSM Mycotoxins*, **68**: 89-92.
- 2) 萩原大祐. 2020. 微生物, 非純粋培養のすすめ. *生物工学会誌*, **98**: 192.

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筑波大学糸状菌相互応答講座の学生・構成員諸氏に感謝の意を表します. 筑波大学研究基盤支援プログラム (Aタイプ) の支援にも感謝いたします.

文 献

Arora, D., Gupta, P., Jaglan, S., Roullier, C., Grovel, O. & Bertrand, S. 2020. Expanding the chemical diversity through microorganisms coculture: current status and outlook. *Biotechnol. Adv.* **40**: 107521.

Asami, Y., Jang, J. H., Oh, H. *et al.* 2012. Violaceols function as

actin inhibitors inducing cell shape elongation in fibroblast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 1431-1437.

Barratt, R. W., Johnson, G. B. & Ogata, W. N. 1965. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 233-246.

Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H. & Weber, T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **47**: W81-W87.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3**: 619-627.

Brakhage, A. A. & Schroeckh, V. 2011. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* **48**: 15-22.

Bunyapaihoonsri, T., Yoiprommarat, S., Intereya, K. & Kocharin, K. 2007. New diphenyl ethers from the insect pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 1861. *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 304-307.

Chen, J., Zhang, P., Ye, X., Wei, B., Emam, M., Zhang, H. & Wang, H. 2020. The structural diversity of marine microbial secondary metabolites based on co-culture strategy: 2009-2019. *Mar. Drugs*. **18**: 449.

Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E. & Clardy, J. 2001. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J. Nat. Prod.* **64**: 1444-1446.

Feng, C., Wei, Q., Hu, C. & Zou, Y. 2019. Biosynthesis of diphenyl ethers in fungi. *Org. Lett.* **21**: 3114-3118.

Fischer, J., Müller, S. Y., Netzker, T. *et al.* 2018. Chromatin mapping identifies BasR, a key regulator of bacteria-triggered production of fungal secondary metabolites. *eLife* **7**: e40969.

Fremelin, L. J., Piggott, A. M., Lacey, E. & Capon, R. J. 2009. Cottoquinazoline A and cotteslosins A and B, metabolites from an Australian marine-derived strain of *Aspergillus versicolor*. *J. Nat. Prod.* **72**: 666-670.

Hamed, A., Abdel-Razek, A. S., Frese, M., Sproß, J., Stammler, H. G., Sewald, N. & Shaaban, M. 2019. Coumarin: a first coumarinyl calcium complex isolated from nature. *J. Antibiot.* **72**: 729-735.

Heneghan, M. N., Yakasai, A. A., Halo, L. M., Song, Z., Bailey, A. M., Simpson, T. J., Cox, R. J. & Lazarus, C. M. 2010. First heterologous reconstruction of a complete functional fungal biosynthetic multigene cluster. *ChemBioChem* **11**: 1508-1512.

Itabashi, T., Nozawa, K., Nakajima, S. & Kawai, K. 1993. A new azaphilone, falconensin H, from *Emericella falconensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 2040-2041.

Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y. & Kushiro, T. 2010. Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nat. Chem.* **2**: 858-864.

Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M. & Kitamoto, K. 2004a. Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 656-662.

Jin, F. J., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Arioka, M. & Kitamoto, K. 2004b. Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**: 79-85.

- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C. & Hutchinson, C. R. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**: 1368–1372.
- Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. & Fedorova, N. D. 2010. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal. Genet. Biol.* **47**: 736–741.
- Kim, J. H., Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B. O., Cho, B.-K. 2021. Discovery of novel secondary metabolites encoded in actinomycete genomes through coculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **48**: kuaa001.
- König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. 2013. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* **14**: 938–942.
- Kragl, C., Schrettl, M., Abt, B., Sarg, B., Lindner, H. H. & Haas, H. 2007. EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetyl-fusarinine optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1278–1285.
- Kubodera, T., Yamashita, N., & Nishimuta, A. 2002. Transformation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 404–406.
- Liu, C. & Kakeya, H. 2020. Cryptic chemical communication: secondary metabolic responses revealed by microbial co-culture. *Chem. Asian J.* **15**: 327–337.
- Liu, S., Wang, H., Su, M., Hwang, G. J., Hong, J. & Jung, J. H. 2017. New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4. *Nat. Prod. Res.* **31**: 1682–1686.
- Liu, J., Peng, C., Han, Q., Wang, M., Zhou, G., Ye, B., Xiao, Y., Fang, Z. & Kües, U. 2022. *Coprinopsis cinerea* uses laccase Lcc9 as a defense strategy to eliminate oxidative stress during fungal-fungal interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**: e01760–e01721.
- Moree, W. J., Phelan, V. V., Wu, C.-H., Bandeira, N., Cornett, D. S., Duggan, B. M. & Dorrestein, P. C. 2012. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 13811–13816.
- Nielsen, M. L., Nielsen, J. B., Rank, C. *et al.* 2011. A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **321**: 157–166.
- Ninomiya, A., Urayama, S. & Hagiwara, D. 2022. Antibacterial diphenyl ether production induced by co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**: 4169–4185.
- Nützmans, H.-W., Reyez-Dominguez, Y., Scherlach, K. *et al.* 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 14282–14287.
- Oh, D.-C., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. 2005. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 5267–5273.
- Oh, D.-C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. & Fenical, W. 2007. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *J. Nat. Prod.* **70**: 515–520.
- Raymond-Bouchard I, Carroll CS, Nesbitt JR, Henry KA, Pinto LJ, Moizadeh, M., Scott, J. K. & Moore, M. M. 2012. Structural requirements for the activity of the MirB ferrisiderophore transporter of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **11**: 1333–1344.
- Reiber, K., Reeves, E. P., Neville, C. M., Winkler, R., Gebhardt, P., Kavanagh, K. & Doyle, S. 2005. The expression of selected non-ribosomal peptide synthetases in *Aspergillus fumigatus* is controlled by the availability of free iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **248**: 83–91.
- Salendra, L., Luo, X., Lin, J., Yang, B., Zhou, X. & Liu, Y. 2019. Versispiroketal A, an unusual tetracyclic bridged spiroketal from the sponge-associated fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 41013. *Org. Biomol. Chem.* **17**: 2182–2186.
- Sanchez, J. F., Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Ahuja, M., Oakley, C. E. & Wang, C. C. C. 2010. Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biosyst.* **6**: 587–593.
- Sanchez, J. F., Somoza, A. D., Keller, N. P. & Wang, C. C. C. 2012a. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.* **29**: 351–371.
- Sanchez, J. F., Entwistle, R., Corcoran, D., Oakley, B. R. & Wang, C. C. C. 2012b. Identification and molecular genetic analysis of the cichorine gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Med. Chem. Comm.* **3**: 997–1002.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N. Jr., Haynes, K. & Haas, H. 2004. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* **200**: 1213–1219.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C. *et al.* 2007. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* **3**: e128.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmans, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. 2009. Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 14558–14563.
- Shimada, A., Takahashi, I., Kawano, T. & Kimura, Y. 2001. Chloroisosulochrin, chloroisosulochrin dehydrate, and pestheic acid, plant growth regulators, produced by *Pestalotiopsis theae*. *Z. Naturforsch. B* **56b**: 797–803.
- Son, Y.-E. & Park, H.-S. 2021. Genetic manipulation and transformation methods for *Aspergillus* spp. *Mycobiology* **49**: 95–104.
- Stroe, M. C., Netzker, T., Scherlach, K., Krüger, T., Hertweck, C., Valiante, V. & Brakhage, A. A. 2020. Targeted induction of a silent fungal gene cluster encoding the bacteria-specific germination inhibitor fumigermin. *eLife* **9**: e52541.
- Tagami, K., Minami, A., Fujii, R., Liu, C., Tanaka, M., Gomi, K., Dairi, T. & Oikawa, H. 2014. Rapid reconstitution of biosynthetic machinery for fungal metabolites in *Aspergillus oryzae*: total biosynthesis of aflatrem. *ChemBioChem* **15**: 2076–2080.
- Takahashi, K., Sakai, K., Fukasawa, W. *et al.* 2018. Quellenin, a new anti-*Saprolegnia* compound isolated from the deep-sea fungus, *Aspergillus* sp. YK-76. *J. Antibiot.* **71**: 741–744.
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E. & Cichewicz, R. H. 2008. Epigenetic remodeling of fungal secondary metabolome. *Organ. Biomol. Chem.* **6**: 1895–1897.

- Yamada, O., Nan, S. N., Akao, T., Tominaga, M., Watanabe, H., Satoh, T., Enei, H. & Akita, O. 2003. *dffA* gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N5-oxygenase and is indispensable for deferriferrichrysin biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **95**: 82-88.
- Yamazaki, M. & Maebayashi, Y. 1982. Structure determination of violaceol-I and -II, new fungal metabolites from a strain of *Emericella violacea*. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 514-518.
- Yang, L.-J., Peng, X.-Y., Zhang, Y.-H., Liu, Z.-Q., Li, X., Gu, Y.-C., Shao, C.-L., Han, Z. & Wang, C.-Y. 2020. Antimicrobial and antioxidant polyketides from a deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SH0105. *Mar. Drugs.* **18**: 636.
- Yasmin, S., Alcazar-Fuoli, L., Gründlinger, M. *et al.* 2012. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: E497-E504.
- Zhao, H., Wang, G.-Q., Tong, X.-P. *et al.* 2014. Diphenyl ethers from *Aspergillus* sp. and their anti-A β ₄₂ aggregation activities. *Fitoterapia* **98**: 77-83.

略語一覧

DMSO	ジメチルスルホキシド
FSC	フザリニンC
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HRESIMS	高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析
MM	最小培地
NMR	核磁気共鳴
NRPS	非リボソームペプチド合成酵素
PDA	ポテトデキストロース寒天
PKS	ポリケチド合成酵素
SS	醤油白砂糖培地
TAFC	トリアセチルフザリニンC
TPM	Transcripts per million
TS	テルペン合成酵素

2021 年度一般研究助成の研究報告

助成期間：2021 年 4 月～2023 年 3 月

Gallionellaceae 科微好気性鉄酸化細菌の分離と特性の解明

渡 邊 健 史

【目的】鉄の酸化反応は地球化学的物質循環において重要な反応の一つであり、多様な微生物が反応に関与する。ストークと呼ばれる捻れた紐状の鉄酸化物を形成する *Gallionella ferruginea* は、中性淡水環境に生息する典型的な微好気性鉄酸化細菌の一種である。しかし、これまでに正式に記載された種は少ない。筆者は、以前に愛知県内の水田土壌より *Ferrigenium kumadai* An22^T を分離した。本研究では、*Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌の多様性とその特性を明らかにするために、水田環境より新たに菌株を分離・同定することを目指した。また、鉄酸化細菌ゲノム解析のための基盤的データを得ることを目的として、*F. kumadai* An22^T のゲノム配列を解読した。

【方法】多様な鉄酸化細菌を得るために、複数の試料(名古屋大学内の水田圃場より得た水稻根と、別の調査目的で訪れた西アフリカ、ブルキナファソのイネ鉄過剰障害発生水田より採取した水稻根と田面水)を分離源として用いた。試験管の底に硫化鉄を沈めた低濃度アガロース無機塩培地に接種し、鉄酸化細菌と増殖とともに形成した鉄酸化物の混合物を限界希釈法で純化した。大学内の水稻根より NRt1 株と NRt3 株、ブルキナファソ水田の田面水より BFL2-1 株、水稻根より BRTS 株を得た。16S rRNA 遺伝子を解読するとともに、細胞形態や運動性等の特性を調べた。この内、NRt1 株については、形成したストークを SEM および蛍光標識レクチンで観察した。また、An22^T 株のゲノム解析を行った。

【結果・考察】NRt1 株、NRt3 株は *F. kumadai* An22^T に最も近縁で、16S rRNA 遺伝子の相同性は共に 96.4% であった(図1)。BFL2-1 株と BRTS 株は *Sideroxyarcus*

emersonii MIZ01^T に最も近縁であり、その相同性は 95.8%、96.7% であった。また、BFL2-1 株と BRTS 株の間の相同性も 96.4% であり、分離した4株は3種の新種として分類される可能性が示された。分離菌株は全て2価鉄をエネルギー源として生育する無機栄養細菌であり、唯一、BRTS 株はイオウ酸化能も有することが示された。細胞形態は BRTS 株を除いて曲がった桿状細胞であったが、BRTS 株は他に比べて全長がやや長く、捻れた形態を示した。全て運動性を有し、鞭毛も観察された。現在までに NRt1 株と NRt3 株の生育特性を解析した結果、NRt1 株は 12~37℃、pH 5.4~7.4、NaCl 25mM 以下、NRt3 株は 12~37℃、pH 5.4~6.8、NaCl 75mM 以下の範囲で生育し、系統的に近い両菌株の特性はやや異なることが示された。

NRt1 株と NRt3 株は、樹枝状のストークをとるところ形成した(図2)。蛍光標識レクチンによる観察の結果、NRt1 株のストークには α -マンノースとガラクトースが含まれると推定された。これまでに α -マンノースを含むストークは観察されているが、ガラクトースは検出されていないため、NRt1 株は、既知のストークとは異なる糖組成のストークを形成している可能性が考えられた。

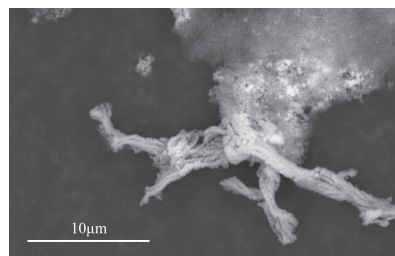


図2 NRt1 株が形成した樹枝状ストーク

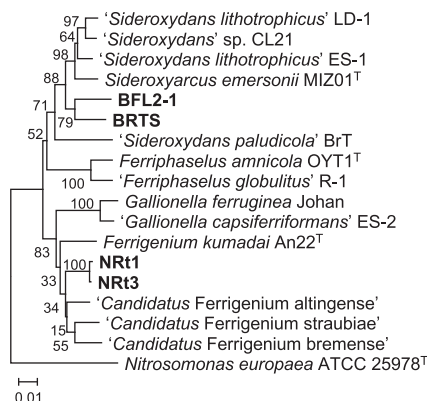


図1 *Gallionellaceae* 科鉄酸化細菌 16S rRNA 遺伝子の系統樹。太字は分離菌株を、' ' は未承認の属種名を示す。

F. kumadai An22^T のゲノム解析の結果、An22^T は 2.57Mb のゲノムを有し、鉄酸化に関わる酵素として *Cyc2* をコードする遺伝子を有することが示された。一方、ほかの分離菌株についても DNA 抽出を繰り返し試みたが、十分な量のゲノム DNA は得られなかった。今後、DNA の精製方法をさらに検討する必要がある。

以上、本研究により新たに新種の可能性を含む4菌株の *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌が分離され、その特徴の一部が明らかにされた。今後、さらに解析を進めることで、環境中の *Gallionellaceae* 科微好気性鉄酸化細菌の多様性、生態、機能の解明に繋がると期待される。

深海底に沈む木材等をニッチとした深海生菌類の多様性解明

長 野 由 梨 子

【目的】 深海底には、陸上より流出し沈んだ多種多様な植物片が点在している。陸上において植物の主要な分解者は真菌類であるが、深海環境においても沈木に子実体を形成する深海生菌類が存在している。しかしながら、偏性深海生菌類は世界でもわずか6種が報告されているのみで、その多様性や分布、生態についてはほとんど研究が進んでいない。そこで、深海底に沈む木材等をニッチとした深海生菌類の多様性や分布を網羅的に明らかにするために、深海底より植物片を回収し、ITS rRNA 遺伝子を対象とした真菌アンプリコン解析を行なった。

【方法】 相模湾や東京湾三崎沖、房総半島沖の深海平原など、水深約750m～5700mの深海底から有人潜水船「しんかい6500」を用いて植物片19試料、海藻1試料を回収した。また浅海から植物片1試料を回収した。一部の試料については枝、葉、果球部分などに分け、計24試料よりDNAを抽出し、真菌類に特異的なプライマーITS1-F_KYO1/ITS2_KYO2を用いて真菌多様性解析を行った。植物や海藻試料については葉緑体遺伝子*rbcl*を対象にPCRを行い、簡易同定を行った。

【結果・考察】 アンプリコン解析の結果、23試料から合計543の真菌 Amplicon Sequence Variants (ASVs) が検出された。アマモ1試料からは真菌類と同定される配列は検出されなかった。最も多くのASVsが検出されたのはイチイガシの葉(147ASVs)、次いでスギの葉(131ASVs)、コナラの葉(58ASVs)であり、枝や幹よりも葉で多様な菌類が存在していることが示唆された。カシヤマツにおいて枝、葉、果球部分に分けて解析した結果は、枝部分が最も菌類の多様性が高いという結果であった。検出されたASVsは、綱レベルではDothideomycetesが最も多く、次いでSordariomycetes, Eurotiomycetesが多かった。存在量(配列リード数)としては、Sordariomycetes(76%)が圧倒的に多く、そのうちかなりの割合をHalosphaeriaceae科が占めていた(図1)。

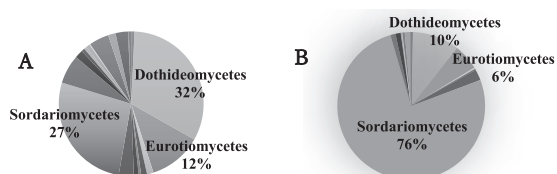


図1 検出されたASVsの内訳(A)、リード数(B)

水深約5700mの房総半島沖深海平原より回収した1試料(スモモ)においては菌類の子実体が確認され、深海生菌類の一つ*Oceanitis scuticella*であることが明らかとなった。(図2)



図2 *Oceanitis scuticella*の子実体が観察された沈木

他試料では子実体の確認はできなかったものの、アンプリコン解析の結果、異なる水深や海域から回収した8試料中(スギ、ヒノキ、アマモ、イチイガシ、スモモ、3種未同定)で*O. scuticella*と100%もしくは高い相同性を示す配列が検出された。このことから*O. scuticella*は広範囲に渡る水深約700～6000mの深海環境中の様々な樹種の植物基質に高頻度で存在することが明らかとなった。また水深5mの浅海(JAMSTEC岸壁、東京湾)より回収したイチヨウからは海生菌類である*Ceriosporopsis halima*と高い相同性を示す配列が優占して検出されたが、深海由来5試料(コナラ、クスノキ、3種未同定)からは、*C. halima*と近縁だが別種と推定される配列(相同性約86%)が優占種として検出された。このことから*C. halima*と近縁な深海種が存在することが示唆された。この配列は相模湾から回収した試料からのみ検出された。また先行研究で南西諸島沖より発見されていた深海生菌類*Alisea longicolla*は、本研究で解析した試料からは検出されなかった。

本研究により、深海底に沈む植物基質中に深海生菌類は予想以上に高頻度で存在していること、Halosphaeriaceae科が優占していること、これまでに発見されていない種も存在していること、樹種特異性はあまりみられないこと、海域により分布の違いがありそうなことなどが明らかとなった。深海環境中における植物由来有機物の分解には、*Oceanitis*属や*Ceriosporopsis*属をはじめとした深海生菌類が大きく貢献していることも予想され、今後はメタゲノム解析やゲノム解析による分解プロセスの解明も含めさらに研究を進めていきたい。

土壤に特異的に優占する難培養細菌門アシドバクテリアのバイオリソース拡充

伊藤 英 臣

【目的】 環境中の核酸ベースの解析から、アシドバクテリア門細菌は海水や河川水といった水圏ではほとんど検出されない一方、土壤圏では普遍的かつ高頻度に検出される、いわば「土壤ならではの細菌群」であることが知られている。それに関わらず、他門と比べてアシドバクテリア門細菌の単離培養例は極めて少なく、基準株も門全体で27属60種しかない（2021年4月時点）。これまでに申請者は土壤そのものを培地として用いた集積培養により新系統の嫌気性微生物を発見してきたが、その中でアシドバクテリア門細菌も多数単離できた。そこで本研究では、考案した培養法を用いて様々な土壤からアシドバクテリアを集中的に単離培養することを試みた。

【方法】 風乾した土壤と蒸留水をバイアル瓶に入れてオートクレーブしたものを集積培地として用いた。そこに微生物接種源として生土試料を添加し、気相を無酸素ガス（ $N_2:CO_2=4:1, v/v$ ）で置換して30°Cで静置培養した。2週間ごとに培養した土壤スラリーを新しい集積培地に植継いだ。継代培養したスラリーをフマル酸を添加したR2A寒天培地に塗布して、30°Cで嫌気培養した。生えてきたコロニーの16S rRNA 遺伝子を解読するとともに、一部の株に関してはコンプリートまたはドラフトゲノムを解読した。代表株を単離した集積培地の土壤と接種源の土壤の組合せは図1に記載した。

【結果・考察】 農耕地土壤、河川の底泥、森林土壤等から基準株との16S rRNA 遺伝子配列の相同性が92.6~99.2%を示すアシドバクテリア門細菌466株が得られた。配列の相同性が98.65%以上の条件でクラスタリングしたところ、466株から21の系統群が構成されたが、基準株と同系統と推定されたものはわずか1つであり、残りの20は新規な系統群であることが判明した。各20系統群の代表株の配列の相同性および系統樹から、本研究から少なくとも1新科7新属20新種のアシドバクテリア門細菌を単離培養できたことがわかった（図1）。2023年3月時点のアシドバクテリアの基準株は63種であり、直近2年間でわずか3種しか増えていないことを踏まえると、本研究によりアシドバクテリアのバイオリソースをかつてないスピードで拡充できたと考えられる。また、本研究ではR2A寒天培地をベースとした分離培地しか試していなかったことから、分離培地の検討次第だけでもさらに多くの新系統を見出せる可能性が高い。さらに興味深いことに、代表株のゲノム解析を行っ

たところ、これまでにアシドバクテリアではほとんど前例のなかった、土壤環境の恒常性や物質循環に関わる重要な機能遺伝子が複数株のゲノム上で発見された。現在、このアシドバクテリアの新規な生態機能について検証実験・分析を進めている。

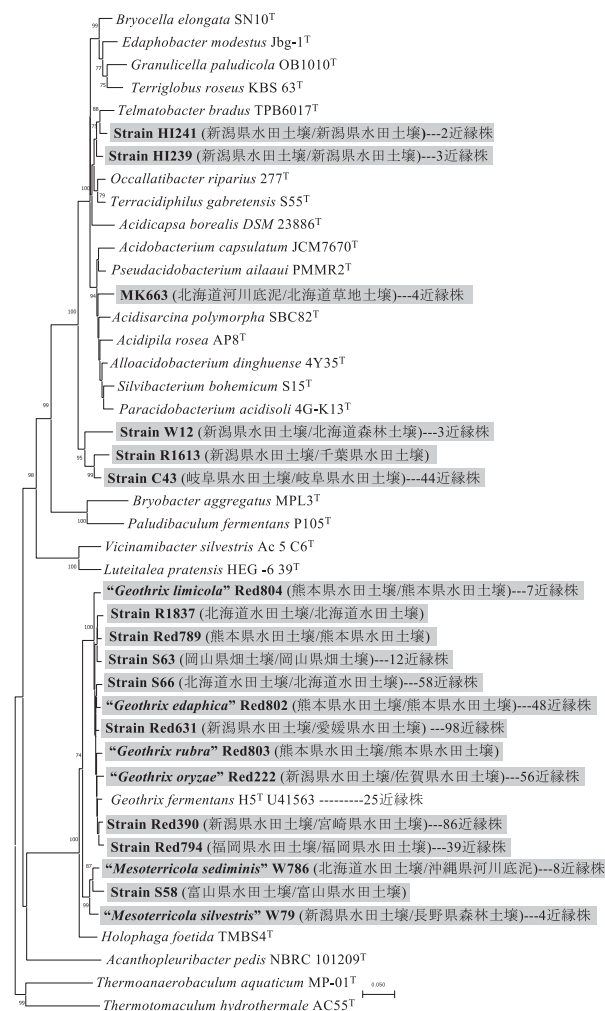


図1 16S rRNA 遺伝子配列に基づくアシドバクテリア門細菌の系統樹。2023年3月時点では基準株は63種であったが、本研究から20の新系統（灰色網掛け、少なくとも1新科7新属20新種）が単離できた。引用符は現在投稿中の論文で提唱中の系統名。括弧内は各新系統の代表株を単離した土壤を示す（集積培地の土壤/接種源（単離源）の土壤）。

各種胆汁酸分子の発芽誘導能を用いた難培養性腸内細菌の分離と 日本人腸内細菌叢カクテルの創製

中山 二郎

【目的】近年、数百種類からなる腸内フローラの構造を遺伝子レベルで俯瞰的に解析する研究スタイルが定着しつつある一方、腸内フローラを細胞や分子レベルでボトムアップに解析する研究は、腸内細菌の分離と培養に高いハードルがあり一筋縄では進行しない。そのような背景のもと、我々は、腸内細菌叢中にて高い占有率を占め、難培養性細菌が多い有孢子桿菌の *Clostridia* 綱細菌の胞子が、グリシン抱合型胆汁酸において高効率に発芽誘導されることを見出し、胆汁酸を用いた難培養性 *Clostridia* の高効率培養法を確立した。そして、その方法を用いて得られた菌種を含めて、日本人の腸内細菌叢をモデル化した人工細菌叢を調製し、食や薬物、そしてプレ・プロバイオティクスの腸内細菌叢に与える影響と腸内細菌叢を介した機能性をインビトロで評価できる系の確立を目的として、以下の研究を展開した (図1)。

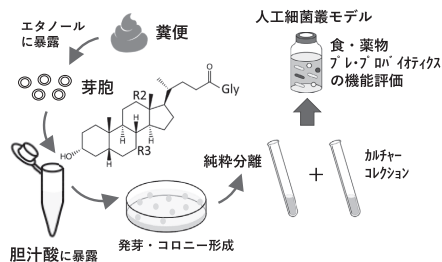


図1 本研究のワークフロー

【方法】

1) 胆汁酸とアミノ酸を用いた難培養性腸内細菌の分離培養法の確立：新鮮便を終濃度35%のエタノールで処理し、栄養細胞を死滅させ、抱合型胆汁酸5種混合物 (GDCAは終濃度0.02%, それ以外は0.1%) および終濃度30mMの各種アミノ酸を添加し、インキュベートした後、GAM寒天培地で72時間嫌気培養し、寒天培地上に生育したコロニーの16S rRNA解析し、菌種解析を行った。

2) 人工腸内細菌叢モデルの構築と評価：1)の分離株を含む日本人の主要腸内細菌16菌種を液体培地中で前培養したものを、各菌の存在比が均一になるよう、各種炭素源を含むAF培地に接種し、37℃、嫌気条件下で回分培養を行った。炭素源として、スターチ、ペクチン、アラビノキシラン、ムチンをそれぞれ加えた。培養後48時間まで経時的に培養液を回収し、OD₆₀₀、pH、16S rRNAアンプリコン配列、各種短鎖脂肪酸濃度を測定した。

【結果・考察】

1) 胆汁酸とアミノ酸を用いた難培養性腸内細菌の分離培養法の確立：各種胆汁酸の発芽誘導能を検証した結果、特にグリシン抱合型胆汁酸において、コントロールと比較して10倍から1000倍のコロニー数の増加が観察された。計642株を単離培養し、系統解析した結果、*Lachnospiraceae*科に属する9種と*Clostridiaceae*科に属する2種の新規候補種を含む計98種が得られた。また、ほぼすべての健常日本人に優先的に存在し、有益代謝物である短鎖脂肪酸の高い発酵能を有する等有益菌として注目されているが、難培養性である *Blautia* 属細菌2種も分離培養に成功した。次に、グリシンが胆汁酸と協調的に孢子発芽能を示すことが一部の細菌で知られているので、我々は他のアミノ酸と胆汁酸の協調作用も調べることにした。結果、アルギニンにて胆汁酸との有意な協調的発芽誘導能が見られた (Onizuka *et al.*, *Microorganisms*, 2021, 9, 1651)。

2) 人工腸内細菌叢モデルの構築と評価：日本人の主要腸内細菌16菌種 (上記にて培養分離された2種の *Blautia* 属を含む) で構成される人工腸内細菌叢カクテルの混合培養系にて、腸内環境に存在する代表的な多糖類をそれぞれ添加し、各細菌種の増殖挙動と培地のpH変化、短鎖脂肪酸の生産量をモニタリングした。菌叢の主成分分析においては、4つの糖源のもと異なる菌叢パターンに変化することが示された (図2)。特に、スターチにおいて全菌の増殖量が顕著に多く、中でも *Bifidobacterium*、*Faecalibacterium*、*Blautia* の増殖が顕著で、酢酸と酪酸の生産が多く見られた。一方、アラビノキシランにおいては *Bacteroides* の増殖が顕著で、プロピオン酸が多く生産されていた。以上より、多糖特異的な代謝を反映する「人工腸内細菌叢モデル」が構築できたことが示唆され、今後、様々な食品成分の腸内複合菌叢における代謝の解析に有効的に利用できるかと期待される。

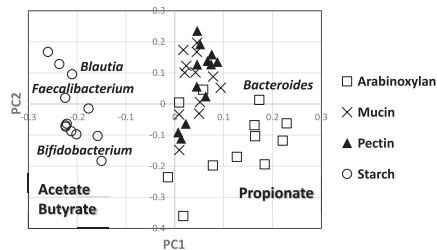


図2 人工腸内細菌叢モデルにおける各種多糖類存在下での菌叢変化の主成分分析と短鎖脂肪酸の生産傾向

地衣類チャシブゴケ属の新しい分類体系構築に向けた試み

橋本 陽

【目的】 子のう菌類と藻類の共生体である地衣類は極地から街中などの身近に存在する。地衣類の最大のグループの一つであるチャシブゴケ (*Lecanora*) 属は抗がん作用のあるアトラノリンなどの地衣成分を生産することで注目されているが、分類学的な複雑性により研究が遅れていること、培養菌株の確立が難しく利用に結びつかない問題があった。チャシブゴケ属を微生物資源として有効利用するためにはその基盤整備が必要である。そこで本研究では、チャシブゴケ属の分類学的再整理の新たな指針と菌株確立による微生物リソースとしての利用可能性の向上を目的に設定した。

【方法】 本研究では主に培養と標本観察を試みた。

培養実験: この手法では、チャシブゴケ属の純粋培養株を試みた。素寒天培地上で発芽させた子のう胞子の純粋性を顕微鏡下で確認し、発芽から2週間後に酵母エキス麦芽培地 (Yeast Extract Agar) でこれを移植し、培養を試みた。なお、一部の菌種は寒天培地上で原因不明の細胞破裂が起こるため、菌糸体での分離を試した。培養3~6ヶ月後に目視で確認できたコロニーの一部からDNA配列決定と凍結保存を行い、標本とのDNA配列の一致 (99%以内の相同性で判断) と凍結保存可能性を確かめた時点で分離株を確立したと判断した。

分子系統解析: 採集直後の子実体からDNAを抽出し、ミトコンドリアSSU (mtSSU) およびITS領域の配列を決定し、前述した培養物との配列同一性を確認した。

発生学的比較: 成熟に至るまでの発生過程の比較により器官のでき方の解明を試みた。

【結果・考察】 本研究では2つの研究成果が得られた。

***Lecanora symmicta* の事例:** 国内から採集された46サンプルの *L. symmicta* 様菌をITS/mtSSU領域に基づきgenotypingを行い、大きく複数のサブクレードを含む2系統 (広義 *L. symmicta* および広義 *L. strobilinoidea*) を認識した。なお、前者には国内に新たに *Lecanora parasymmicta* の分布が確認され、後者は *L. pulverulenta* が属することが判明した。この2系統の子実体構造の比較から、いずれの関連種も菌糸組織が子実下層から求頂的に扇形で発達する共通性を認識した (図1)。

***Lecanora sibirica* の事例:** *Lecanora sibirica* (syn. *L. yasudae*) 様菌25標本から標本抽出したDNAおよび確立した2菌株のDNA抽出物をGenBankに登録された近縁種についてITS-LSU領域およびmtSSU領域の配列を比

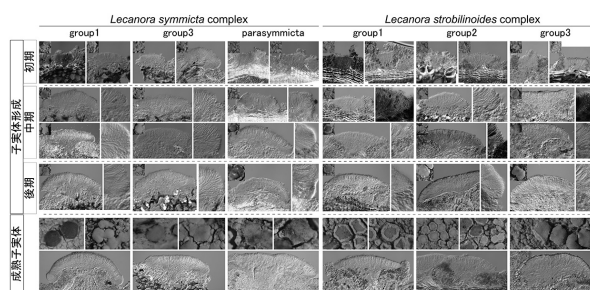


図1 *Lecanora symmicta* 様菌の子実体形成様式の比較

較した。結果として、いずれの領域においても2OTUsが認められ、OTU間では胞子サイズに大きな違いが見られた。即ち、*L. yasudae*には少なくとも国内に2系統が分布することが示唆され、形態的に区別できる本2系統はこの同一ハビタットに混在することが明らかとなった。2OTUsについて子実体形成様式に注目した場合に明瞭な違いは見られなかったが、これは2種間における共通派生形質と捉えることができると考えられた。今後、広義 *Lecanora* 属の解体の際の属の特徴付けに有用である可能性が考えられた。

以上の研究で分離された菌株は理化学研究所バイオリソース研究センター (Riken BRC-JCM) に寄託された (表1)。以上の研究から、子実体形成様式が分類学上一定の情報をもたらすこと、これまでわずかであった地衣類を構成する地衣化菌の分離培養株の確立に成功した。菌株については今後、培養株に基づく二次代謝産物の研究や培養下での地衣体誘導など、さらなる研究の発展に寄与できることが期待される。

なお、本研究の菌糸分離の中で複数の地衣生菌が副次的に分離された。当初はコンタミネーションとして実験遂行上の問題点と考えられていたが、いずれの菌株も科および属レベルで未知系統であることが判明した。未知系統の菌種ゆえ、新規生理活性物質の探索源の点からも興味深い材料として期待される。

表1 寄託菌株と菌種名

菌株番号	学名
JCM:39433	<i>Lecanora pulverulenta</i>
JCM:39434	<i>Lecanora pseudargentata</i>
JCM:39435	<i>Lecanora pseudargentata</i>
JCM:39436	<i>Lecanora sibirica</i>
JCM:39437	<i>Lecanora sibirica</i>

土壤微生物が産生する揮発性有機化合物（VOCs）の 網羅的解析による土壤の微生物性評価法の開発

池 永 誠

【目的】 土壤に生息する微生物間には様々な相互作用が存在しており、環境条件によって常に影響を受けている。これら微生物間の相互作用を理解し、状況を的確に判断できれば、土壤の微生物性評価に繋がる事が期待される。近年、微生物が産生する揮発性有機化合物（Volatile Organic Compounds; VOCs）の多くは、微生物-微生物間（さらに微生物-植物間にも）に様々な作用を及ぼす「情報化学物質」であるという知見が蓄積されてきている。即ち、土壤中では微生物-微生物間においてVOCsを情報化学物質とした相互作用が形成されていると考えられる。しかし、従来の微生物VOCsに関する研究は分離菌を対象としており、微生物集団が産生するVOCsを網羅的に解析した研究は殆ど報告されてこなかった。本研究では土壤微生物が産生するVOCsを網羅的に解析する方法を検討し、土壤の微生物性評価法に資することを目的とした。

【方法】 土壤における微生物VOCsの網羅的解析法として、本研究では①大容量ヘッドスペース（Large Volume Static Headspace; LVSH）法と、②モノトラップ捕集法を検討した。①LVSH法は土壤を専用の容器に入れ、容器中の大容量ヘッドスペースガスを吸引・低温濃縮した後、GC-MSに導入し、土壤そのままの状態微量なVOCsを測定する方法である。分析条件を最適化するため、土壤の使用量・種類、吸引量・回数、土壤のインキュベーション時間、有機物資材添加の有無、カラムへのVOCsの吸着・脱着温度を検討した。検討した条件で、畑土壌と裸地土壌、有機物資材（鶏糞と焼酎廃液を混合・堆肥化した資材（KS））を添加・培養した土壌と、無添加の土壌を分析した。②モノトラップ捕集法は土壤が入った容器のヘッドスペースに、モノトラップを一定時間設置して、土壤から出てきたVOCsを捕集した後、モノトラップからVOCsを加熱解離させ、GC-MSに導入して微量なVOCsを測定する方法である。モノトラップ捕集法では、3種の有機物資材（KS、米ぬか焼酎廃液を染み込ませ乾燥した資材（SF）、米ぬか（RB））を個別に添加した土壌と、比較対象として土壌のみ（比較土）を用いた。各土壌500gを容器に入れ、モノトラップをヘッドスペース中に設置して1週間30℃で静置してから分析に供した。併行して各処理区の土壤細菌の菌叢解析を次世代シーケンスで行った。

【結果・考察】 LVSH法では、複合的に分析条件を検討したものの、VOCsピークはブランクの夾雑ピークと類似しており、十分に微生物VOCsを検出できていなかった。比較的検出感度が優れていた条件は、土壤30g、100mL×5回吸引、カラムへの吸着温度は20℃、脱着温度は180℃であった。この条件で分析した結果、土壤の種類や有機物資材添加の有無で、VOCsパターンに違いが認められた。例えば、畑土壌では2,3-ブタンジオールが検出されたが、裸地土壌では検出されなかった。また、有機物資材を添加した土壌では、無添加に比べ、多くのVOCsピークを検出した。しかし、夾雑ピークの影響が依然大きく、LVSH法による土壤の微生物性評価は困難と判断した。

次にモノトラップ捕集法を検討した。結果、比較土では、VOCsピークが殆ど検出されなかった。これは土壤に微生物が資化する有機物等を加えない限りは、微生物の活動が殆ど生じていないことを意味する。一方、有機物資材を土壤に添加すると新たなVOCsピークが検出され、特にSF土とRB土で顕著であった。また、いずれの処理区からも2-メチルイソボルネオール（2-MIB）が検出された。2-MIBは有機物資材そのものから検出されず、土壤中では主に放線菌が産生することから、有機物資材の添加によって土壤中の放線菌が応答したと推測した。事実、土壤細菌の菌叢解析では、放線菌である*Kitasatospora*属と*Arthrobacter*属の存在比が増加しており、比較対象の土壌で0.4%及び2.4%であった構成比が、SF土では4.9%及び6.8%に、RB土では13.9%及び5.4%に増加していた。他方、各土壌のVOCsパターンと細菌叢（科レベル）を見ると（図1）、両者に関係性が認められたものの、SF土とRB土では異同の程度が異なっていた。これは、施用資材によって土壤細菌の応答が異なることを示しており、微生物性の実態を反映した結果と推測される。以上より、モノトラップ捕集法は土壤の微生物性評価法の一つとして有効な手法と考えられた。

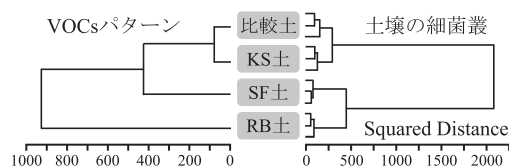


図1 ウォード法によるVOCsと細菌叢のクラスター解析

ワイン発酵におけるプロリン資化抑制機構の理解とその応用展開

西 村 明

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類醸造に用いられ、酵母による原料の資化（細胞内への取込みと代謝）は多様な味・風味を生み出す。プロリン（Pro）はブドウや麦汁などの原料に最も多く含まれるアミノ酸であるが、酵母は Pro をほとんど資化できない。そのため、発酵後も最終製品中に多量に残存し、酒質を低下させることがある。さらに、発酵中の窒素源枯渇を防ぐために、人工窒素源（アンモニウム塩など）の添加が必要となる。この添加物は、ワインの品質に影響を与えるだけでなく、製造コストの増加要因にもなっている。このため、いかにしてプロリンを資化できるかという試みが30年以上前からなされてきた。我々はこれまでに、外部環境に存在するアルギニン（Arg）がPro資化抑制因子として働くことを見出した。さらに、Argはユビキチンリガーゼ Rsp5 とそのアダプター Art3 を活性化し、ユビキチン化を介してProの主要な取込み系トランスポーター Put4 のエンドサイトーシスを誘導することを見出した。しかし、ArgによるPut4エンドサイトーシスのシグナル伝達経路は解明されていない。本研究では、Pro資化抑制に関わる遺伝子群の同定とそれら役割を解析することで、シグナル伝達経路の全容解明を目指した。

【方法】本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* の X2180-1A 株を使用した。プロリン資化抑制活性はプロリン要求性株 (*pro1Δcar2Δ*) の生育と Put4 のエンドサイトーシスから検討した。さらに、Arg 存在条件でも生育可能なプロリン要求性株の全ゲノム DNA シークエンス解析からプロリン資化を制御する遺伝子を同定した。また、細胞内外の Arg や Pro 含量はアミノ酸アナライザーによって、測定した。加えて、PKA 活性は PKA (触媒サブユニットは Tpk1/2/3) によって直接制御されている中性トレハラーゼ活性を指標に検討した。

【結果・考察】まず、Arg 以外の塩基性アミノ酸が Pro 資化能に及ぼす影響を検討したところ、オルニチンやリジンも Put4 のエンドサイトーシスを誘導することで、Pro 資化抑制因子として働くことが分かった。次に、約 10^8 個のプロリン要求性株を Arg が添加されたプロリン単一窒素源培地に播種した結果、塩基性アミノ酸存在下でもプロリン資化が可能な変異株を4株分離した。これら4株の全ゲノム DNA 配列を決定したところ、全ての株で Arg トランスポーター Can1 をコードする遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異 (Gly434Cys, Leu161Pro, Gly224Cys,

Ala379Ile) を見出した。また、これらの Can1 変異体を解析した結果、Arg トランスポーター活性は、Pro 資化抑制の制御と無関係であることが明らかになった。以上より、Can1 は Arg 取込み以外の機能を有することが示唆された。

近年、トランスポーターの中で輸送活性以外に外部環境因子の受容体活性を持つタンパク質が報告されている。このような受容体様の機能を併せ持つトランスポーターは「トランスセプター」と呼ばれ、炭素源応答の主要制御系である Protein kinase A (PKA) シグナルを cyclic AMP (cAMP) 非依存的に活性化する。そこで、Can1 もトランスセプターである可能性を考え、Arg 添加時の PKA シグナルの活性化レベルを検討した。その結果、Arg 添加によって Can1 依存的に PKA シグナルが活性化することが判明した。さらに、PKA の触媒サブユニットである Tpk1/2/3 は通常時 Can1 の TK モチーフに直接結合しているが、塩基性アミノ酸存在下では Can1 から解離することがわかった。以上のことから、Arg は Can1 依存的に PKA を活性化させ、Pro 資化抑制の制御を行っていることが強く示唆された (図1)。

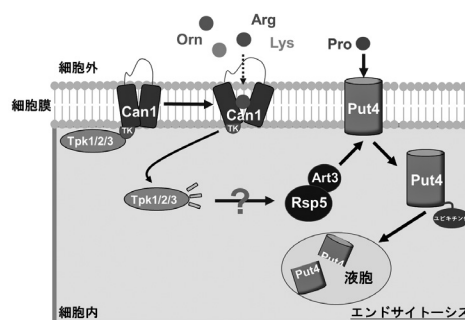


図1 Argによるプロリン資化抑制機構(仮説)

本研究で得られた知見を実用ワイン酵母に応用することで、プロリン含量が低下し、苦みを抑えたすっきりとした味わいのワインの醸造が可能となり、ワインの高品質化に資すると考えている。また、酵母が利用可能な窒素源が増えることで香味性の強化、人工添加物の添加なしのオーガニックなワインが製造可能となり、ワインの高付加価値化に繋がると考えている。

病原細菌のインフラマソーム活性化因子の同定と応用

原 英 樹

【目的】 微生物は様々な pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を発現しており、宿主受容体を介して認識されることで多様な炎症応答を惹起する。一般的な炎症応答は感染防御に寄与するが、近年の研究から一部の炎症応答は感染病態を悪化させることがわかってきた。我々は *Listeria monocytogenes* や *Staphylococcus aureus* などの病原菌が自然免疫機構であるインフラマソーム炎症を積極的に誘導することで生体内増殖を加速し、感染病態を増悪させていることを見出した。インフラマソームは細胞内受容体、アダプター分子 apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)、タンパク質分解酵素カスパーゼ1で構成されるタンパク質複合体であり、炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β) や IL-18 の産生を誘導する。これまでにケミカルリガンドで刺激した際のインフラマソーム構成因子は明らかにされてきたが、感染病態におけるインフラマソーム活性化機序は不明な点が多い。そこで本研究では、グラム陽性菌感染症におけるインフラマソームの活性化機序を解析した。

【方法】 マウス腹腔マクロファージもしくは骨髄細胞から分化誘導したマクロファージに *Listeria monocytogenes* EGD (リステリア) もしくは *Staphylococcus aureus* NUMR101 (黄色ブドウ球菌) を感染させた。インフラマソーム応答の指標として、培養上清中の IL-1 β および IL-18 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。また、細胞懸濁液および上清中の活性化型カスパーゼ1p20 をウエスタンブロット法で検出した。感染により活性化したリン酸化酵素はリン酸化タンパク質を特異的に検出する抗体を用いてウエスタンブロット法で特定し、該当するリン酸化酵素に特異的な阻害剤で細胞を処理することでリン酸化の影響を調べた。感染症モデルとして、C57BL/6 マウスにリステリアもしくは黄色ブドウ球菌を経静脈感染させマウスの生存をモニターした。血清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定し、感染臓器をホモジナイズし寒天培地に塗布することで臓器内菌数をカウントした。阻害剤は感染後に腹腔内に投与した。

【結果・考察】 マクロファージにリステリアを感染させると病原因子 listeriolysin O (LLO) 依存的にインフラマソームが活性化したことから、菌の病原性とインフラマソーム応答に相関性があることが判明した。また、

LLO が spleen tyrosine kinase などのリン酸化酵素を活性化することで ASC のリン酸化を促し、インフラマソーム応答を亢進していることを見出した。世界規模で病原細菌の薬剤耐性化が進行しており、国内では特に黄色ブドウ球菌臨床株の70%以上が薬剤耐性を獲得していると言われている。そこで、リステリアと同じグラム陽性菌に属する黄色ブドウ球菌がどのような機序でインフラマソームを活性化しているのか検討を行った。その結果、黄色ブドウ球菌は c-Jun N-terminal kinase (JNK) などのリン酸化酵素を活性化することでインフラマソーム応答を亢進していることが判明した。そこで、薬剤耐性黄色ブドウ球菌をマウスに感染させたのちに JNK 阻害剤を投与し臓器内菌数と生存率を観察した。その結果、興味深いことに、JNK 阻害剤投与群では血清中の IL-1 β が低下しており、肝臓における菌数もコントロール群と比較して減少していた (図1)。

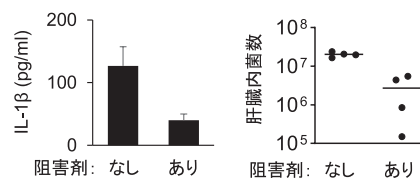


図1 黄色ブドウ球菌感染におけるJNK阻害効果

また ASC 欠損マウスに黄色ブドウ球菌を感染させると野生型マウスと比較して臓器内菌数が減少し感染抵抗性を示すことが判明した (図2)。

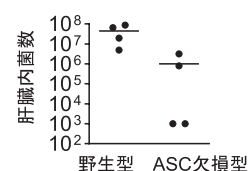


図2 黄色ブドウ球菌感染におけるインフラマソーム応答の影響

以上の結果から、薬剤耐性黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性病原菌の治療標的として新たにインフラマソーム経路の阻害が有効であることが明らかとなった。今後、インフラマソーム阻害薬の開発と感染症治療への応用が期待される。

幅広い単細胞生物のイオンチャネルの構造と機能から 根源的な情報伝達手段であるイオン透過の成り立ちに迫る

入江 克雅

【目的】 イオンの透過による電気刺激は生命の最もシンプルで根源的な情報伝達手段である。原核生物においても Nav (BacNav) は、外部刺激に応答し細菌の遊走方向を調節する。我々が同定した Nav と Cav の共通祖先の特徴を有するチャネル群である AncNav (Ancestor like BacNav) と、単細胞真核生物である珪藻などから同定された EukCat (Eukaryotic single domain Cation channel) というホモ四量体型のチャネル群は、イオンチャネルの進化において AncNav は太古、EukCat と BacNav はそれぞれ真核生物と原核生物の現在の起点と捉えることができる (図1)。そこで、これらのチャネルの変異体も含めた構造と機能を解析し、普遍的なイオンの選択性の構造基盤の成り立ちの解明を目指す。

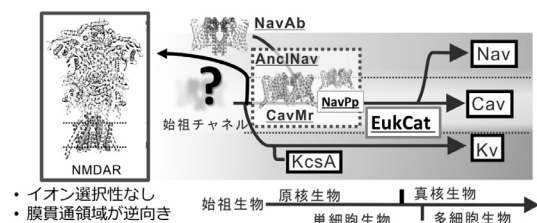


図1 イオンチャネルの進化系統樹
AncNav はイオン選択性チャネルらの分岐点にあり様々なチャネルの特徴を取り入れることができる。

【方法】 イオン選択性の解析には水和イオンの水和水の配置をチャネルの透過経路内に再現できるかを評価することが重要である。この解析には2フェムト秒ごとに分子のふるまいを記述する分子動力学計算が適する。そして、この計算のためにはチャネルの構造を知る必要がある。そこで、電子顕微鏡や大型放射光施設を用いた構造解析・スーパーコンピュータを利用した分子動力学計算によるイオン透過過程の解析・電気生理実験による活性測定、といった手法を駆使してイオンチャネルの立体構造とチャネル内のイオンの動態を解析し各イオンの選択性の分子基盤とその成り立ちを明らかにする。まず、これらのホモログの一次配列の解析を行い、特徴的な配列を持つものを優先的に機能解析する。さらに、電気生理実験による機能解析により、イオンチャネルの進化の過程に繋がる機能変化を明らかにし、構造基盤を解明する。

【結果・考察】 アミノ酸配列の解析から EukCat の中に CatSper と相同性が高いホモログが見つかった。CatSper

は精子に特異的に発現するカルシウムチャネルであり、精子の遊走性に関わるチャネルである。CatSper は四量体型のチャネルであるがそれぞれのサブユニットのアミノ酸配列は異なる。CatSper の四つのサブユニットのそれぞれに高い相同性をもつ EukCat が存在することを見出し、CatSper のサブユニット I に相同性の高い *Allomyces macrogynus* (JGI 4951) 及び *Schizochytrium aggregatum* (CAMPEP 0191604132) 由来の EukCat, サブユニット II に相同性の高い *Gloeochaete wittrockiana* (CAMPEP 0194025564) 及び *Gonapodya prolifera* (A0A139A5W7) 由来、サブユニット III に相同性の高い *Cyanophora paradoxa* (Contig39524) 由来、サブユニット IV に相同性の高い *Rhizoclostridium globosum* (JGI 852918) 及び *Thecamonas trahens* (XP 013753028.1) 由来の EukCat の遺伝子を合成し機能解析を進めている。

また、AncNav の一種である NavPp が Ca イオンによる活性阻害を受けることを見出しており、機能解析によって同様の阻害を受ける NavAb 変異体を作成した (図2)。二価カチオンによる活性阻害はイオンチャネル型受容体である NMDA 受容体の Mg イオンによる活性阻害が有名であるが、詳細な分子機構ははまだ不明である。イオンチャネル型受容体の特徴を導入できたことから原核生物チャネルへの機能創出の有用性が示された。

さらに、NavAb 変異体で Ca イオンによる強い阻害を受ける L176Q 変異体と弱い阻害を受ける L176G 変異体

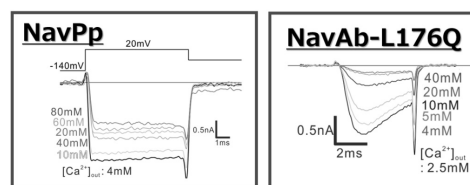


図2 NavPp と NavAb 変異体による内向き電流
野生型で Ca イオンによる阻害を受ける NavPp の特徴を点変異の導入により NavAb に移植することに成功した。

の結晶構造解析を行った。この構造から阻害を受ける変異体ではチャネル内腔への入り口の Ca イオンの滞在が観測され、これが電流阻害の原因になっていると考えられた。阻害が起こる変異は親水性に富む残基や嵩の低い残基であったため、チャネル内腔の親水性の向上が Ca イオンの内腔での安定化に寄与すると考えられた。

真核微生物の細胞表層糖鎖マーカーとしての 酸性糖鎖の選別機構と生理的役割の解明

竹 川 薫

【目的】真核生物の細胞表層糖鎖は、細胞間認識の「バーコード」の機能を果たしている。通常は糖鎖の末端部分に酸性基（高等動物ではシアル酸など）が付加して細胞表面を負電荷にしている。出芽酵母は糖鎖中にリン酸基を酸性糖鎖として持つが、その機能については不明な点も多い。分裂酵母は、糖鎖の非還元末端にガラクトース（Gal）が付加する。糖鎖末端のGal付加はゴルジ体に局在するGal転移酵素が関与するが、さらにGalへ酸性基のピルビン酸が付加する（PvGal）。しかし、その詳細な生合成経路や機能は未解明であった。そこで、本申請研究では糖鎖へのPvGal付加を担うGal転移酵素とピルビン酸転移酵素の解析を行い、PvGalの生合成機構と生理的役割について解析を行なった。

【方法・結果・考察】分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 糖鎖中の α 1,2-および α 1,3-結合のGalを付加する推定 α -Gal転移酵素（GalT）は、分裂酵母ゲノム上に計10遺伝子が存在する。申請者らが取得したGalTの10重遺伝子破壊株（ Δ 10GalT）に各GalT遺伝子を単独で導入した株を作成し、それらの株の糖鎖構造を比較解析することにより各GalTの基質特異性の解明を目指した。その結果、Gma12, Gmh1, Gmh2, Gmh3, Gmh6, Otg2, Otg3が単独でGal転移活性を示すことが明らかになった。またGma12とGmh6はO-結合型糖鎖へ、またGmh1-3はN-結合型糖鎖へGalを付加することがわかった。さらにOtg2, Otg3はO-結合型糖鎖のマノース2糖に対して活性を示した。しかし α 1,3-GalTのOtg2, Otg3と高い相同性を持つOtg1は、GalT活性を示さなかった。そこで、Otg1と α 1,2-GalT（Gma12, Gmh1, Gmh2, Gmh3, Gmh6）を同時に導入した株を作成し、それらの株の糖鎖構造を比較した。その結果、Otg1はGmh6と共発現することによって、Gal転移活性を示した。以上の結果から、分裂酵母におけるGal鎖には各糖転移酵素の基質特異性に基づく一定の合成経路が存在することが明らかになった。

分裂酵母糖鎖中の β 1,3-結合Gal残基はN-結合型糖鎖のみに存在する。また、非性的な凝集反応の抑制に重要なピルビン酸が付加されるのは β 1,3-結合のGalのみであり、野生株において全ての β 1,3-Galがピルビン酸の付加を受ける。以上のことから、 β 1,3-結合のGalは糖鎖のピルビン酸化に重要な分子である。これまで、 β 1,3-

結合のGal転移反応の分子メカニズムは不明であり、糖転移酵素も未同定であった。先行研究によって分裂酵母の糖鎖中に β 1,3-Galが付加されない変異株が取得され、 β 1,3-Gal転移反応に関与する機能未知タンパク質Pvg2, 3, 5が同定された。そこで、PANTHERやCAZyなどのデータベースを用いて各タンパク質のドメインを検索したところ、3つのタンパク質は全て一回膜貫通ドメインを有する典型的なII型膜貫通タンパク質でゴルジ体に局在することがわかった。さらに、Pvg3のみが糖転移酵素に保存されているGT31ドメインを有しているため、Pvg3がGal転移酵素であると予想された。そこで、GalT活性に重要と考えられるアミノ酸の点変異体（D212, D282）を作製して *pvg3 Δ* に対する機能補補試験を行った結果、これらの変異体は正常にゴルジ体に局在したが、細胞表層のピルビン酸を欠失していた。以上の結果から、Pvg3が β 1,3-Gal転移酵素であり、D212およびD282残基が活性に重要であることがわかった。

次にYeast Two-hybrid法を用いてPvg2, Pvg3, Pvg5各タンパク質の相互作用を調べた結果、Pvg3とPvg2はPvg5とのタンパク質相互作用が観察されたため、Pvg5を中心としたPvg3-Pvg5-Pvg2ヘテロ複合体の形成が示唆された。さらに β -結合Galへピルビン酸付加を担うPvg1/ピルビン酸転移酵素とPvg5が相互作用することが明らかになった（図1）。以上の結果から、PvGalの合成がPvg5を中心としたヘテロ複合体の形成を介して連続的に起こることが示唆された。

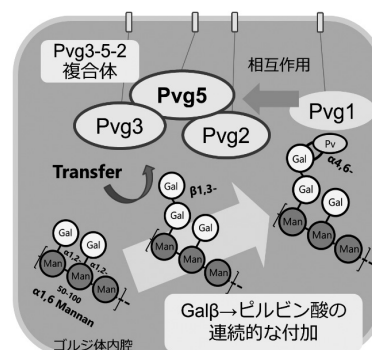


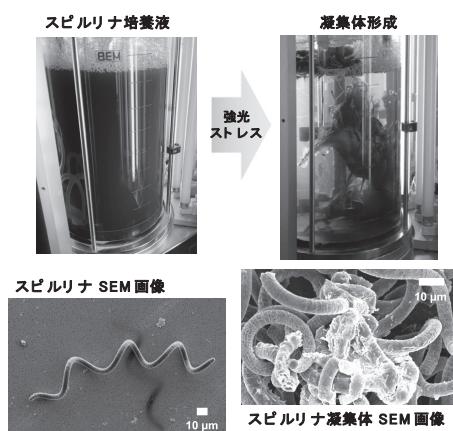
図1 Pvg5を中心とした分裂酵母Gal転移酵素複合体とPvGal生合成機構

スピリリナ強光培養時に確認されたアルカリバチルスの出現メカニズムの解析

渡 辺 智

【目的】糸状性藍藻スピリリナ (*Arthrospira platensis*) はタンパク質をはじめとする栄養素や色素を豊富に含む糸状性の可食藍藻類である。高塩、高アルカリ環境を好むという特徴を利用し開放系大規模培養が行われているが、スピリリナ生産の現場ではスピリリナの細胞凝集と、それに伴う品質低下が問題となっている。

これまでの我々の研究から、スピリリナ *Arthrospira platensis* NIES-39 株を強光ストレスに曝すことにより凝集体形成が促進されること (図1)、さらに凝集体には好アルカリ性のバチルス菌 (以後、アルカリバチルス) が出現することが明らかになった (図2)。本研究ではなぜ、どのようにしてアルカリバチルスが出現したのか、スピリリナの凝集体出現メカニズムを解明することを目的として研究を実施した。



スピリリナの培養の様子 (上) とそれぞれの培養菌体の走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像 (下)

図1 強光ストレスによるスピリリナ凝集体形成

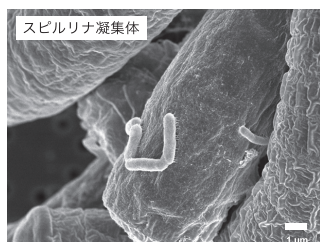


図2 スピリリナ凝集体に観察されたアルカリバチルスの SEM 画像

【方法】スピリリナ *Arthrospira platensis* NIES-39 の培養には SOT 培地を用い、全て滅菌処理した試薬、培地を用いて実験を実施した。強光ストレスは通常光

($60\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)、2%CO₂ バブリング条件で一週間培養した培養液を強光条件 ($600\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) に移して付与した。強光ストレス時のアルカリバチルスの出現時期について 16S rRNA の v1v2 領域および v3v4 領域をターゲットとしたアンプリコンシーケンスにより解析した。また PacBio シーケンサーを用いてスピリリナ凝集体から単離されたアルカリバチルスの全ゲノム配列を決定した。アルカリバチルスの出現メカニズムを明らかにするため、スピリリナ細胞内の代謝産物量をメタボローム解析により比較した。また凝集体に含まれる成分を熱水抽出し NMR により分析した。アンプリコンシーケンスは生物技研に、メタボローム解析は HMT に委託した。

【結果・考察】ゲノム解析の結果、アルカリバチルス二種のドラフトゲノム情報を取得した。当該細菌はアルカリ塩湖で見つかった *Alkalihalobacillus krulwichiae* および *Alkalihalobacillus pseudofirmus* と同種であることがわかった。これら二種を *A. krulwichiae* TUA1、*A. pseudofirmus* TUA1 として以後の実験に用いた。強光ストレス時のアルカリバチルスの出現時期を調べると、ストレス処理前の培地では全く検出されなかったのに対し、強光ストレス条件に移して約一週間後、高アルカリ化 (pH 11) した培養液から突如としてバチルス属細菌群が検出された。

スピリリナ細胞内の代謝産物量を比較した結果、強光ストレスに曝した細胞では解糖系や TCA 回路など、中央代謝系の代謝産物量が顕著に減少することがわかった。これに対し、凝集体からはグリコーゲン主成分をした多糖が多く検出された。

スピリリナ培地である SOT 培地を用いて *A. krulwichiae* TUA1 および *A. pseudofirmus* TUA1 の増殖試験を実施した。グルコース、グリコーゲンの資化能を比較した結果、*A. krulwichiae* TUA1 はグルコースの添加依存的な増殖を示したのに対し、*A. pseudofirmus* TUA1 はグルコースよりもグリコーゲンを添加した際に良好な生育を示した。つまり、両者はグルコースとグリコーゲン資化能に明確な違いがあることが示された。

上記の結果より、アルカリバチルスはストレスにより損傷したスピリリナ細胞より漏出したグリコーゲンおよびグルコースを栄養源として出現すると考えられた。

現在、アルカリバチルスの胞子に着目して研究を進めており、今後、発芽誘導のメカニズムを明らかにすることでアルカリバチルスの出現に関わる原因をさらに絞り込むことができると考えられる。

ビフィズス菌のヒト腸管共生・相互作用因子の構造生物学的解析

伏 信 進 矢

【目的】 ビフィズス菌はヒトの健康に資する善玉菌として有名だが、その中でも *Bifidobacterium bifidum* は、菌体外に数多くの糖質分解酵素を持ち、それらが多糖を分解するだけでなく、ヒト腸管の糖タンパク質であるムチンに結合して腸管の定着に寄与している。さらに、菌体外酵素の分解物を他のビフィズス菌に分け与えて増殖を助ける「クロスフィード」を行うことが知られている。本研究では、複数の構造生物学的手法を併用して、*B. bifidum* の菌体外糖質分解酵素のマルチドメイン構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】 *B. bifidum* JCM1254 株のシアリダーゼ (SiaBb1, SiaBb2, SiaBb3), スルホグリコシダーゼ (BbhII), B型抗原特異的 α -ガラクトシダーゼ (AgaBb) の遺伝子を共同研究者 (片山高嶺教授, 芦田久教授) より提供していただいた。これらのマルチドメイン酵素の全長および部分的なドメイン構造の発現プラスミドを作成し、大腸菌で発現、精製したタンパク質をX線結晶構造解析, クライオ電子顕微鏡解析, X線小角散乱 (SAXS) 解析に用いた。

【結果・考察】 3種のシアリダーゼのうち、SiaBb3はGH33シアリダーゼドメインとGH123 *N*-アセチルガラクトサミニダーゼドメインを含む二機能性酵素である。SiaBb3のGH123ドメインと反応産物GlcNAcの複合体構造を高分解能で決定した (図1A)。さらに、クライオ電顕により、GH123と β -サンドイッチドメインの構造も決定できた (図1B)。GH33シアリダーゼドメインとその他のドメインについては現在構造解析を進めている。残りの2種のシアリダーゼでは、SAXSにより溶液中のマルチドメイン構造を推定した (図1C)。

SiaBb1はGH33ドメインとそれにつづく2つのSGNH (エステラーゼ) ドメインとLamGの合計4ドメ

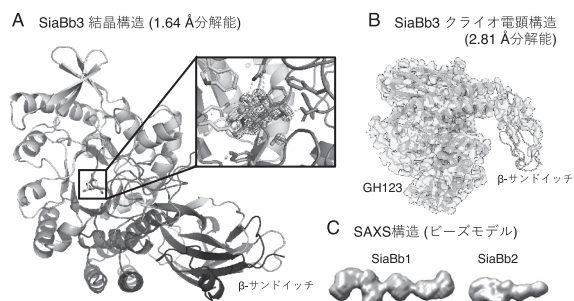


図1 SiaBb1, SiaBb2, SiaBb3 シアリダーゼの構造

インの立体的な配置が確認できた。SiaBb2はGH33ドメインとそれに続く付加ドメインが観察された。

新規に発見されたスルホグリコシダーゼであるBbhIIにおいても、結晶構造解析に成功した (図2A)。GH20触媒ドメインにはGlcNAc-6Sが結合しており、基質認識と触媒機構が明らかになった。それに加えてN末端側のCBM32ドメインにもGlcNAc-6Sの結合が確認され、これが新規な糖質結合ドメインであり、ムチンの硫酸化GlcNAcに結合して腸管定着に寄与していることが示された。また、ヒトのB型の血液型抗原に特異的な α -ガラクトシダーゼであるAgaBbも構造解析に成功した。結晶構造ではGH110のコアドメインに加えて、2つの β -サンドイッチドメインが明らかになった。ゲル濾過解析により、そのC末端側の構造未決定のドメインがAgaBbを二量体化させることが分かったため、全長のAgaBbのクライオ電顕を行ったところ、二量体と見られるマップが観察された (図2B)。

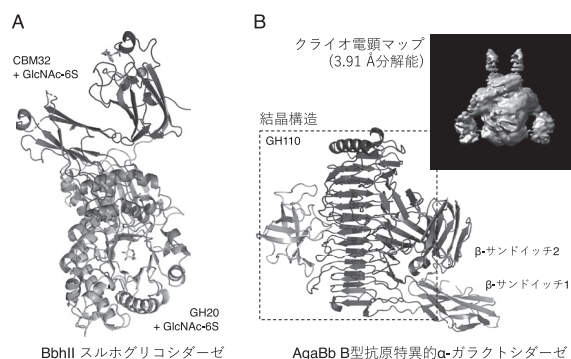


図2 BbhIIとAgaBbの構造

このように、*B. bifidum* の巨大な菌体外マルチドメイン酵素についてクライオ電顕、結晶構造解析、SAXSを組み合わせることで、その立体的な構造と、ヒト腸管の糖タンパク質への結合・認識機構を部分的に明らかにすることに成功した。

本研究は高橋宏太氏、鹿島騰真博士らと共同で行った。構造生物学的解析はKEK物構研でAMED-BINDSの支援を得て行った (課題番号2114,3073,3181,4450)。データ測定はKEK-PFおよびSPring-8で行った。SAXS解析は清水伸隆教授、クライオ電顕解析は廖増威氏、池田聡人博士、稲葉理美博士、守屋俊夫特任准教授、安達成彦特任准教授、川崎政人准教授、千田俊哉教授が行った。

環境メタゲノムから発見した新規な遺伝子発現調節機構の解明と生理学的意義

末 永 光

【目的】 真核生物、特にヒトを含む進化した動植物のゲノム上には、同一配列が繰り返す「反復配列」が存在することが知られているが、そのほとんどが未だに機能不明である。反復配列は、微生物ゲノム配列中においても、遺伝子内領域・遺伝子間領域を問わずあらゆる部位で発見されてきており、それはメタゲノム配列においても例外ではない。我々はこれまでに、芳香環を多量に含む環境に棲息する微生物集団のメタゲノム解析を行い、芳香環変換酵素の網羅的な取得を行ってきた。その過程において、芳香環開裂酵素であるカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ (C23O) 遺伝子上流に存在する、5'-T(G/A)ACATG(A/C)T-3' からなる連続した9塩基ユニットの縦列反復配列 (Metagenomic Tandem Repeat : MTR_n とよぶことにする) と、その繰り返しの多型 (n=3, 4, 5) を偶然に発見した (図1)。ここで我々は、MTR_n のくり返しは偶発的に生じたものではなく、生命にとって何か意味があるものであろうと推測した。そこで本研究においては、MTR_n の機能を解明し、その生物学的な意義・役割を推測することを目的とした。

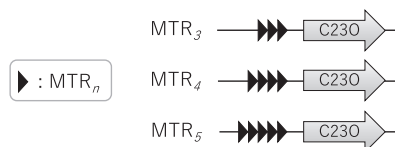


図1 メタゲノムから発見した MTR_n 配列

【方法】 C23O 遺伝子上流に、様々なくり返し数 (n=1~7) の MTR 配列を付加した DNA 断片を合成し、pUC ベクターに連結し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。IPTG で発現誘導後に、培養した菌体を破碎し、一定のタンパク量の基で C23O 酵素活性を測定した。基質であるカテコールは、C23O 酵素の働きによって黄色を呈する環開裂化合物に変換されるため、容易に酵素活性が測定可能である (図2A)。さらに、本現象のメカニズムについて解明するために、SDS-PAGE および定量 RT-PCR を行い、翻訳・転写レベルでの解析を行った。

【結果・考察】 C23O 酵素活性の解析の結果、MTR_n のくり返し数の違いによって、カテコール分解産物の生成量が異なることが明らかとなった (図2B)。SDS-PAGE 解析を行い、C23O 酵素の活性とタンパク質の発現量の相関関係を確認した。さらに、*Pseudomonas putida* KT2440 株や、

真核生物の *Saccharomyces cerevisiae* YPH500 株においても、また C23O 以外の遺伝子においても同様の現象が確認されたことより、本配列は、生物において汎用的に機能する遺伝子発現調節システムであることが示唆された。次に定量 RT-PCR により、大腸菌内における C23O mRNA 量を解析した結果、MTR_n の繰り返しの数によって、菌体内リボヌクレアーゼによる C23O mRNA の分解速度に差異が生じることが示された。したがって、MTR_n は mRNA の構造の安定性に影響を与えることによって、下流に存在する遺伝子の発現量をコントロールしていることが明らかになった。

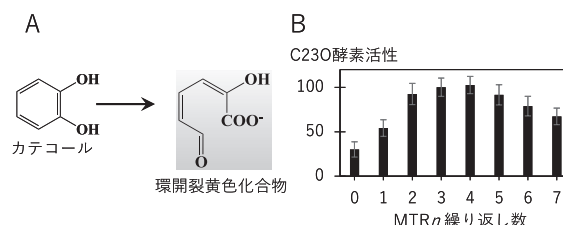


図2 C23O の酵素反応

それでは、本反復配列の生物学的な意義・役割は何であろうか? 本配列は、芳香環を多量に含む環境のメタゲノム配列中において、C23O 遺伝子上流に存在し、その遺伝子発現量をコントロールしていることより、芳香環中間代謝産物のなかでも比較的毒性の強いカテコール化合物の分解を促進するために機能していることが示唆される。つまり反復配列は、生物にとっては毒と成り得る化合物が豊富に存在している、宿主にとってはある種の極限的な環境において発動している環境適応機構のひとつであると考えられる。微生物の環境適応機構については、プラスミドやトランスポゾンなどの可動性遺伝因子が良く知られている。微生物は過酷な環境で生存するために、これらに加えて二重、三重にその対応策を講じていることが推察される。

今回発見した MTR_n は、由来生物種が不明ながらも、原核生物および真核生物における遺伝子発現システム上で、遺伝子発現をコントロールする機能を発揮した。このことは、MTR_n は微生物にとどまらず、動物や植物など幅広い宿主生物においても同様の現象をもたらす可能性が高いことを強く示唆している。つまり、タンパク質の大量発現や遺伝子発現のファインチューニングのための、新規な合成生物学的装置となる可能性をも秘めており、バイオテクノロジーへの転用も期待できる。

ストレス検知の場としてのオルガネラ膜： 細胞内膜の相分離を利用した細胞成長調節システムの分子基盤

松 浦 彰

【目的】種々のストレスに直面した細胞は、成長速度を一時的に低下させ適応後に再び成長を回復する。この制御はタンパク質合成速度の調節を介してなされるが、ストレスの違いによらずタンパク質合成速度を制御する共通の仕組みは未解明である。真核生物においてタンパク質合成ひいては細胞成長を制御するTORC1 (Target of Rapamycin Complex 1) 経路の活性は、リソソームや液胞の膜上で活性化され、種々のストレス時に一時的に抑制される。我々は出芽酵母 TORC1 のストレス時の機能解析の過程で、プロテインキナーゼである TORC1 とその主要標的である Sch9 (哺乳類 S6K ホモログ) がストレス後に大きく細胞内局在を変化させ、それに伴ってタンパク質合成活性の切り替えが生じていることを見出した。さらに我々は、この様な膜上のタンパク質局在変化がオルガネラ膜脂質の相分離による偏在と関連していることを発見した (図1)。これらの知見から、「オルガネラ膜脂質分布変化は細胞内生理状態の鋭敏なセンサーであり、生物はそれを利用して自身の生合成活性を最適化している」という仮説に至った。

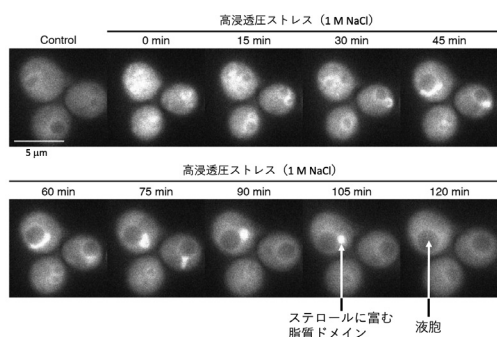


図1 出芽酵母において高浸透圧処理後に形成される液胞膜ドメインの蛍光顕微鏡画像

液胞膜リン脂質 PI (3, 5) P₂ の合成に関わる Fab1 の欠損株では、Sch9 の膜局在が抑制されることがミシガン大学の Weisman らにより明らかにされている。そこで本研究では、高浸透圧応答時の TORC1 下流経路の活性制御における PI (3, 5) P₂ の機能を探るための実験を行った。

【方法】Sch9 の細胞内局在性およびリン酸化状態の検出には、それぞれ GFP (green fluorescent protein) タグ、HA (hemagglutinin) タグを有する Sch9 を発現する株を用いた。オーキシンドェグロンによる Fab1 タンパク質の発現抑制は、AID2 (Auxin-induced degron 2) システ

ムを発現する株においてゲノムの *FAB1* コード領域の終止コドン直前に mAID (mini AID) タグ配列を挿入し、オーキシシアナログ 5-Ph-IAA を添加することで行なった。細胞質 pH の人為的調節は、細胞外液を任意の pH に調整した緩衝液に置換し、その後 H⁺ に対するイオノフォア 2,4-ジニトロフェノール (DNP) を添加することにより行なった。

【結果・考察】まず、Fab1 阻害剤の添加もしくはオーキシシンドェグロンにより Fab1 を除去した条件における Sch9 の動態を観察した。その結果、上記条件でもストレス応答過程で Sch9 が存在する膜ドメインが通常通り観察されること、またその過程で Sch9 の活性が正常に調節されていたことから、PI (3, 5) P₂ の新規合成自体は正常なストレス応答に必須ではないことが明らかになった。

そこで、すでに存在している PI (3, 5) P₂ 自体がストレス状態のセンサーとなっている可能性について検討した。細胞がストレスに曝露された場合に、細胞質の pH が一時的に低下することが知られている。DNP を用いて細胞質 pH を人工的に低下させたところ、Sch9 の液胞膜局在が減少し、TORC1-Sch9 経路の活性が抑制された (図2)。

本研究の開始当初は、膜脂質分布の偏在自体がストレスシグナルの需要もしくは伝達に関わっていると想定していたが、本研究の結果から、実際には膜上のリン脂質の荷電状態変化がその過程に関わっていることが示唆された。すなわち、細胞に対するストレスが細胞質の pH 低下へと情報変換され、オルガネラ膜に存在するイノシトールリン脂質の荷電状態がそのセンサーとなって細胞成長を調節するプロテインキナーゼの活性が調整されるという、オルガネラ膜を受容体とする新奇情報伝達経路が存在していることが示された。

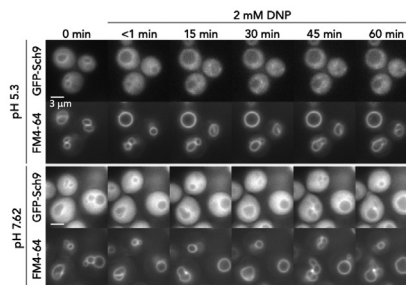


図2 細胞質酸性化後の Sch9 液胞膜局在性の蛍光顕微鏡画像。DNP 処理により細胞質 pH は外液 pH と平衡になる。FM-4-64 は液胞膜を特異的に染色する。

多細胞システムの機械受容シグナル伝達機構に関わる複数イオンの解明

森本 雄 祐

【目的】 われわれヒトを含むほとんどの生物は、メカノセンシングと呼ばれる、外環境からの機械的な刺激に应答するための様々な機構を持っている。生物個体が危険を察知するために重要な機構であるだけでなく、組織、細胞、細胞内小器官、分子のそれぞれのステージにおいてメカノセンシング機構が保持されており、細胞運動、細胞分化、分子活性などに広く働いている。メカノセンシングにおいて Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして働いていることは、培養細胞や組織レベルでよく知られているが、そのシグナル伝達機構の詳細は十分に理解されていない。土壌生物である細胞性粘菌は、通常はアメーバ状の単細胞生物として分裂増殖しているが、飢餓状態により多細胞体形成を容易に誘導できる。本研究課題では、細胞性粘菌を用いて、多細胞システムのメカノセンシングにおいて、どのようなイオンが働いているか、各イオンの役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 カルシウムセンサーとして働く蛍光プローブタンパク質 GCaMP6s を細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の AX2 株に発現させ、栄養培地から寒天上に移すことによって多細胞体を構築させた。蛍光顕微鏡上で、多細胞体を機械刺激し、刺激前後の細胞質 Ca^{2+} 濃度変化をモニターした (図1)。計測データは、多細胞体の前方及び後方に分けて解析を行った。



図1 細胞性粘菌の機械刺激応答計測

【結果・考察】 蛍光プローブ GCaMP6s を用いたイメージングにより、外部から機械刺激を与えることで、細胞性粘菌の多細胞体を構成する各細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇することが明らかになった。多細胞体の前方部と後方部に分けて解析したところ、前方部がより効率的に強く応答していることが明らかとなった (図2)。

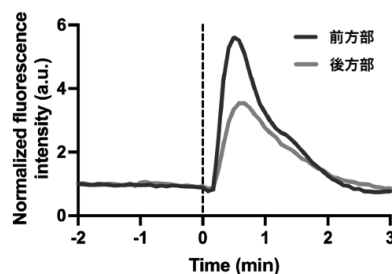


図2 細胞性粘菌多細胞体の機械刺激応答

細胞性粘菌の多細胞体は、前方部を振りながら、周りを探索するように動いているため、前方部に効率的な応答機構があるものと考えられる。また、機械刺激に伴う Ca^{2+} の流入経路を特定するために、小胞体に存在する IP3 (イノシトール三リン酸) 受容体ホモログ IplA 欠損株、ヒト細胞にも保存されている機械受容チャネル Piezo 欠損株をそれぞれ用いて計測を進めたところ、多細胞体において、IplA チャネルは部分的に機械刺激に寄与しており、Piezo チャネルはほとんど寄与していないことが明らかとなった。これは、単細胞期での機械刺激応答に Piezo が大きく寄与しているとする過去の報告と異なっている。このことは、細胞性粘菌が単細胞から多細胞システムへと分化することによって機械刺激応答シグナル伝達経路が変化するが、どちらの状態においても Ca^{2+} シグナルを共通して利用していることを示している。この結果は、単細胞と多細胞でのシステムの違いを理解するために重要な知見となると考えられる。

多細胞体の機械刺激応答時に、 Ca^{2+} 移動とともに変動することが知られている H^+ に注目し、pH 感受性蛍光タンパク質 SEpHluorin を用いて細胞質 pH をモニターした。しかし、機械刺激に応じて Ca^{2+} のような変動は pH では見られなかった。この結果は、機械刺激に応じて変動するのは Ca^{2+} 特異的なものであり、イオン流としてよりセカンドメッセンジャーとしての役割が大きいことが示唆された。今後は、前方部と後方部においてどのようにして機能の違いを作っているのか、メカノセンシングと通常の細胞集団運動において Ca^{2+} シグナルをどのように使い分けているのか、またはシグナルを併用しているのかといった疑問を明らかにすることにより、多細胞システムの細胞集団運動におけるシグナル分子機構を解明していく必要がある。

出芽酵母可視化スクリーニングによる活性化ステロール 分布領域制御因子の特定と制御機構の解明

岸本 拓磨

【目的】真核生物のステロール分子は、主に細胞膜に内包され、膜外物質との接触が制限されているが、膜環境の変化により二重膜表面に露出する活性化ステロールという物理状態を示す(図1)。活性化ステロールは、細胞質分子や細胞外分子との相互作用の確率を高めるため、様々な生命現象に影響を与える可能性があり、その機構の解明は重要な課題である。我々は、*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母)のエルゴステロール(Erg)の活性化状態を顕微鏡下で可視化する蛍光タンパク質プローブGFPen-D4Hを開発し、効率的な検出方法を確立した。本課題では、GFPen-D4Hを用いてErg活性化に関わる遺伝子を探査し、その遺伝子解析によりステロール活性化機構の解明を目指した。

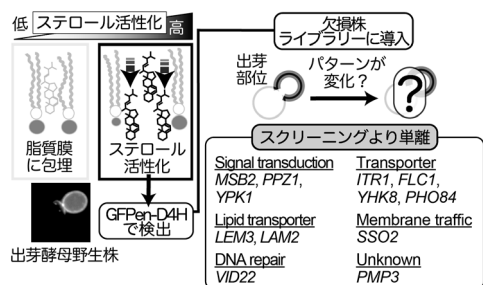


図1 GFPen-D4Hを利用した活性化ステロール関連遺伝子スクリーニング

【方法】出芽酵母の野生株では、GFPen-D4Hは細胞極性部位(出芽部位や細胞分裂面)に分布する(図1)。この分布の変化を指標に活性化機構に関わる遺伝子を探査するため、GFPen-D4H発現ベクターを遺伝子欠損変異株(KO)ライブラリーに導入し、顕微鏡下で分布解析を実施した。得られた分布情報をもとに、既知の情報と統合し、解析対象遺伝子を決定した。そして、活性化関連遺伝子の機能解析として、遺伝学的アプローチ(高発現実験、多重変異株実験)を行う遺伝学的相互作用の解析を行った。filipin染色(活性化に関係なく全ステロールを染色)や生化学定量実験を利用してErg量を評価した。また、蛍光タンパク質融合タンパク質と活性化Erg分布との局在相関について細胞生物学的解析を行った。これらの実験から得られた結果から、制御機構の解明を進めた。【結果・考察】Ergの活性化状態を制御する細胞膜や細胞膜近傍小胞体Cortical endoplasmic reticulum(cER)に分布するタンパク質を単離するため、遺伝子欠損ライブラリーから約500株の関連遺伝子欠損株を選択し、ステ

ロール関連薬剤に対する感受性試験とGFPen-D4H分布を指標にした顕微鏡観察による一次スクリーニング、得られた遺伝子の戻し交配を経て、最終的に12遺伝子を同定した(図1)。これら遺伝子を足がかりに更なる探索を進め、同様の表現型を示す複数の遺伝子変異も同定している。スクリーニングで得られた関連遺伝子変異株について、現在、遺伝子機能の解析を進めている。その一つはLamタンパク質(StArT like domainタンパク質)である。Lamタンパク質は、cERに分布する膜タンパク質であり、細胞膜からステロールを抽出する。このタンパク質群のLAM1/2/3/4の4遺伝子の単独欠損変異では、GFPen-D4Hが母細胞側に分布し、野生株での極性分布とは逆の分布を示した。また、Lamタンパク質は母細胞側cERに局在することから、母細胞側特異的にステロールの分布を制御していると推測される。さらに、遺伝学的相互作用の解析を進め、phosphatidylserine(PS)合成酵素cho1欠損との組み合わせで合成致死性を示すことが明らかとなった(図2A)。PSはステロールと相互作用するため、cho1欠損ではGFPen-D4H分布が細胞膜全体に広がるという変化が以前から観察されていた。この合成致死性の原因を探ることで、活性化ステロールの機能が明らかになることを期待し、条件致死変異株を構築して表現型解析を進めた。その結果、ステロール量が異常蓄積(369%±80 vs 野生株)とそれに伴い細胞膜の異常陥入が確認された(図2B)。致死性はステロール合成を阻害すると回復するため(図2A)、全く異なる2つのメカニズムによる協調的な制御が、活性化を介してステロールのホメオスタシスを維持する可能性が示唆された。現在より詳細に解析を進めている。また、機能未知の細胞膜タンパク質Pmp3の解析も開始し、LAM遺伝子欠損と同様な母細胞側での活性化ステロール分布が判明した。この遺伝子は解析の初期であり、今後の研究の発展が期待される。

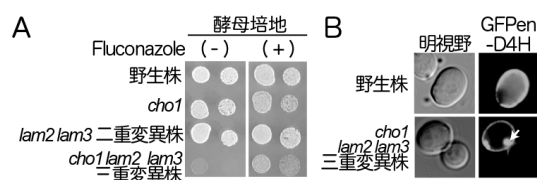


図2 活性化ステロールに関わるcho1 lam遺伝子多重変異株が示す合成致死性(A)と細胞膜の陥入(B, 矢印)。ステロール合成阻害剤Fluconazoleの添加で回復する。

グラム陽性菌における翻訳の品質管理機構の解明

千葉 志信

【目的】 リボソームは、終止コドンに欠いた異常な mRNA (non-stop mRNA) を翻訳すると、翻訳終結を行うことができずに mRNA 上で停滞する。細胞は、そのような停滞リボソームを解放する機構 (リボソームレスキュー機構) を持つ。真正細菌においては、広く保存された tmRNA (SsrA) による *trans*-translation が、主要なリボソームレスキュー機構として知られている。一方、我々は、以前、枯草菌の第2のリボソームレスキュー因子として BrfA を同定した。BrfA は、翻訳終結因子 RF2 を停滞したリボソームにリクルートすることで、終止コドンがないにもかかわらず翻訳終結を促進する。本研究では、(1) BrfA のレスキュー機構をさらに理解することを目的とし、BrfA の詳細な変異解析を行った。また、枯草菌のリボソーム品質管理機構の全貌を理解することを目指し、(2) SsrA、BrfA 以外のレスキュー因子のさらなる探索を行った。

【方法】 BrfA のリボソームレスキュー機構をさらに詳細に理解するために、BrfA 分子の重要領域を、網羅的な変異解析により明らかにすることを目指した。そのために、枯草菌 (*Bacillus subtilis* PY79 株) 由来の各種部分欠失変異株や、1 アミノ酸置換変異株を作製した。brfA 遺伝子と ssrA 遺伝子の二重欠失株は低温で生育欠損を示す。このことを利用し、生育を指標に BrfA の変異の効果を調べた。また、*in vitro* 精製再構成翻訳系を用い、各種 BrfA 変異体のリボソームレスキュー活性を評価した。

加えて、ssrA、brfA 以外の第三の枯草菌リボソームレスキュー因子を探索するため、ssrA 単独欠失変異や ssrA/brfA 二重欠失変異と組み合わせることで合成生育阻害を示す欠失変異を、TnSeq 法を用い探索した。

【結果・考察】 BrfA の C 末端領域を様々な長さで欠失した各種部分欠失変異を作製した。これらが活性を保持しているか否かを、brfA を欠失し、かつ、ssrA を CRISPRi でノックダウンできる株を用いて検討した。その結果、BrfA の N 末端から 50 アミノ酸残基があれば、野生型並に生育を相補することが示された。次に、BrfA のアラニンスキャニング変異解析を行い、重要残基の同定を試みた。その結果、まず、BrfA の S4A、R15A、D20A、R25A、F31A、G35A、R36A の 7 つの変異株は生育阻害を示した。うち、G35A 変異体以外の変異体タンパク質は細胞内での蓄積が見られたため、それらは機能喪失変異であることが示唆された。そこで、これらについて、

in vitro でのリボソームレスキュー活性を測定した。解析には、大腸菌由来の精製再構成翻訳系 (PURE system) に含まれる大腸菌リボソームの代わりに枯草菌リボソームを導入した *Bs* hybrid PURE system を用いた。この系で、終止コドンに欠いた GFP を合成し、BrfA および RF2 存在下で、ペプチジル tRNA が切断されるか否かを検討したところ、これらの変異体は、いずれもペプチジル tRNA の切断活性が低下していた。特に、R25A、F31A、R36A 変異は BrfA の活性を著しく低下させることが示唆された。以前明らかにされた構造データと合わせると、R25 はリボソーム RNA と、また、F31 および R36 は、RF2 との相互作用に重要な役割を果たすことが示唆された (図1)。

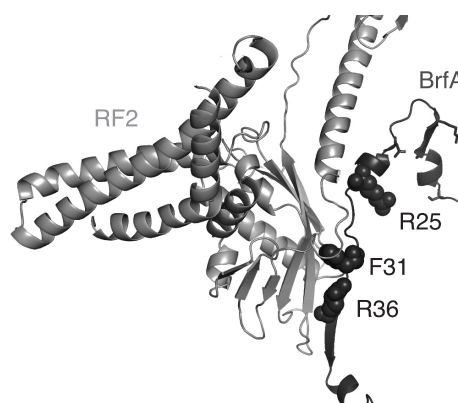


図1 BrfA の重要残基

次に、SsrA、BrfA に次ぐ第三のレスキュー因子探索のため、ssrA 単独欠失株および ssrA/brfA 二重欠失株を用いた合成生育阻害スクリーニングを行った。その結果、ssrA 単独欠失変異と合成生育阻害を示すものとして、近年他のグループから報告されたリボソーム品質管理因子である *rqcH* や *rqcP* をはじめ、いくつかの遺伝子がヒットした。また、ssrA/brfA 二重欠失株を用いたスクリーニングからも、機能未知の遺伝子を含む、複数の遺伝子が得られた。今後、これらの遺伝子のリボソーム品質管理への関与を検討する必要がある。

土壌中での環境適応を標的とした防除技術開発を指向した、 青枯病菌のシデロフォア産生機構の解明

曳地 康史

【目的】持続性ある防除技術がなく、土壌生息性グラム陰性細菌 *Ralstonia solanacearum* species complex (青枯病菌) は、250 種以上の作物に甚大な被害を与えている。その病原性には、細菌密度感知系クオラムセンシング (QS) により活性化された LysR 型転写因子 PhcA による遺伝子発現制御を必要とする。土壌に生息する青枯病菌の環境適応の阻害は、QS 阻害とともに、持続性ある青枯病防除をもたらすと考えられる。土壌での青枯病菌の環境適応には、土壌中に存在する三価鉄と結合能を有するシデロフォア (Sd) である Micacocidin (Mic) と Staphyloferrin B (StB) を介した二価鉄 (Fe^{2+}) の細胞内への獲得が肝要である。本研究では、青枯病菌の Sd 産生機構とともに Sd の病原性への関与について解明した。

【方法】青枯病菌 OE1-1 株ゲノム情報を基に作出した Sd 産生候補遺伝子の欠損株の三価鉄キレート活性 (Sd 活性) を測定し、Sd 産生遺伝子を同定した。それら Sd 産生遺伝子欠損株と OE1-1 株の培養ろ液の LC/MS 解析から、Sd 画分を分画し、NMR と MS によって Mic と StB の構造を決定した。そして、Mic と StB それぞれの産生遺伝子を同定した。種々の条件で培養した青枯病菌のトランスクリプトームを RNA-seq により解析した。また、青枯病菌菌株のトマト植物の根における挙動を *in vitro* pathosystem で解析するとともに、トマト植物に対する病原性とともに、青枯病菌菌株の QS 依存形質を解析した。

【結果・考察】Sd 活性低下株と OE1-1 株それぞれの培養ろ液の NMR と MS を用いた解析から、Mic と StB の構造を決定した (図 1)。そして、Mic と StB それぞれの産生に、RSc1804 遺伝子-RSc1813 遺伝子 (Mic 遺伝子群) と RSp0413 遺伝子-RSp0424 遺伝子 (StB 遺伝子群) が関わり、RSc1806 遺伝子 (*RSc1806*) と RSp0424 遺伝子 (*RSp0424*) が中核となることを明らかにした。さらに、培地に Fe^{2+} が含まれないときに、Sd 活性が顕著に高まることを見出し、 Fe^{2+} 有あるいは Fe^{2+} 無で培養した OE1-1 株の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から、 Fe^{2+} と結合した転写制御因子 Ferric uptake regulator である Fur1 によって、Mic 遺伝子群と StB 遺伝子群の発現が抑制されることを見出した。さらに、QS 能喪失変異株の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析から、PhcA により、StB 遺伝子群の発現が抑制されることを見出した。そして、三価鉄をキレート結合した Sd の細胞内への取り込みに、RSc1807 遺伝子と RSp0416 遺

子がコードする外膜受容体が関与することを明らかにした。さらに、RSp0100 遺伝子と RSp0414 遺伝子がコードする外膜受容体が、三価鉄をキレート結合した Sd の細胞内への取り込みに拮抗的に作用することを見出した。StB 産生能喪失株である *RSp0424* 欠損株はトマト植物に対する病原性を保持したが、Mic 産生能喪失株である *RSc1806* 欠損株はトマト植物に対する病原性を喪失した。そこで、青枯病菌のトマト根での挙動を解析したところ、表皮表面に固着した OE1-1 株は、表皮と皮層の細胞間隙で増殖して QS を起動し、細胞壁を分解して皮層細胞内に感染しマッシュルーム型バイオフィーム (mBF) を形成した。mBF から離脱した OE1-1 株は皮層と内皮の細胞間隙を動き、内鞘、そして導管へ感染した。一方、*RSc1806* 欠損株は、QS 能喪失株と同様に、表皮と皮層の細胞間隙で増殖したが皮層細胞へ感染できず、導管への感染も観察されなかった。そこで、*RSc1806* 欠損株のトランスクリプトームを RNA-seq により解析したところ、病原性関連遺伝子を含む PhcA により発現が制御される遺伝子の 80% 以上の遺伝子の QS 依存性が、*RSc1806* 欠損により崩壊した。*RSc1806* 欠損株の QS 依存形質であるバイオフィーム形成能、主要な菌体外多糖 EPS I 産生能およびべん毛回転による運動能が、QS 能喪失株と同様に、変化した。すなわち、土壌環境下で、Mic は、青枯病菌の病原性に不可欠な QS に依存した遺伝子発現制御に関わり、StB 産生とともに青枯病菌の病原性の制御に関わると考えられた。

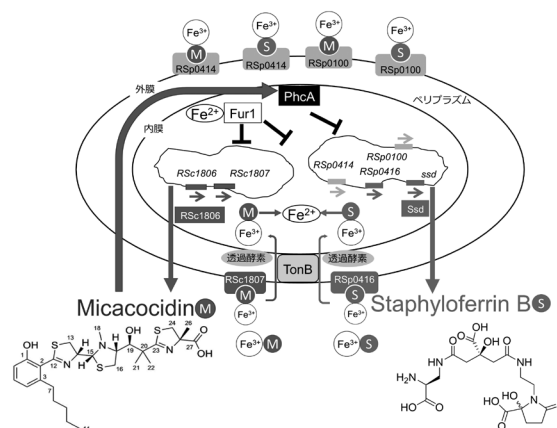


図 1 青枯病菌における Sd 産生と Fe^{2+} 獲得の制御および Mic による QS 依存遺伝子の制御に関する推定図

酵母の細胞質局在型センサーによる新奇高浸透圧感知機構の解明

館 林 和 夫

【目的】 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で高浸透圧適応の中心的な役割を担っている Hog1 MAPキナーゼ (MAPK) 経路では, 上流の膜局在型センサーが高浸透圧を感知すると, 各支経路の MAP3K (Ssk2/22, Ste11), 共通の MAP2K (Pbs2), MAPK (Hog1) が順次リン酸化・活性化され, 活性化した Hog1 がさまざまな高浸透圧適応反応の誘導に働く. 我々は上流高浸透圧センサーとして複数の膜タンパク質を, 経路下流の細胞質局在型高浸透圧センサーとして Hog1 を見出している. 上・下流のセンサーが高浸透圧に同時に応答した場合のみ Hog1 が活性化するため厳密な高浸透圧特異性が保障される. 本研究では, 細胞質局在型センサーによる高浸透圧感知機構の理解に向けて, Pbs2 の脱リン酸化制御機構を中心に解析した.

【方法】 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の Hog1 経路を構成するキナーゼやシグナル因子をコードする遺伝子の破壊株, 各種ホスファターゼの破壊株に, C 末端に hemagglutinin (HA) タグを付加した Pbs2 (Pbs2-HA) の発現プラスミドを導入し, 高浸透圧条件下などにおける Pbs2 の S514, T518 のリン酸化状態を検討した. 具体的には, 調製した酵母細胞抽出液から HA 抗体で免疫沈降した Pbs2-HA について, Phos-tag PAGE 法によるバンドシフトアッセイにより S514 リン酸化を, リン酸化 T518 特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により T518 リン酸化を検出, 定量した.

【結果・考察】 Hog1 経路における高浸透圧作用点として, 上流の膜局在型センサーと, Pbs2 によりリン酸化される細胞質の Hog1 が知られていた. 本研究では, 活性化 Ssk2 が Pbs2 をリン酸化する過程も高浸透圧によるリン酸化増強作用を受けることを遺伝学的解析により示した.

続いて, 高浸透圧による細胞質内リン酸化増強作用点に共通して存在する Pbs2 について, その活性化ループ内のリン酸化制御機構を解析した. 活性化ループ内には2つのリン酸化部位 (S514, T518) が存在し, MAP3K (Ssk2/22, Ste11) がこれらをリン酸化することで Pbs2 を活性化する. 一方, S514, T518 を脱リン酸化し Pbs2 を不活化するホスファターゼについては不明であった. そこで最近確立した Pbs2 の S514, T518 のリン酸化検出系を用いて, 様々なホスファターゼ変異の Pbs2 リン酸化に対する影響を調べ, Pbs2 の脱リン酸化機構を検討した. その結

果, 図1に示すように Ptc1, Ptc2, Ptc3, Ptc4 という4種の2C型セリン・スレオニンホスファターゼが Pbs2 の脱リン酸化に働くことがわかった. 例えば *PTC1* 遺伝子破壊株では Pbs2 T518 のリン酸化が高浸透圧刺激の有無によらず野生株に比べて亢進しており (図2), T518 脱リン酸化には主として Ptc1 が単独で働いていることがわかった. 一方, S514 の脱リン酸化には4種のホスファターゼ (Ptc1-Ptc4) が重複した機能を有していた. また, Ptc1 による Pbs2 の脱リン酸化には, アダプタータンパク質である Nbp2 が Ptc1 を Pbs2 にリクルートする必要があることも明らかになった. これまで Hog1 経路の負の活性制御には, Hog1 を脱リン酸化するホスファターゼの関与のみが示されていたが, 本研究で新たに Pbs2 の脱リン酸化を介した Hog1 経路の制御機構が明らかになった. Pbs2 の脱リン酸化反応が高浸透圧によって制御されているのかについては, 今後検証すべき課題である.

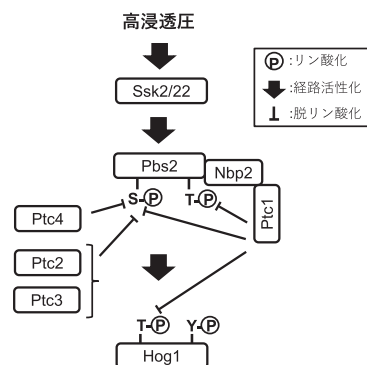


図1 2C型ホスファターゼによる Hog1 経路の負の制御

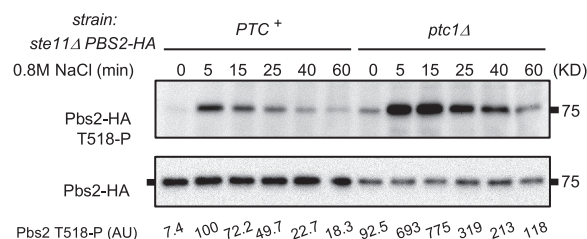


図2 Ptc1によるPbs2 T518の脱リン酸化
高浸透圧刺激後の *ptc1Δ* 株と野生株 (*PTC+*) における Pbs2-T518 の経時的リン酸化. ウエスタンブロットには T518-P:T518 リン酸化抗体, Pbs2-HA: HA 抗体を使用. 最下段の Pbs2 T518-P は Pbs2-HA T518/Pbs2-HA の相対値を示す.

ビタミン B₆ の生体内恒常性維持機構の解明

伊藤 智和

【目的】 ビタミン B₆ の補酵素型であるピリドキサルリン酸 (PLP) は、多くのアミノ酸代謝酵素の補酵素として機能し、生体代謝に必須の役割を果たす。一方、PLP やこの前駆体であるピリドキシンリン酸 (PNP) は、アルデヒド毒性や代謝攪乱作用を示す。生体内の各ビタミンレベルは必要十分量に厳密に制御される必要があるが、この恒常性維持機構には不明な点が多く残されている。

各ビタミンの相互変換・リサイクル経路、輸送システムは、ビタミン B₆ 恒常性に重要な役割を果たすと予想される。図 1 に *Escherichia coli* のビタミン B₆ 代謝酵素・経路に関する現在の知見をまとめたが、PLP の合成・分解に直接関与する代謝酵素 (図 1 中に実線で示した) 以外のビタミン B₆ 恒常性因子はほとんど知られていない。この状況は *E. coli* 以外の大部分の微生物においても同様である。本研究では、ビタミン B₆ ホメオスタシスの分子基盤の解明を目的とした。本稿では、*E. coli* の PNP レベルの制御機構に関する研究成果について記述する。

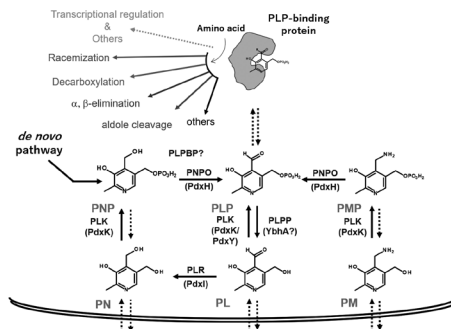


図 1 *E. coli* のビタミン B₆ 代謝酵素・経路

【方法】 *E. coli* 野生株および *yigL* 欠損株の菌体内や、酵素反応溶液中の各ビタミン B₆ ビタミンは、除タンパク処理の後、ODS カラム・HPLC を用いて分離、蛍光検出した。リコンビナントタンパク質は、各遺伝子をクローニングした pCA24N ベクターで形質転換した *E. coli* AG1 株を用いて発現し、His タグを利用して精製した。PNP ホスファターゼのスクリーニングには、*E. coli* の一遺伝子発現ベクター (ASKA クローン) 約 100 クローンずつを含むプラスミドプール (~50 セット) を調製し、これを用いて *E. coli serA pdxH* 株 (*serA*: phosphoglycerate dehydrogenase, *pdxH*: PNP oxidase) を形質転換した。グリシンおよびピリドキサル (PL) を含む合成選択培地において生育したコロニーよりプラスミドを抽出

し、インサート配列を同定した。

【結果・考察】 *E. coli* の細胞破砕液と PNP をインキュベートし、その反応産物を分析したところ、PLP に加えピリドキシン (PN) の生成を認め、PNP ホスファターゼが関与する脱リン酸化経路の存在が明らかとなった。PNP 依存性の条件的致死性を示す *E. coli serA pdxH* 株を用いたマルチコピーサプレッサースクリーニングによって、同株の PNP 毒性緩和に寄与する 6 種類の遺伝子を同定した。このうち *yigL* は、唯一ホスファターゼをコードし、この発現により *E. coli* 粗酵素液中の PNP ホスファターゼ活性は 40 倍上昇した。精製 YigL タンパク質は、PNP に対して高いホスファターゼ活性を有し (K_m : 0.8 mM k_{cat} : 1.8 S⁻¹)、また、PLP に対してもほぼ同等の (K_m : 0.2 mM k_{cat} : 2.4 S⁻¹) 反応性を示した。この PLP に対する活性値は、PLP ホスファターゼである YbhA と同等であった。

yigL 欠損株では PNP レベルが野生株と比べ有意に高値を示し、この際、粗酵素液中の PNP ホスファターゼ活性は野生株と比べ 40% ほど低下していた。さらに、*yigL* 欠損株は PNP 毒性に対し、野生株と比べ高感受性を示した。*E. coli* の PNP レベルの新規制御因子として PNP ホスファターゼ YigL の存在が明らかとなった (図 2)。*yigL/ybhA* 二重欠損株の PLP ホスファターゼ活性は、野生株と比べ 80% 低下しており、両酵素が *E. coli* の主要な PLP ホスファターゼである可能性が示された (図 2)。

既知の PNP レベルの制御因子として、PNP オキシダーゼ (PdxH/PNPO) および、PLPBP タンパク質が知られてきた。*plbpb* 欠損株は、PNP に対する反応性を示さないにも関わらず、*pdxH* 欠損株と同様に、菌体内に PNP が高濃度蓄積する。興味深いことに、*plbpb* 欠損株における *pdxH* の過剰発現は、同株の PNP の蓄積を解消できなかった。PLPBP と PNPO との直接的な相互作用は期待できない。このため、PLPBP は何らかの間接的な作用によって PNPO の酵素活性制御に関与する可能性が予想された。

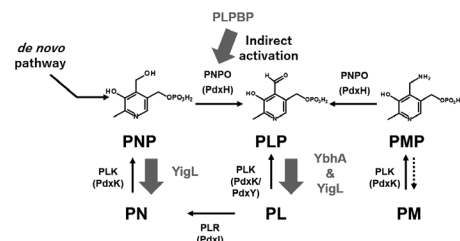


図 2 *E. coli* の新たなビタミン B₆ 代謝酵素・因子

トリコテセン系かび毒生合成制御の分子機構

木村 真

【目的】 ムギ類赤かび病を引き起こす *Fusarium graminearum* はトリコテセン系かび毒（以下、毒素）を大量に外観健全粒に蓄積させる。毒素生合成遺伝子 (*Tri* 遺伝子) の転写には、遺伝子クラスター中の Cys₂-His₂ 転写因子 Tri6p とその調節因子 Tri10p が必須である。Tri6 を高発現させてもスクロースのような誘導糖が存在しないと経路酵素遺伝子 (*Tri5* や *Tri4*) の転写は起こらない。Tri6 や Tri10 は遺伝子クラスターのコア領域に位置するが、相同組換えによるベクター挿入によってコア領域の遺伝子間距離が変わると、毒素非生産条件下でも Tri6 の転写が活性化される。その結果、経路酵素 *Tri* 遺伝子が脱抑制されて毒素を産生するようになる。以上のことから、遺伝子クラスターのコア領域は本来、強固なヘテロクロマチン構造をとり、毒素を誘導する培養条件にならないとコア領域の遺伝子が転写されないが、ベクター挿入によって構造が変化すると転写活性化が引き起こされると推測された。そこで本研究では、酵母の二形成に関わる *WOR1* の *F. graminearum* のホモログである *Fgp1* の毒素産生への関与を検証する。また、スクロースが Tri6p を転写因子として機能化させるメカニズムを解析し、毒素産生制御に役立つ科学的知見を得ることを目指す。

【方法】 *F. graminearum* JCM 9873 株 (WT) を親株に、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびチミジンキナーゼ遺伝子をそれぞれ正、負の選択マーカー遺伝子として用いたセルフクロニングによって、*Fgp1* の座位での相補株 (C)、Gpd プロモーターを *Fgp1* コード領域の上流に挿入した高発現株 (O/E)、リン酸化部位 Thr-67 を Ala に置換した被リン酸化部位置換株 (T67A) を作成した。また、スクロース非存在下で毒素産生する物質としてフルオレノンの誘導体を見出した。Tri6 を高発現させた株にスクロースやフルオレノンの誘導体を添加し、Tri 遺伝子発現の転写レベルを経時的に解析する。

【結果・考察】 O/E 株は pH 4.0 の培地で培養すると大きな pH 変動を示したため、全ての株で同じ pH を示す pH 2.5 の培地を用いて *Fgp1* の影響を評価した (図 1)。O/E 株は WT 株より毒素生産のレベルが高く、WT 株では毒素産生のほとんど見られないグルコースを糖源にした場合でも顕著な毒素産生が認められた。一方、T67A 株では毒素が検出されなかったことから、Thr-67 のリン酸化が必須であることが示された。以上より、*Fgp1* はリン酸化を受けて活性化し、恐らくヘテロクロマチン構造

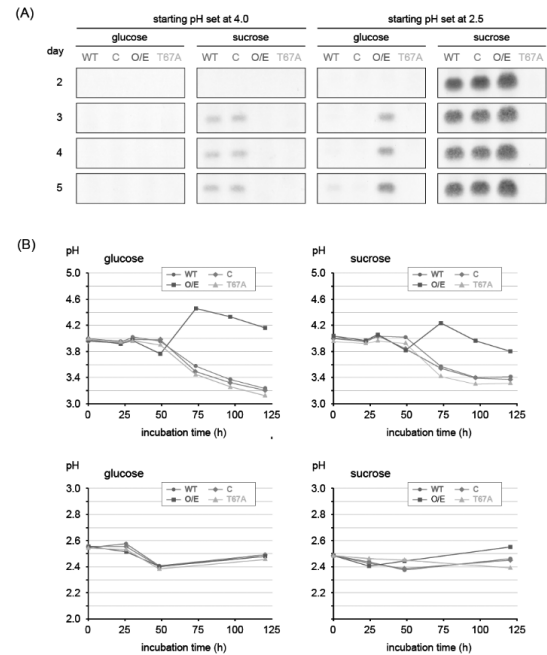


図 1 *Fgp1* の遺伝子操作株の各種培養条件下における解析. (A) トリコテセンの TLC 解析 (B) 培養液の pH プロファイル

を弛緩することで Tri6 と Tri10 を発現させると考えられた。次に Tri6 高発現株の培養液にスクロースを添加した。15 分ですぐ Tri10 mRNA が検出され、その後、経路酵素遺伝子 *Tri5* の発現が活性化された。このことからスクロースはまず Tri10 の転写を誘導し、生成した Tri10p タンパク質が Tri6p タンパク質を転写因子として機能化することで経路 *Tri* 遺伝子の転写が活性化することが示された (図 2)。

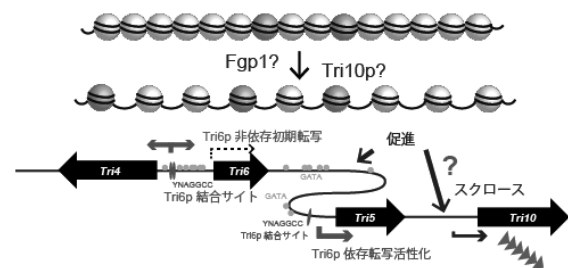


図 2 トリコテセン遺伝子クラスターのコア領域と *Tri* 遺伝子の発現制御モデル

細菌の宿主定着能獲得や病原性獲得への進化のメカニズムの解明

坂本 啓

【目的】 *Escherichia coli* (大腸菌), *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌等) の腸内細菌目の細菌は院内感染の原因として重要である。しかし、検出された菌株全てが感染症の原因菌 (=病原性を有する) という訳ではない。これらの多くは口腔内や腸管内の常在細菌叢の構成種であり、免疫抑制状態の患者に対してでさえ大抵は感染症を引き起こさない。また、環境中から検出された菌株と同系統の株がヒトから検出される例があるが、そもそも全ての環境細菌がヒトへの定着能をもつ訳では無い。環境中の細菌が宿主への定着能を獲得し、やがて宿主に対して病原性を発揮するようになるメカニズムは解明されていない。

本研究は環境細菌や宿主の常在菌としてありふれた細菌が、宿主中に侵入あるいは定着し、やがて病原性を発揮するようになる進化のメカニズムを解明する。

【方法】 2017年9月～2018年8月に長崎大学病院の入院患者(20名)から肺炎球菌計41株(血液13株, 喀痰12株, 尿16株)を収集した。これらの菌株は、日常的な臨床処置の一環として収集され、同定されたものである。実験は各実験内で週齢と性別を一致させた野生型の雄マウスと雌マウスの両方で行った(C57BL6系統)。

41株を 1.0×10^8 CFU 静脈内投与し, 24, 48, 72, 96時間後に生存率を集計してスコア化し, 高病原性の群と低病原性の群とに分けた。

使用した菌株は全て全ゲノム解析を行った。

また, 各菌株を使用して鉄制限アッセイ等を行った。

【結果・考察】 使用した菌株41株のうち, 13株が高病原性株であった。それらについて, 既報で頻出する高病原性と関連付けられた遺伝子の有無を調べた(表1)。既報で高病原性と関連する遺伝子として頻出する *rmpA*, *magA*, 莢膜型 K2 serotype 遺伝子について, *rmpA* は4株, *magA* は0株, 莢膜型 K2 serotype 遺伝子保有株も0株であった。このことから, 本研究で扱った株ではそれらの遺伝子とは別の遺伝子が高病原性と関連することが考えられた。また, *kfu* 遺伝子は高病原性株のうち1株検出された一方で, 低病原性株からは12株検出された。更に, *ybtS* 遺伝子や *uge* 遺伝子のように, 病原性に関わらず同様の頻度で検出される遺伝子も認められた。一方で, *iroN* や *iroB* のように, 高病原性株で高頻度に検出され, 低病原性株からは検出されなかった遺伝子を認めたため, これらの遺伝子について解析を進めた。

表1 実験で使用した株の遺伝子保有状況

遺伝子	高病原株	低病原株
<i>rmpA</i>	4 (23%)	0 (0%)
<i>magA</i>	0 (0%)	0 (0%)
K2	0 (0%)	0 (0%)
<i>kfu</i>	1 (0.8%)	12 (43%)
<i>ybtS</i>	8 (61%)	8 (31%)
<i>uge</i>	13 (100%)	25 (89%)
<i>iroN</i>	6 (46%)	0 (0%)
<i>iroB</i>	6 (46%)	0 (0%)

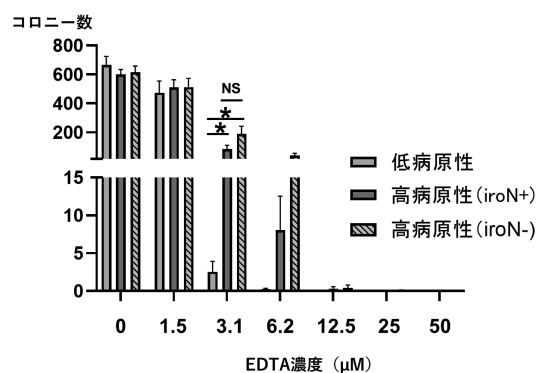


図1 鉄制限アッセイで検出されたコロニー数

培地中に加えるキレート剤を漸増させて細菌が生存できる限界濃度を評価した(図1)。その結果, 高病原性の株は低病原性の株に比べて高濃度の鉄存在下で生存できることが判明した。しかし, 高病原性株どうしを比較した場合, *iroN* 遺伝子の有無による差は確認できなかった。

また, 好中球貪食アッセイを行ったが, 高病原株と低病原株の間では好中球の貪食について差は認めなかった。

今後, *iroN* が病原性に果たす役割を追求しつつ, *iroN* 陰性の高病原性を規定する因子についても探求する。

分岐鎖アルコール認識機構とその生理的意義の解明

黒田 浩一

【目的】生物は生存を維持するために、栄養飢餓やストレス環境を感知して細胞の活動を調節する。例えばイソブタノールなどの分岐鎖アルコールは、酵母の窒素飢餓時に誘導されるアミノ酸異化反応の副産物として作られる一方、バイオ燃料として有用である。そのため、酵母は分岐鎖アルコール生産のホストとして期待されるものの、分岐鎖アルコールの細胞毒性が大きな課題であった。私たちは分岐鎖アルコール特異的に耐性が向上した出芽酵母を初めて同定し、イソブタノールによる細胞生育阻害の新たなメカニズム（図1）などを見出してきた。その独自の知見から、①細胞には分岐鎖構造を認識する分子機構が存在し、②分岐鎖アルコールには重要な生理的意義があると考えた。そこで、本研究ではこれらについて解明することを目的とした。



図1 分岐鎖アルコールによる酵母の生育阻害機構

【方法】私たちの以前の研究において、イソブタノールに高い耐性を示す酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株として同定された6種の1遺伝子破壊株を様々なアルコールを含むSC培地にて培養し、30℃、24時間後の生育を比較した。アルコールの構造（直鎖または分岐鎖）に応じて特徴的な耐性プロファイルを示す株を同定し、これらの耐性株が各種アルコールに対してどのような細胞応答を示すのか網羅的に解析した。野生株および耐性株を直鎖アルコール（1-ペンタノール）、分岐鎖アルコール（イソペンタノール）を含むSC培地にて30℃、12時間培養した後、細胞からRNAを抽出し、サンプル調製を経てRNA-seqにより転写レベルを網羅的に比較した（比較トランスクリプトーム解析）。その結果をもとに両アルコールに対してどのような発現挙動の違いが見られるのかを調べるため、発現変動解析とGO解析を行った。

【結果・考察】6種のイソブタノール耐性酵母について、様々なアルコール存在下で生育を比較したところ、*gln3Δ*（glutamine metabolism）株が分岐鎖アルコール特異的に高い耐性を示したほか、*gcn3Δ*（general control nonderepressible）株が炭素数5以上のアルコールに対して構造を問わず*gln3Δ*株よりも高い耐性を示した。

野生株の両アルコールに対する発現変動解析とGO解析を行ったところ、アルコールが無い条件と比較して転写レベルが増大した遺伝子群に差は見られなかった。一方で、1-ペンタノール存在下では主にTCA回路などの炭素固定系、イソペンタノールでは主に呼吸鎖に関連する遺伝子の発現レベルが低下しており、直鎖と分岐鎖では異なるアルコール認識・応答機構が働くことで細胞毒性が引き起こされていることが示唆された（図2）。

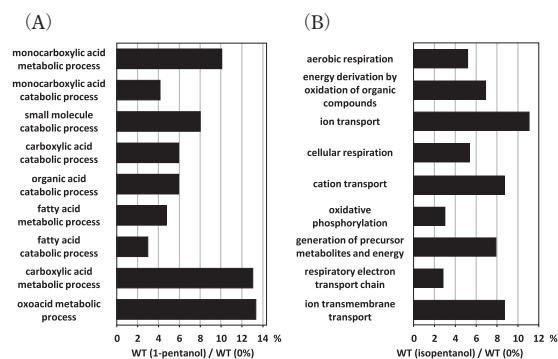


図2 野生株において1-ペンタノール (A)、イソペンタノール (B) 存在下で有意に発現レベルが低下した遺伝子群のGO解析

次に、イソペンタノールに高い耐性を示す *gln3Δ* 株、*gcn3Δ* 株について、両者で耐性の度合いが異なる直鎖の1-ペンタノール存在下で培養した際の転写レベルをRNA-seqにより比較した。その結果、発現変動遺伝子として39個の遺伝子群が検出され、これらの遺伝子が直鎖アルコール（1-ペンタノール）に対する耐性・感受性に関与する遺伝子であることが示唆された。

本研究により、構造の異なるアルコールが酵母に及ぼす機構について複数の新たな知見が得られた。これらの知見をもとに、アルコール耐性の詳細な機構、ひいては生物の生存戦略の根本的理解を深めるだけでなく、様々なアルコール類のバイオプロダクションにおける新たな技術革新にもつながることが期待される。

祖先型硫黄酸化経路の鍵となる未知酵素の同定

渡邊 友浩

【目的】 初期の地球生命は、そのエネルギー代謝に亜硫酸 (SO_3^{2-}) を用いていたと考えられている。このため、亜硫酸エネルギー代謝を推進するシロヘム含有酵素は、生命進化の指標として重要である。ところが近年、シロヘム含有酵素とは全く異なる酵素が亜硫酸エネルギー代謝に関わることが提案された。提案されている代謝経路は現存する一部の硫黄酸化菌に保存されており、ヘテロジスルフィド還元酵素様の複合体（以下、sHdrと呼ぶ）と未知の酵素の共役反応が亜硫酸を合成すると考えられている。しかし、sHdrと未知酵素による亜硫酸合成反応は検証されていない。本研究では、未知酵素を比較ゲノムと比較トランスクリプトームで探索した。

【方法】 当研究室の分離培養実験によって新設した硫黄酸化菌のみから構成される分類群 *Sulfuricellaceae* 科の基準株ゲノム（4属8種）を比較した。そのうち、*Sulfuriferula plumbophilus* Gro7 株、*Sulfuriferula multivorans* TTN 株、*Sulfuriferula thiophila* mst6 株、*Sulfuriferula nivalis* SGTM 株、*Sulfurirhabdus autotrophica* BiS0 株の培養条件を最適化し、トランスクリプトーム解析に用いた。培養過程の硫黄化学種はイオンクロマトグラフィーと比色法で定量した。Gro7 株は電子供与体として水素ガス、チオ硫酸、テトラチオン酸で培養し、対数増殖期および定常期の細胞を集菌した。その他の株はテトラチオン酸で培養し、対数増殖期に細胞を回収した。DNBSEQによるシーケンス解析は生物技研に依託した。Gro7 株の各培養条件のトランスクリプトームはDESeq2で比較解析した。

【結果・考察】 Gro7 株の培養上清の分析結果より、本菌はチオ硫酸 ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) およびテトラチオン酸 ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) を硫酸 (SO_4^{2-}) に酸化することが分かった。比較トランスクリプトーム解析の結果より、硫黄酸化エネルギー代謝経路を予想した（図1）。チオ硫酸またはテトラチオン酸は、硫黄リレータンパク質に結合したチオール基 (R-SH) として細胞内に輸送される可能性がある。そして、R-SHは亜硫酸を経由して硫酸に酸化されると考えられる。

水素ガス培養を対象とするDESeq2解析より、Gro7株では複数の硫黄リレータンパク質とsHdr遺伝子群の発現量が有意に増加し（図2）、これらの発現量は他の硫黄酸化関連遺伝子の発現量と比べて顕著に高かった。そして、この結果はTTN株、mst6株、SGTM株、BiS0

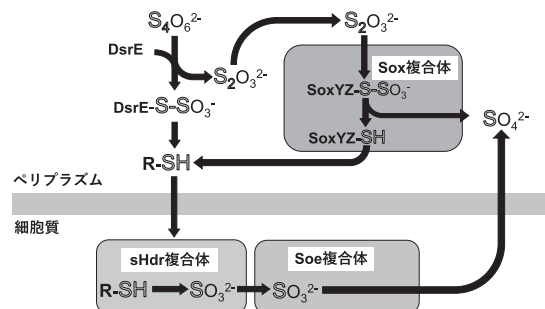


図1 Gro7株から予想されたテトラチオン酸化機構

株のトランスクリプトームにおいても同様であった。一方で、比較ゲノムおよび比較トランスクリプトーム解析からは、sHdrと共役して亜硫酸を合成する可能性のある酵素遺伝子は見つからなかった。

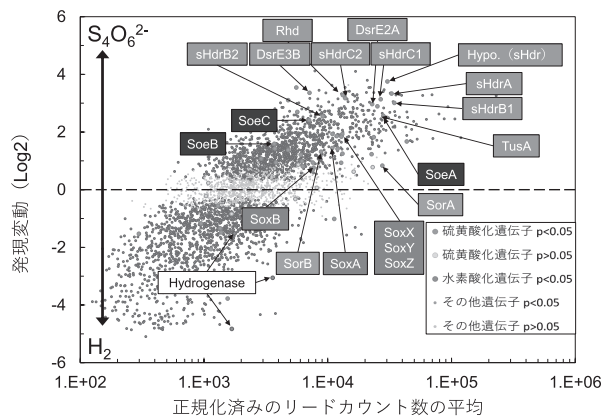


図2 テトラチオン酸および水素ガスで培養したGro7株トランスクリプトームの発現変動遺伝子

以上の結果を総合すると、亜硫酸の合成反応はsHdr単独で推進されると考えられる。チオール基 (R-SH) を酸化して亜硫酸 (SO_3^{2-}) を合成するには3分子の水 (H_2O) が必要であり、この反応を推進する生体触媒はシロヘムである。sHdrの活性中心はシロヘムではなく鉄硫黄クラスターだと考えられるが、鉄硫黄クラスターの構造はシロヘムの構造（血液中のヘムと似て複雑な構造をした有機物の中心に鉄が結合）と比べて圧倒的に単純である。単純な構造を持つ鉄硫黄クラスターが3分子の水と反応して亜硫酸を合成するという反応仮説は、エネルギー代謝の進化において重要であり、今後の検証が必要である。

ビスフェノールS分解微生物系の人工構築と生物処理への応用

武尾 正 弘

【目的】 ビスフェノールS (BPS) は、ポリエーテルスルホン等の耐熱性エンジニアリングプラスチックの原材料として、近年その使用量が増加している化学物質である。しかし、本物質は環境ホルモン作用を有し、またビスフェノール類の中でも特に生分解性が悪いことが知られており、生態や環境への負荷が憂慮されている。BPS分解菌の報告もわずかに存在するが、それらの特徴付けすら進んでいない。BPSやその誘導体の生産は、国内生産が世界シェアの大部分を占めるため、BPS含有廃水の安価で安全な処理法の確立も望まれている。そこで、本研究では、単一微生物では完全無機化できないBPSに対して、BPSを部分分解できる既存の微生物を組み合わせ、人工的に迅速にBPSを無機化できる分解系を構築する。また、このBPS分解系を実処理に適用できるように、固定化法を用いたBPS生物処理法の基礎検討も行う。

【方法】 環境ホルモンとして知られるノニルフェノール (NP) の微生物分解の研究の過程で、*Sphingomonas* sp. NP5株の保有するNP酸化酵素が幅広くビスフェノール類を分解することが明らかとなっている。また、その酵素反応により、BPSは3つの単環化合物・ハイドロキノン (HQ)、フェノールスルホン酸 (PS)、ハイドロキ

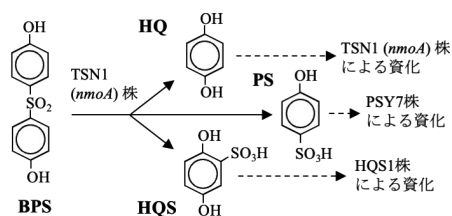


図1 人工複合微生物系によるBPS分解の戦略

ノンスルホン酸 (HQS) に分解されることもわかっている (図1)。そこで、BPSの人工分解微生物系の構築を目指し、図1に示す通り、HQ分解菌 *Pseudomonas putida* TSN1株にNP酸化酵素の遺伝子 (*nmoA*) を導入してBPSを分解させ、さらに生じたHQをこの菌株に資化させた後、同時に生成したPS並びにHQSをそれぞれPS資化菌 *Cupriavidus basilensis* PSY7株及びHQS資化菌 *Delftia lacustris* HQS1株に分解・資化させることを試みた。

【結果・考察】 無機塩培地で *P. putida* TSN1 (*nmoA*) 株の細胞懸濁液 ($OD_{600}=2.0$) を調製後、 0.4mM (100mg/L)

となるようにBPSを加え、振盪培養 (150rpm , 25°C) によるBPSの分解を行ったところ、7h程度でほぼ完全にBPSは分解された。この際、代謝物であるHQは分解され、PS並びにHQSは培地中に残留した。次に、この培養上清に、PS分解菌 PSY7株及びHQS分解菌 HQS1株の細胞懸濁液を加えて、最終濁度 $OD_{600}=1.0$ (各菌株の濁度は0.5) に調製後、同様に振盪培養による分解を試みた。その結果、期待通りにこれらの中間体は完全に消失した。以上により、3つの分解菌と *nmoA* を組み合わせることにより、ほぼ完全にBPSを分解できることが示唆された。

一方、上記研究と並行して、下水処理場の汚泥からBPSの集積培養を実施したところ、1ヶ月程度の培養後に突如BPSが分解されるようになり、その培養液から1株の真菌を分離することができ (図2)、BPS1株 (NBRC115858) と命名した。この菌株は、その形態や

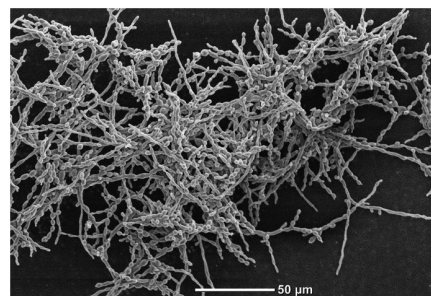


図2 BPS1株の走査型電子顕微鏡像

28S rRNA 遺伝子領域及びITS領域の解析から、黒色酵母として知られる *Exophiala xenobiotica* に属する菌株であることがわかった。本菌株を 120mg/L のBPSを含む無機塩培地に少量植菌し、振盪培養したところ、良好に増殖し、2週間ではほぼ完全にBPSを分解した。この際、理論量の73%の溶存炭素量の減少と55%の硫酸イオンの生成が観察された。また、HPLC分析では、PS、HQ、HQS等の顕著な中間体は検出されなかった。従って、本菌株はBPSを資化したと考えられる。単一菌株として 500mg/L までのBPSの分解が可能であり、また、アルギン酸固定化物では 800mg/L のBPSを48hで分解でき、繰り返しの分解も可能であった。このような高濃度のBPSの分解菌の報告はなく、世界で初めての例と考えられる。(2023年2月特許出願済)

ATP-grasp リガーゼにより修飾される新規ペプチドの異宿主生産

小谷 真也

【目的】 リボソームにおける合成後の翻訳後修飾ペプチド (RiPP) には、20 を超えるサブクラスが含まれる。ゲノムマイニングにより、新しいクラスの RiPP である ω エステル含有ペプチドである graspetide の生合成遺伝子クラスターがバクテリアのゲノムに広範囲に見出されている。このクラスの RiPP は、生合成システムに環状ペプチドの生産に不可欠な ATP-grasp リガーゼが含まれている。これまで、前駆体ペプチドのアミノ酸配列の相同性に基づいて、合計約 1500 の候補 graspetide が示され、12 のグループに分類された。この中には未報告の結合を形成する新規性の高い遺伝子クラスターも含まれる。このような背景の下、新しい graspetide を得ることが本研究の目的であり、ゲノムマイニングおよび異宿主生産を試みた。

【方法】 海洋プロテオバクテリア *Marinomonas fungiae* [CM 18476] のゲノムに Graspetide の生合成遺伝子クラスターを見出した。生合成遺伝子クラスターには、前駆体ペプチド (*marA*) と ATP-grasp リガーゼ (*marB*) をコードする 2 つの遺伝子が含まれていた。前駆体ペプチドコード遺伝子は、バクテリアのゲノムに分布しており、特に C 末端のアミノ酸配列が非常によく保存されていた。機能不明タンパク質コード遺伝子とキノールモノオキシゲナーゼコード遺伝子を含む他の 2 つの遺伝子は、*marA* および *marB* の近くに並んで存在しているが、生合成に関与するかどうかは不明であった。そこで、この 4 つの遺伝子を含む領域の分子クローニングを行った。テンプレートとしてゲノム DNA とプライマーを用いた PCR により、4 つの遺伝子を含む遺伝子断片を増幅した。増幅された DNA 断片を制限酵素で切断した後、切断した pET41a プラスミドとライゲーションして、発現ベクターを構築した。さらに大腸菌に形質転換を行い、遺伝子発現を行った。

【結果・考察】 発現ベクターを保有する形質転換体大腸菌を、栄養寒天培地を使用して発現誘導を行い培養した。細胞は、寒天培地から直接収穫し、メタノールで抽出した。メタノール抽出物を繰り返し HPLC による精製に供して、マリノモナシンを得た。架橋パターンを含む化学構造を決定するために、DMSO- d_6 に溶解したマリノモナシンの NMR スペクトルを分析した。マリノモナシンの 18 アミノ酸すべてが、二次元 NMR スペクトルデータを用いて同定することが出来た。18 アミノ酸のペ

プチド配列は、隣接するアミノ酸の α -プロトンとアミドプロトンの間の NOESY 相関によって決定された (図 1)。Thr4 の β -プロトンから Asp14 の β -カルボニル炭素への HMBC 相関が観察され、Thr4 と Asp14 の側鎖間のエステル結合が示唆された。Lys5 の ϵ -NH と Glu13 の γ -プロトンの間に NOESY 相関が観察され、Lys5 と Glu13 の側鎖間のイソペプチド結合が示された。Lys6 と Glu10 でも同様の NOESY 相関が観察されたため、Lys6 と Glu10 の側鎖間のイソペプチド結合が示された。また、精密質量分析の測定の結果も図 1 の構造を支持する結果が得られた。以上の結果より、新規ペプチド marinomonasin の構造を図 1 のように決定した。

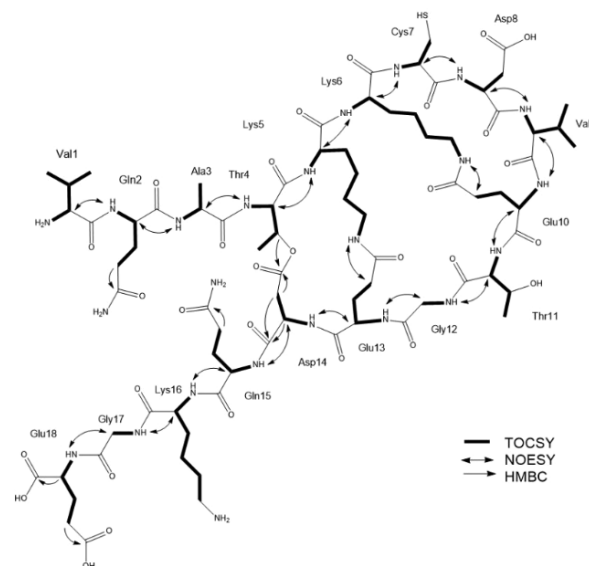


図 1 NMR による marinomonasin の構造決定

今回、組み込んだ遺伝子クラスターには ATP-grasp リガーゼコード遺伝子 *marB* が一つ含まれているのみである。前駆体ペプチド *MarA* に対して作用し、3 つの分子内結合を形成する。そのことから、ATP-grasp リガーゼ *MarB* は分子内にイソペプチド結合 2 つ、エステル結合 1 つを形成する能力を有する新しい二機能性酵素であることが示された。今後、X 線結晶解析および酵素学的アプローチにより、ATP-grasp リガーゼ *MarB* における marinomonasin の結合形成メカニズムに関して解明が期待される。

プラスチック廃棄物の微生物分解の効率化を目指した生化学・工学的アプローチ

渡邊 崇人

【目的】プラスチック廃棄物の環境汚染やマイクロプラスチックのヒトを含めた生体への悪影響（健康被害）が指摘されている。これらの問題の原因の一つは、環境中に廃棄されたプラスチック類が生分解されにくいことにある。最近、プラスチック類を分解する細菌や分解酵素の報告があり、機能改変や分子育種等の試みがなされている。本研究では、そのような分解細菌や分解酵素の「分解する側」からの遺伝・生化学的なアプローチだけではなく、生分解されるプラスチック類にも焦点を当てる。すなわち、プラスチックという「分解される側」に工学的（物理化学的）なアプローチを加え、さらに、環境中に普遍的に存在する微生物でもプラスチック類を効率的に分解できるかについて把握することを目的とした。

【方法】これまで我々が研究対象としてきたビフェニル/PCB分解細菌十数株のゲノム情報よりプラスチック類の分解・代謝を担う候補となる遺伝子をBLAST解析等で検索した。検索された候補遺伝子については、クローニング後、*Rhodococcus*属細菌の宿主ベクター系で異種発現を行い、精製後、活性測定を行った。さらに、これらビフェニル/PCB分解細菌を用いて様々なプラスチック類やその構成成分であるモノマーの化合物を炭素源として生育するかどうかが資化性試験を行った。一方、様々なプラスチック素材を裁断・破碎し、これらのプラスチック片に対し、マイクロ波加熱やプラズマ放電処理を行い（図1）、処理したプラスチック片を唯一の炭素源としてビフェニル/PCB分解細菌を用いて資化性試験を行った。

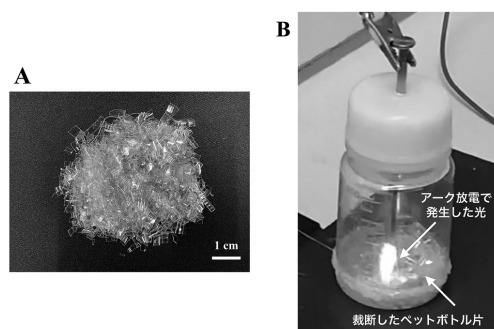


図1 裁断したペットボトルのプラズマ放電処理
A. 5mm以下に裁断したペットボトル片（PET片）
B. アーク放電によるPET片の処理の様子

【結果・考察】ビフェニル/PCB分解細菌のゲノムを精査した結果、例えば、石油由来生分解性プラスチック

Poly Butylene Adipate-co-Terephthalate (PBAT) 等の分解に関与する芳香族エステラーゼ系酵素、ペットボトルの成分であるPET（ポリエチレンテレフタレート）分解細菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6株由来のPETase、さらに、生分解性が乏しいポリウレタンのオリゴマーやモノマーを分解する酵素と相同性を有する酵素遺伝子を有していた。その内、*Cupriavidus basilensis* KF708株のPETase様の酵素遺伝子等を異種発現させ、精製後（図2）、高いエステラーゼ活性を確認した。

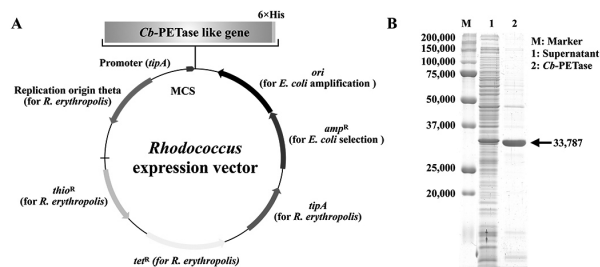


図2 KF708株のPETase様酵素（Cb-PETase）の発現
A. 発現ベクターの構造 B. 精製後のSDS-PAGE解析

一方、資化性試験の結果、特にPET片を炭素源として生育できた菌は、我々が解析対象としている12株のビフェニル/PCB分解細菌の内、*Rhodococcus wratislaviensis* T301株のみだった。しかしながら、T301株においては、今回実施した5種類のプラズマ処理の内、アーク放電処理したPET片を用いた際、放電処理した時間に依存するものの未処理のPET片よりも約1ヶ月間の培養でOD₆₀₀の値が1.8倍から2.9倍高くなり、生育が良くなった。なお、現在、T301株以外の菌株でもプラズマ処理したPET片を資化できるか確認中である。また、T301株のPET片の分解には、エステラーゼ系酵素だけではなく、色素脱色型ペルオキシダーゼ等のリグニン分解系の酸化型酵素の関与もあると考え、合わせて解析中である。

今回、プラズマ処理したPET片では、生育の向上が確認されたことから、プラスチック類の物性変化が微生物分解を加速させたと示唆される。物性変化については、今後、表面の粗さ、親水性、接触角、ヤング率等を前処理の最適化のための指標としたい。一方、今回良好な結果が得られなかったマイクロ波による前処理については、マイクロ波加熱による特にガラス転移点を持つプラスチック類の物性変化の条件を探っていきたい。

病原微生物の侵襲進化の解明と新規天然物の探索

荒井 緑

【目的】 放線菌や真菌から得られる天然物は多くの有用な医薬となって人類に貢献してきたが、近年、新規天然物が得られない壁が立ちはだかっている。しかしながら、放線菌や真菌には多くの休眠遺伝子が存在しており、それらを活性化して新規天然物を得ようと世界で試みられている。そのような中、我々は病原微生物が受ける一つのストレスに気がついた。それは、病原微生物が生体内に侵入した際に受ける免疫排除のストレスである。そこで、疑似感染状態を作り出すべく、病原微生物とマクロファージ細胞との共培養を行ったところ、共培養特異的に出現するあるいは生産が増強する化合物を見いだすことに成功した(図1)。本手法は新規天然物を得るための世界で初めての新規手法である。本研究では、微生物と動物細胞の共培養法により得られる天然物を単離・構造決定すること、また、その休眠遺伝子活性化のメカニズムに迫ることを目的とした。

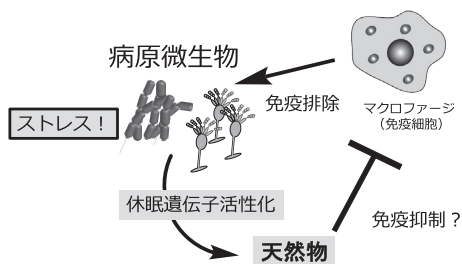


図1 微生物と動物細胞の共培養による天然物生産

【方法】 千葉大学真菌医学研究センターが保有する、臨床検体から分離された病原真菌 *Aspergillus fumigatus* および *Aspergillus terreus* に着目した。これらを動物細胞(マクロファージ様細胞株 RAW264 または急性単球性白血病細胞 THP-1) とプラスチック製フラスコ内で共培養を行った。細胞を 80-90% コンフルエントの状態に培養し、培地を CD (Czapek-Dox) 培地等に変更し、別途前培養した *A. fumigatus* または *A. terreus* を加えた。大量培養は 175cm² フラスコを用い、*A. fumigatus* は 28℃ にて 1 週間、*A. terreus* は 2 週間静置培養した。遠心にて上清と沈殿物にわけ、沈殿物はメタノールを加えて菌体を破碎した後遠心し、上清をエバポレーターで乾固した後、始めの上清と合わせ、酢酸エチルで抽出した。共培養で特異的に現れるあるいは増強する化合物を HPLC

で確認しながら、カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC で単離・精製し、各種 NMR で構造決定を行った。**【結果・考察】** 病原真菌 *A. fumigatus* は真菌感染症であるアスペルギローシスの主な原因菌として知られている。*A. fumigatus* とマクロファージ様細胞株 RAW264 を共培養したところ、共培養特異的化合物が HPLC にて検出された。大量培養を行い、特異的化合物を単離したところ、fumigatinolactone (1) が得られた(図2)。化合物 1 の構造は各種 NMR および計算科学にて決定した。化合物 1 の構造中にフマリルアラニンが含まれることに着目した。*A. fumigatus* をマウスに感染させると、*A. fumigatus* のフマリルアラニン生成クラスター SidE が発現上昇することが報告されている。そこで共培養後に RNA-seq を行ったところ、共培養のみでも SidE の発現上昇が見られた。*A. fumigatus* は、RAW264 と出会うことによってストレスがかかり、フマリルアラニンを多く生成し、fumigatinolactone (1) が得られたと考えている。

また、病原真菌 *A. terreus* と急性単球性白血病細胞 THP-1 を 2 週間共培養したところ、ブチロラクトン Ia (2) が共培養時の増強ピークとして得られた。興味深いことに、2 は、マクロファージの自然免疫反応で放出される一酸化窒素 (NO) の産生を濃度依存的に抑制した (IC₅₀ 18μM)。さらに、NO の合成酵素 iNOS の発現も抑制した。さらにマクロファージから放出されるサイトカインの一つ、インターロイキン 1β の発現も転写レベルで濃度依存的に抑制した。この結果は、病原微生物がマクロファージからのストレスを受け、休眠遺伝子を活性化し、生き残ろうと免疫抑制化合物を産生したと考えることができる。

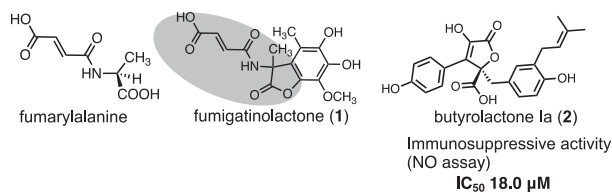


図2 微生物と動物細胞の共培養で生成する天然物

以上のように、微生物と動物細胞の共培養によって休眠遺伝子が活性化し、興味深い天然物を単離することができた。現在、本方法を、病原菌に限らず、麹カビや耐熱真菌にも応用している。

ヒト病原性真菌の内在性ストレス応答機構を活用した 神経変性疾患治療薬開発のための新規戦略

小菅 康弘

【目的】酵母のような真核生物から哺乳類まで保存されているオルガネラである小胞体は、タンパク質の合成や修飾を行うだけでなく、細胞内Ca²⁺ストアとして、また脂質代謝の場として機能するなど多様な生命機能に関与する。この細胞・個体の機能維持に重要な役割を演じている小胞体の機能不全により生じる小胞体ストレスが、脳梗塞、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病やアルツハイマー病などで認められる神経細胞死に関与することが報告されている。近年、小胞体ストレスは糖尿病、炎症や癌などにも密接に関係することが明らかにされ、この小胞体ストレスを制御する化合物の開発が国内外の研究者により行われている。「微生物、植物、動物などの天然資源から採取したサンプルに生物活性を見だし、その活性成分を製品化する」という二次代謝産物の研究は、創薬に限らず関連他分野の学問の発展にも大きく貢献してきたが、現代では頭打ち感を出しつつある。本研究では、難治性の神経変性疾患の治療薬創製を最終目標とし、真菌に潜在するストレス応答機構を利用することで、神経保護薬の探索を高効率化するための二次代謝産物ライブラリの構築を行った。

【方法】前培養後の菌株は、ポテトデキストロース培地 (PD) もしくはジクロラン・グリセロール培地 (DG18) で1週間もしくは2週間振盪培養した培養液を酢酸エチル抽出し、乾固したものをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、アッセイ用試料を得た (図1)。

マウス海馬神経細胞由来の株化細胞であるHT22細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地に、4000個/wellで播種し、37℃、10% CO₂の環境下で一晩培養したものをを用いた。小胞体ストレス依存的な細胞死の誘導には、糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシン (TM) 50ng/mLを用い、処置24時間後の生存率をMTT (3-[4,5-dimethylthiazol-

2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法にて測定した。

【結果・考察】日本大学薬学部病原微生物学研究室で保有する *Aspergillus* 属 82 菌株の他に、新たな真菌試料を獲得するため、青森県八甲田山および岩手県五葉山において土壌や植物根を採集した。ベイト法や表面殺菌法により分離培養を試みたところ、それぞれ206株、129株を得た。これらの菌体をPDもしくはDG18での培養に加えて、イトラコナゾール添加PDもしくはDG18、TM添加PDもしくはDG18で培養した抽出液を作製した。

次に、HT22細胞によりそれらの細胞活性を評価したところ、僅かな細胞死毒性を示した *Mariannaea imbricata* NUH319の代謝産物において、有意なTM誘発細胞死抑制効果が認められた。一方、その近縁種である *Mariannaea* sp. Y868の代謝産物には、細胞保護効果や細胞毒性を示すものは認めなかった。そこで、*Mariannaea imbricata* NUH319の成分探索を行った結果、5種の新規化合物と6種既知化合物を単離した。さらに、これらの新規化合物のひとつに細胞死毒性を示さずに細胞保護効果を示す化合物を見出した (図2)。

以上より、本研究で作製した二次代謝産物ライブラリは、有用な生物活性を持つ新規化合物を含有することから、小胞体ストレスが関与する神経変性疾患の新たな治療薬開発ツールとなることが期待される。

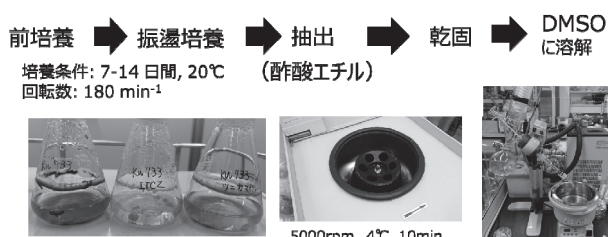


図1 糸状菌由来二次代謝産物試料の作製法

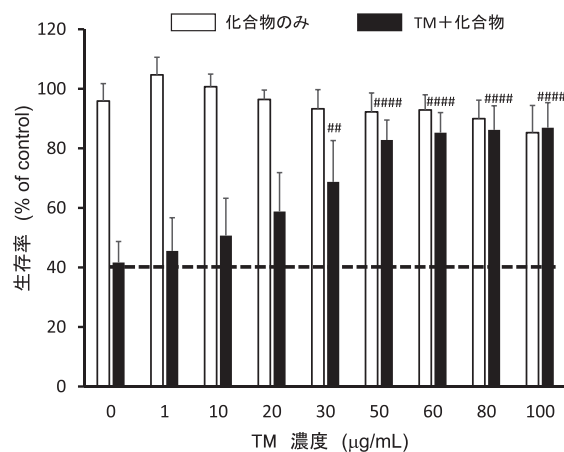


図2 *Mariannaea imbricata* NUH319 含有化合物がTM誘発細胞死に及ぼす影響

グラフは、4例の平均値±標準誤差で示した。

##P<0.01, ####P<0.0001 vs. TM alone

細菌性血管新生因子 BafA の社会実装を目指した 高活性オルソログ探索ならびに活性部位の特定

塚本 健太郎

【目的】 バルトネラ属細菌は人に感染すると血管新生を惹起し、血管増殖性病変を形成する。我々は最近、この病態形成の責任因子として菌から分泌されるオートトランスポートタンパク質 BafA を発見した。BafA はヒトの血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体の一つである VEGFR2 に作用し細胞増殖シグナルを活性化させる細菌由来の血管新生因子といえる (図1)。血管新生因子は血管研究をはじめ、創傷治癒・心筋梗塞など虚血性疾患への適用、再生医療での臓器構築等様々な用途で用いられる。本研究では、BafA のこうした分野での実用化・社会実装に向け、より高活性な BafA オルソログの探索と活性に必要な最小領域の特定を目的とした。

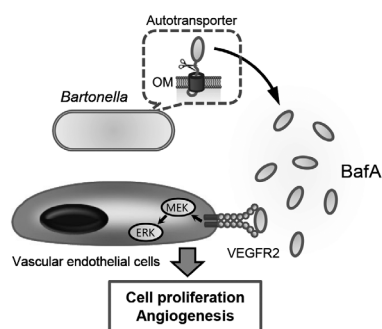


図1 バルトネラ属細菌が産生する血管新生因子 BafA

【方法】 データベースからゲノム配列情報が得られたバルトネラ属細菌の28菌種について、BafA オルソログをコードする遺伝子を各菌株からPCRで増幅もしくは人工遺伝子合成で得た後、大腸菌発現系で各BafAの組換えタンパク質を作製した。これらをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養液に添加し、HUVECに対する細胞増殖促進活性を調べた。また、その中から活性の高かったものとタンパク質収量が多かったものを選択し、それらのキメラ型タンパク質を作製した。キメラ型タンパク質の生物活性はHUVECに対する細胞増殖促進活性、管腔構造形成活性、およびVEGF受容体シグナルの活性化によって評価し、VEGFと比較した。活性領域の特定には、比較的収量の高かった *Bartonella koehlerae* 由来 BafA のN末端およびC末端領域を様々な長さで欠失させ、VEGFR2に対する結合活性とHUVECに対する細胞増殖促進活性を調べた。

【結果・考察】 バルトネラ属28菌種に由来する各BafAのHUVECに対する増殖促進活性は、菌種によって様々な違いがあることがわかった (図2)。

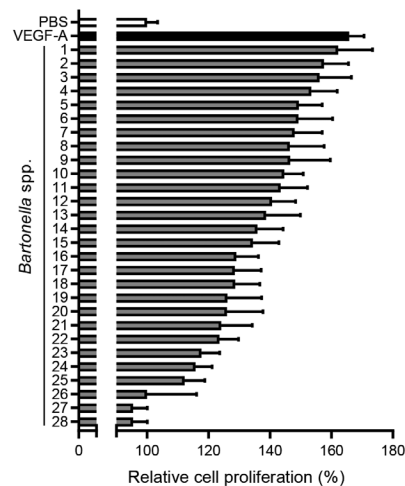


図2 種々のバルトネラ属菌種に由来するBafAの細胞増殖促進活性

次に、菌種番号6のBafAのN末端領域約360残基に、菌種番号4のC末端約90残基を繋げたキメラ型BafAを作成した結果、VEGFの1/5の低濃度でも細胞増殖活性を示す高活性なBafA変異体を作成することに成功した。さらにこのBafA変異体は、HUVECの管腔構造形成やVEGFR2シグナルの活性化をVEGFよりも低濃度で惹起した。一方、活性に必要な領域の特定を試みた結果、BafAのN末端については54残基の欠失でVEGFR2との結合が低下し、91残基の欠失で結合が完全に消失した。また、C末端領域については、427番目よりC末端側を欠失させても結合性は低下しなかったが、408番目から17残基を欠失させると結合が失われた。これらの結果から、BafAのVEGFR2への結合にはN末端とC末端領域の両方が関与していることが示唆された。さらに、これら変異体の細胞増殖促進活性を調べた結果、VEGFR2に結合するにもかかわらず、活性を示さないものが存在した。このことはBafAが細胞増殖活性を示すためには、VEGFR2への結合に加えて他にも必要な要素があることを示唆している。今後はこれらの結果を基に、高活性型BafAの実用化に向けた改良を進めていきたい。

黄麹菌における光遺伝学的手法を用いたメンブレンレスオルガネラ形成による有用物質生産

樋口 裕次郎

【目的】 微生物を用いた有用物質生産においては、目的物質を生産するために必要な酵素群を細胞内で高発現させる戦略がこれまでに多く用いられてきた。しかし、複数段階の酵素反応により目的物質が生成される場合には、中間代謝物が次反応の酵素と空間的に効率良く反応できず、結果的に目的産物の収量が多く得られないケースが考えられる。そこで本研究では、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における有用物質の効率的生産を目指し、各酵素群を相分離して形成されるメンブレンレスオルガネラによって空間的に近接させるための光遺伝学の導入を目的とした。

【方法】 まず、黄麹菌における有用物質生産の対象物質としては、希少含流アミノ酸の一種であり、高い抗酸化活性を有するエルゴチオネイン (ergothioneine, EGT) を選定した。過剰発現用の *Aotef1* プロモーター下で黄麹菌における推定 EGT 合成酵素である AoEgtA/B/C の N 末端および C 末端に改変型緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合発現する黄麹菌株をそれぞれ作製した。それらの菌株に対し、蛍光顕微鏡 (Nikon Ti2-A) による各酵素の局在解析および HPLC による EGT 生産量解析を行った。

【結果・考察】 黄麹菌における EGT の生合成は下記のように考えられる。まず、His と S-アデノシルメチオニン (SAM) から AoEgtA によってヘルシニン (HER) が生成され、そしてヘルシニルシステインルホキド (Cys-HER) が作られる。さらに AoEgtB と AoEgtC によって EGT が生成される。実際の EGFP 融合タンパク質の局在解析により、AoEgtA は細胞質に、AoEgtB と AoEgtC は細胞質にドット様構造としても観察された (図 1)。

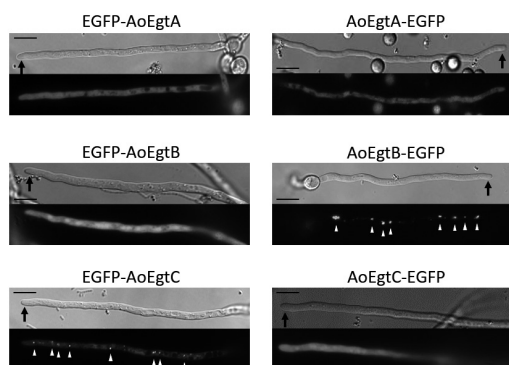


図 1 エルゴチオネイン合成酵素の細胞内局在の蛍光顕微鏡画像。菌糸先端を黒矢印で、酵素のドット様局在を白矢印で示す。スケールバーは 10 μ m。

このことから、AoEgtA の作用により His から HER を経て Cys-HER が生成され、それらの反応は細胞質で行われていることが示唆された。また、AoEgtB 及び AoEgtC によって EGT が作られると考えられることから、EGT はドット様構造で生成されている可能性が示唆された。

実際に EGT 生産量を解析した結果、AoEgtB と AoEgtC の過剰発現株では対照株と比して生産量の増加は見られなかった。一方で、AoEgtA においては EGFP-AoEgtA 過剰発現株において最も生産量の増加が見られた。この結果から、EGFP-AoEgtA が EGFP の作用で細胞内で集合して EGT の生産性を増加させた可能性が考えられた。

次に、黄麹菌細胞における光遺伝学の導入を行った。光遺伝学的手法の一つとして、Cry2-CIBN システムが存在し、青色光照射によって Cry2 と CIBN の二つのタンパク質が特異的に結合する性質により、任意のタンパク質同士を細胞内で共局在させることに利用できる。まず、黄麹菌細胞内において実際に、Cry2-CIBN システムが作動するかの確認を行った。そこで、赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した Cry2 を細胞質に、EGFP を融合した CIBN を細胞膜マーカーである AoSso1 とともに融合発現させた。そして、青色光照射によって Cry2 と CIBN が結合することにより、Cry2-mCherry の一部を細胞質から細胞膜に局在変化させることに成功し、Cry2-CIBN システムによる青色光応答が確認できた (図 2)。本システムを用いて、青色光照射によって特定のタンパク質を任意に局在制御することが可能と考えられ、今後は黄麹菌細胞を用いて RNA 相分離を含めたメンブレンレスオルガネラ形成によって有用物質生産のさらなる向上を目指した研究の展開が期待される。

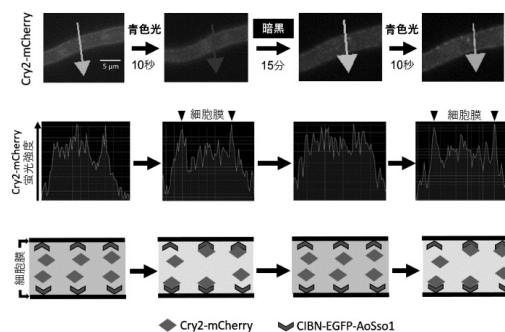


図 2 Cry2-CIBN システムの青色光応答性。上段の矢印印位における Cry2-mCherry の蛍光強度を中段に示す。また、下段は対応する模式図。

嫌気性ベンゼン分解菌の分解力を引き出す：「本当に現場で分解する」菌を目指して

水口千穂

【目的】ベンゼンは各種有機化合物の合成原料や溶媒として広く利用されているが、発がん性が高く、しばしば地下水汚染が問題になる。低濃度の汚染が広範囲に見られるような場合には、ベンゼン分解菌の利用が浄化の有力な手段となる。 *Azoarcus* sp. DN11株は好気・嫌気の両環境下でベンゼンを分解する通性嫌気性細菌であり、環境省と経済産業省が定める「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」適合株に認定されている。しかし、汚染現場での分解力が安定せず使いにくいとの声があがっていた。

これまでの研究ではDN11株の嫌気条件でのベンゼン分解経路に着目してきた。過去に実施したベンゼン分解時のトランスクリプトーム解析でフェノールの嫌気性代謝に関与する遺伝子の発現が確認されたこと、また代謝産物としてフェノールの生成が確認されたことから、DN11株はベンゼンをフェノールに変換し、フェノールの嫌気性代謝経路により分解を進めることが示唆されていた。一方、嫌気条件で実施したはずのトランスクリプトーム解析では好気条件で機能する芳香環水酸化酵素遺伝子の発現も確認された。また¹⁸O標識水を用いた代謝産物解析では¹⁸O標識フェノールの生成は確認できなかった。以上の背景から、ベンゼンからフェノールへの変換には酸素が関与する可能性が考えられた(図1)。本研究ではこの可能性を検証し、DN11株のベンゼン分解力を引き出すための培養条件を見出すことを目的とした。

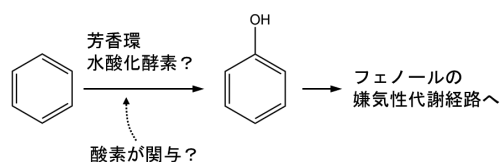


図1 DN11株の推定ベンゼン分解経路

【方法】ベンゼンからフェノールへの変換には、培地から除ききれなかった溶存酸素が使用される可能性のほか、DN11株の培養でも使用している硝酸還元条件において、脱窒過程で生じた一酸化窒素から酸素が生じる可能性が考えられた。¹⁸O標識硝酸塩の入手は困難であったため、本研究では硝酸塩の代わりに¹⁸O標識亜硝酸塩を添加した培地を使用し、¹⁸O標識フェノールが生成するか検証した。無機培地を窒素ガスでバブリングし、バ

イアルを密閉後にオートクレーブで滅菌した後、嫌気チャンバー内でベンゼンを終濃度15 μ Mとなるように添加してDN11株を植菌した。バイアル中に残存するベンゼンの定量や生成物の同定にはGC-MSを使用した。また、同様の実験系を用いて、培地に添加する還元剤(システイン塩酸塩)の濃度を変化させた時のDN11株のベンゼン分解力も評価した。

【結果・考察】培地に¹⁸O標識亜硝酸塩を添加したところ、ベンゼンの分解は確認できたものの、¹⁸O標識フェノールの生成は確認できなかった。このことから、脱窒過程で酸素は生じていないと考えられた。培地に添加するシステイン塩酸塩の濃度を変化させた際には、終濃度が0.5mM、1mMの時に、無添加の場合と比べてベンゼン分解速度が低下する傾向が見られた(図2)。また、培養14日目以降にベンゼン分解速度が低下したことから、DN11株は培地に残存する酸素を分解に使用しており、酸素が不足すると分解が進まなくなると考えられた。なお、システイン塩酸塩の濃度が4mM以上の場合には、DN11株によるベンゼンの分解は確認できなかった。

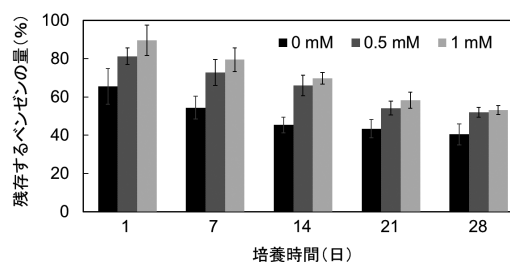


図2 培地中のシステイン塩酸塩の濃度がDN11株のベンゼン分解力に及ぼす影響

以上の結果より、DN11株は培地に残存する酸素を用いてベンゼンをフェノールに変換し、その後フェノールの嫌気性代謝経路により分解が進むことが示唆された。今後は培養系内の酸素量を定量・制御することで、DN11株のベンゼン分解力と酸素量の関係について検証する必要がある。実際の汚染現場のことを考えれば、好気条件でDN11株を培養し嫌気環境下へ接種することで前培養液中に残存する酸素量を増やしておくこと、DN11株の接種前後に短時間の曝気を行うことが、DN11株によるベンゼン分解を促進するために有用であると考えられる。

ニトリルゴムのバイオリサイクル法の開発

杉森大助

【目的】 ニトリルゴム (NBR) は、オイルシールや使い捨てグローブなど世界中で広く利用されている。NBR 製品製造時の端材および使用済み NBR の多くが焼却処分されているため、有効なリサイクル方法の開発が望まれている。本研究では、NBR のバイオリサイクル法を開発を目指し、NBR 分解菌の探索および NBR 分解代謝経路、分解に関与する酵素について明らかにすることを目的とした。

【方法】 NBR を C、N 源とした無機培地を用いて土壌等から NBR 分解菌を探索した。NBR 分解活性は NBR シート (1cm 角×1mm 厚) の分解前後の乾燥重量変化により評価した。NBR 分解菌の分類学上の同定は 16S rDNA 解析により行った。NBR 分解の代謝経路と分解に関与する酵素を明らかにするため NBR 分解酵素の局在性試験、精製条件検討、分解生成物分析を行った。酵素活性は上述と同様に酵素反応前後の NBR シートの乾燥重量変化により評価した。酵素反応後の気相、水相、沈殿物について IR、NMR、MALDI-TOFMS 等を用いて分解生成物の同定を試みた。さらに、ゲノム解析、RNA 変動解析により NBR 分解に関与する酵素遺伝子の推定を試みた。

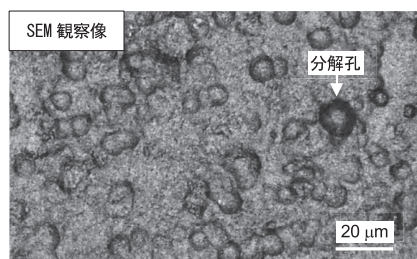


図1 NBR 分解菌による NBR 分解の様子

【結果・考察】 37°C、1 週間培養で NBR を 6.5% 分解した放線菌 A 株を取得した。培養条件検討により、本菌株は NBR を最大で 11% 分解した。分解後の NBR シート表面を SEM、AFM 観察した結果、シート表面に直径 5-10 μm × 深さ 1-3 μm 程度の分解孔が多数観察された (図 1)。NBR 分解酵素の局在性試験の結果、NBR 主鎖分解酵素は細胞表層に局在していることがわかった。細胞膜画分を界面活性剤で可溶化後、2 種類のカラムクロマトグラフィーにより目的酵素を精製し、NBR の酵素分解試験を行った。その結果、pH 8、37°C、24h で NBR を 1.5% 分解した。また、酵素反応にともない O₂ 消費とアルデヒド生成が認められた。IR 分析の結果、シート表面に存在していた -C=O 基の消失と -CN 基の減少が認められた。この結果は、酵素反応によって NBR 中のアクリ

ロニトリル (AN) ユニットが 39wt% から 34wt% に減少し、-C=O 基は検出されなかったという ¹³C-NMR の分析結果と良く一致した。これらの結果から、NBR 主鎖中のブタジエンユニットと AN ユニット間の C-C 結合が優先的に切断され AN ユニットが遊離、その際に生じたラジカルが再結合することによって AN 含量が減少したものと考えられる。FE-EPMA 分析の結果、C 原子が 37% 減少、N 原子が 7.4% 減少、O 原子が 2.4 倍増加することがわかった。以上の結果から、顕著に増加した O 原子は NBR の酸化によって生じたものではなく、NBR に充填材として混練されたシリカが露出したものと考えられる。酵素反応後の気相を GC-MS 分析した結果、シアノ基を含む芳香族化合物が検出された。同化合物は NBR の熱分解生成物として報告例があることから、酵素反応においても NBR 熱分解と同様の反応が起こっている可能性が考えられた。さらに、酵素反応によって NBR 中に含まれるカーボンブラックと思われる黒色微粒子と、分解生成物と考えられる乳白色物質の沈殿が生成した。乳白色沈殿を IR 分析した結果、-C=O、-C=CH の存在を示唆するピークが検出されたことから、水に不溶性の分解生成物は -C=O を含む NBR 酸化物と推定した。酵素反応後の水相を MALDI-TOFMS 分析した結果、1、2 個の O 原子を含む分子量約 750~2500 程度の NBR オリゴマー (繰り返し単位 6~20 程度) と予想される物質が検出された。

A 株のゲノム解析、mRNA 変動解析の結果、少なくとも 2 種類の酸化酵素 OX1,2 が NBR 分解に関与する可能性が高いと考えられた。NBR 添加培養時に mRNA 転写量が約 7 倍向上した OX1 を大腸菌組換え生産した結果、微弱ながら NBR 分解活性が認められた。OX1 のアミノ酸 (aa) 配列は、既知天然ゴム酸化酵素の aa 配列と類似性が極めて低かったことから、新奇なゴム分解酵素の取得に成功したと考えられる。

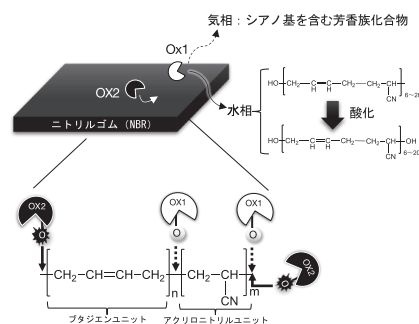


図2 NBR 分解菌 A 株による NBR 分解様式

ポリエチレンテレフタレート分解微生物・酵素の探索

飯塚 怜

【目的】 2016年にポリエチレンテレフタレート（PET）を資化する細菌が発見されたことが契機となり、微生物や酵素を利用したPET分解に高い関心が寄せられるようになった。また最近、PET分解能を有する酵素は環境中に広く存在することが示され、新たなPET分解微生物・酵素の発見が期待されている。しかし、その効果的な探索法は確立されていない。そこで本研究では、新たなPET分解微生物・酵素探索法を開発することを目的とした。また本研究では、当初の計画に加え、メタゲノム法によるPET分解酵素の探索も並行して進めた。

【方法】 粉体化PETを用いたPET分解微生物の探索法の開発 PETフィルム、ボトルやパッケージなどの使用済みPET製品をマイクロメートルサイズに粉体化した。粉体化前後のPETに好熱性放線菌 *Saccharomonospora viridis* 由来PET分解酵素（Cut190）を作用させ、その分解度を比較した。

メタゲノム解析 高温発酵堆肥よりメタゲノムを抽出し、ショットガンシーケンス解析を行った。得られたコンティグに対し、Leaf-branch compost cutinase をクエリにした Local BLAST 検索を行い、PET分解酵素遺伝子を探索した。またメタゲノムを鋳型に、PET分解酵素遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いてPCRを行った。増幅産物をクローニングし、シーケンスを決定した。得られた遺伝子の末端にHisタグ配列を挿入し、大腸菌で組換え発現させた。その可溶性画分あるいは精製タンパク質を用いて、ポリエステル・PET分解活性を調べた。

【結果・考察】 粉体化PETを用いたPET分解微生物の探索法の開発 PETを粉体化すれば、比表面積が増大し、酵素による分解が迅速に進行するため、PET分解微生物・酵素の探索が容易になると考えた。そこでその原理実証を、Cut190を用いて行った。その結果、粉体化PETは同重量のPETフィルムに比べ、2倍以上分解された。使用済みPET製品も、粉体化することで分解性が向上した。また、粉体化PETと油中水滴を用いたPET分解微生物の探索法として「光散乱を利用した探索法」、「油中水滴の変形能を利用した探索法」、「増殖を指標にした探索法」を考案し、その要素技術の確立に成功した。

メタゲノム解析 高いPET分解能を示す酵素の多くは、堆肥由来の好熱性放線菌のクチナーゼである。そこで、高温発酵堆肥より抽出したメタゲノムのショットガンシーケンス解析を行った。その結果、PET分解酵素をコードすると思しき遺伝子を5種類見出した。このうち

の1つはC末端領域を欠いた読み枠であったが、その遺伝子産物のアミノ酸配列は *Thermoanaerobacterales* 目細菌の α/β hydrolase と100%一致した。この α/β hydrolase を大腸菌で発現させ、精製した。精製酵素をPETフィルムと混合したところ、溶液が白濁し（図1上）、フィルムの重量が減少した（図1下）。また反応溶液中に、分解産物であるテレフタル酸およびモノヒドロキシエチルテレフタル酸の存在が確認された。これらの結果から、PET分解能を有することが示された。この研究を進めている間に、他の研究グループより、筆者らが見出した α/β hydrolase とほぼ同一の配列の酵素が高いPET分解活性を示すことが報告された。Sonnendeckerらは、PET分解酵素遺伝子に対するユニバーサルプライマーを設計し、堆肥メタゲノムよりPET分解酵素を得た。そこで同じプライマーを用い、新たなPET分解酵素の取得を目指した。高温発酵堆肥より抽出したメタゲノムを鋳型にしてPCRを行い、得られた増幅産物をクローニングした。その結果、32種類の候補遺伝子を得ることができた。いずれの遺伝子産物も、好熱性放線菌（*Thermobifida* 属細菌、*Actinomadura* 属細菌、*Thermoanaerobacterales* 目細菌）のクチナーゼ、エステラーゼなどと高い相同性（ $\geq 84\%$ ）を示した。またその2/3は、先行研究で得られたPET分解酵素（PHL1, 2, 3, 7）と類似していた。各遺伝子を実験室で組換え発現させ、26種類のタンパク質を可溶性画分に発現させることに成功した。このうちの多くはポリエステル・PET分解活性を示し、その活性は近縁酵素に類似する傾向にあった。以上の結果から、このユニバーサルプライマーを用いた探索はPET分解酵素のバリエーションを増やす方法として有用であるが、新規性の高い酵素を得ることは難しいと考えられた。

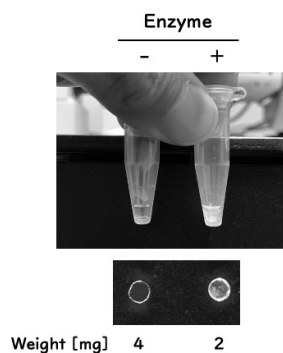


図1 精製酵素のPET分解能

水環境中の多様な捕食性細菌による捕食特性の解明と その持続的なウキクサバイオマス高効率生産への応用

井上大介

【目的】 ウキクサ科植物は水質浄化とバイオマス生産の両面で有望な水生植物として知られている。他方、ウキクサ表面には多種多様な細菌が生息し、ウキクサの成長や生理状態に重大な影響を及ぼしている。そのため、細菌群集を適切に制御することにより、ウキクサの水質浄化能及びバイオマス生産能を向上させることが可能になると考えられる。そこで本研究では、他の細菌を溶解し細胞成分を栄養源として生育する捕食性細菌を活用した細菌群集制御による持続的かつ効率的なウキクサバイオマス生産を構想し、基礎研究に取り組んだ。具体的には、水環境中に生息する捕食性細菌を取得し、それらの溶菌・捕食特性、ならびにウキクサ表層に生息する細菌群集の改変効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】 *Escherichia coli* HB101, *Acidovorax* sp. DW036, *Methylophilus* sp. DW102 を餌細菌として添加した重層寒天培地を用い、池水及び汚泥試料を微生物源として、捕食性細菌を探索した。純粋分離された捕食性細菌の中から選抜した代表株を対象として、溶菌・捕食特性を調査した。さらに、コウキクサ (*Lemna minor*) と細菌群集との共生系を用い、捕食性細菌のコウキクサ表面への定着と細菌群集改変効果について検討した。

【結果・考察】 複数の微生物源から捕食性細菌を探索した結果、偏性捕食性の *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs) に含まれる *Bdellovibrio* 属の3株及び *Bacteriovorax* 属の1株、通性捕食性細菌である *Myxococcus* 属の3株及び *Arenimonas* 属の1株、*Myxococcota* 門に属する未同定の1株の計9株の捕食性細菌を分離することができた。図1には、微小細胞をもつことが知られる BALOs の代表として、*Bacteriovorax* sp. HI3 の電子顕微鏡画像を示している。

分離菌株のうち、偏性捕食性の *Bacteriovorax* sp. HI3 と通性捕食性の *Myxococcus* sp. MH1 を対象として、53株の細菌（グラム陰性菌45株、グラム陽性菌8株）に

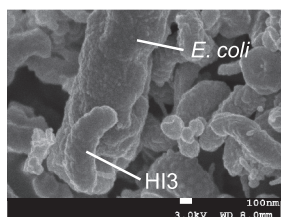


図1 *E. coli* との共培養時の *Bacteriovorax* sp. HI3 の走査型電子顕微鏡画像

対する溶菌の可否を調べたところ、*Bacteriovorax* sp. HI3 はグラム陰性菌26株を溶菌可能であるが、グラム陽性菌は溶菌しないこと、*Myxococcus* sp. MH1 は53株すべてを溶菌できることが明らかとなった。また、*E. coli* HB101 を餌細菌として添加したバッファー(pH 7.4)を用い、両菌株が旺盛に捕食する28℃で捕食挙動を詳細に解析した結果、溶菌の速度及び強度は *Bacteriovorax* sp. HI3 が優れるものの、同株により一旦減少した餌細菌は再び増加することが観察され(図2)、捕食性細菌の種類により、溶菌・捕食特性が顕著に異なることが明らかとなった。

次に、コウキクサ表面の優占系統6種を用いたシンプルなコウキクサ-細菌群集共生系、及び池水微生物群を用いて構築した複雑なコウキクサ-細菌群集共生系に対して *Bacteriovorax* sp. HI3 を植種し、コウキクサ表面への定着と元々生息する細菌群集の改変効果について検討した。特異的プライマーを用いた qPCR による定量の結果、*Bacteriovorax* sp. HI3 は無菌コウキクサ(次亜塩素酸ナトリウム水溶液で無菌化)には定着しなかったが、細菌群集が存在するコウキクサ表面では生残したことから、コウキクサ表面の細菌群を捕食して定着し得ることが明らかとなった。また、*Bacteriovorax* sp. HI3 の定着量は、土着の捕食性細菌に影響されることも示唆された。他方、*Bacteriovorax* sp. HI3 の植種により、*Pseudomonadaceae* 科が顕著に減少するなど、コウキクサ表面の細菌群集が元とは異なる構造に変化し安定することが観察され、捕食性細菌をウキクサ表面の細菌群集の制御に活用可能であることが示された。本研究では細菌群集改変に伴うコウキクサの成長促進は確認できなかったが、適切な捕食性細菌を選択することにより、持続的・効率的なウキクサバイオマス生産にも応用可能であると期待される。

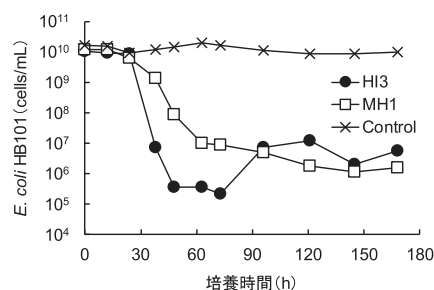


図2 *Bacteriovorax* sp. HI3 及び *Myxococcus* sp. MH1 による *E. coli* HB101 の捕食挙動

Aureobasidium pullulans の細胞壁構造から超高分子β-グルカンの分泌機構を学ぶ

東 雅 之

【目的】 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁主成分であるβ-1,3-グルカンは、UDP-グルコースを基質として細胞膜酵素 FKS1 によって合成されるが、細胞外には分泌できない。食品に利用される *S. cerevisiae* が自然免疫を活性化するβ-グルカンを分泌できれば、発酵食品への新たな機能付与に繋がりその意義は大きい。一方、FKS1 と相同な酵素によるβ-グルカン合成が予想される二形性酵母 *Aureobasidium pullulans* は、β-グルカンを大量に分泌生産する。本研究では、*A. pullulans* のβ-グルカン分泌機構の理解から、*S. cerevisiae* におけるβ-グルカン分泌株の構築に繋がる情報を得ることを目的とした。具体的には、*A. pullulans* の細胞壁を生化学的に解析し *S. cerevisiae* と比較した。また、細胞壁を構成するグルカンと分泌されたグルカンの構造を比較した。さらに、細胞壁形成への関与が予想される遺伝子の発現量を解析した。

【方法】 グルカン分泌量の測定

β-グルカン高分泌株 *A. pullulans* TS1 株を使用した。菌糸形態の誘導には PDB 培地、酵母形態の誘導には Czapek 培地を使用し、50mL の培養液を含むフラスコで、27℃で72時間回転培養した。培養上清のエタノール沈殿物を硫酸加水分解し HPLC を用いグルコース量を測定した。

TS1 株と *S. cerevisiae* の細胞壁成分の解析

各形態に誘導した TS1 株と *S. cerevisiae* BY4741 株の細胞壁主要高分子の成分量を測定した。菌体をビーズ破砕処理した後に細胞壁画分を回収した。グルカンとマンナンの量は細胞壁画分を硫酸加水分解し HPLC を用い定量した。キチン量は酵素で N-アセチルグルコサミンに分解し、DMAB 試薬で呈色後に 585nm 吸光度から測定した。細胞壁タンパク質量は BCA 法により測定した。

細胞壁グルカンと分泌グルカンの解析

分泌β-グルカン（培養上清のエタノール沈殿物）と細胞壁β-グルカン（所定の方法で取得）の構造を¹H-NMRで解析した。β-グルカンに関しては、β-1,3-グルカン分解酵素処理と透析を行い、透析で外液に抜けた糖量をβ-1,3-グルカン量、内液に残った糖量を長鎖のβ-1,6-グルカンとした。

qRT-PCRによる遺伝子発現量の測定

各形態に誘導した細胞について、細胞壁形成への関与が予想される遺伝子の発現量を測定した。mRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。RT-PCRにより *FKS1*、*GAS1*、*AGS1* などの発現量を測定した。

【結果・考察】 グルカン分泌量の測定

菌体当たりのグルカン分泌量は、酵母形態に誘導した

方が菌糸形態に誘導したものより約4倍多く分泌した。

TS1 株と *S. cerevisiae* の細胞壁成分の解析

細胞壁の高分子組成の分析結果を表1に示す。TS1 株の酵母と菌糸の形態間で組成に大きな違いはなかった。TS1 株と BY4741 株の比較では、TS1 株はグルカン量が多く、マンナン量が少ないことが分かった。この違いがβ-グルカンの分泌に影響する可能性が考えられる。

表1 細胞壁を構成する高分子の割合 (%)

	グルカン	マンナン	キチン	タンパク質
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	45	35	1	5
<i>A. pullulans</i> TS1 酵母	63	9	1	4
<i>A. pullulans</i> TS1 菌糸	60	6	1	5

細胞壁グルカンと分泌グルカンの構造解析

¹H-NMRの解析から、細胞壁グルカンと分泌グルカンは共にα-グルカンは検出されず、β-グルカンで構成されていることを確認した。また、長鎖のβ-1,6-グルカンは細胞壁グルカンのみに存在していたが、β-1,3-とβ-1,6-の比は分泌グルカンが約1:1に対し、細胞壁グルカンは菌糸形態で3:2、酵母形態で5:2となりβ-1,6-の割合は分泌グルカンが多かった。長鎖のβ-1,6-グルカンがβ-1,3-グルカンが細胞壁に留まることに影響する可能性が考えられる。

qRT-PCRによる遺伝子発現量の測定

FKS1 はβ-グルカン分泌量が多い酵母形態で発現量が菌糸形態より高かった(図1)。β-1,3-グルカンの細胞壁固定への関与が予想された *GAS1* では顕著な違いは見られなかった。また、α-グルカン合成への関与が予想された *AGS1* は発現量が極めて低く、α-グルカンを合成しないことが示唆された。

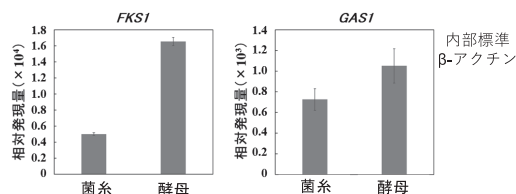


図1 菌糸及び酵母形態での遺伝子発現量の比較

その他

S. cerevisiae では *GAS1* 遺伝子欠損株でごく微量のβ-グルカンが分泌されることが分かっていたが、*GAS1* との欠損の組み合わせにより分泌量が増える細胞壁関連遺伝子 *CCW12* を見出し、それらに *FKS1* の過剰発現を加えた株についても分泌グルカン量の解析を進めている。

α -アミノ酸の二量化による有用芳香族複素環化合物の創製

榎 尾 俊 介

【目的】ピラジンをはじめとした含窒素複素環化合物は香料、医薬品、色素原料などとして広く利用されている。近年、我々は *Pseudomonas fluorescens* のピラジン生合成遺伝子 *papABCDEF* を発見した (図1)。本経路の α -オキソアミン合成酵素 PapD は α -アミノ酸の 4-アミノフェニルアラニン (4APhe) から、ピラジン前駆体のアミノケトン (APB) を生成する。本研究では、 α -アミノ酸を原料とした多様なピラジン生産系の構築を目指し、PapD の基質特異性の改変に取り組んだ。

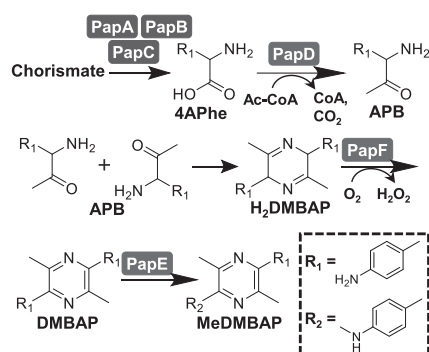


図1 *P. fluorescens* SBW25 の新規ピラジン生合成経路

【方法】PapD の立体構造および基質とのドッキングモデルは、AlphaFold2 および CB-Dock2 を用いて作製した。PapD 発現用プラスミドを鋳型とした PCR により *papD* に変異を導入し、HisTrap カラムを用いて精製酵素を取得した。エルマン試薬を用いて酵素反応により生じる遊離の CoA を定量することで PapD の比活性を求めた。SU-8 および PDMS 樹脂を用いてドロップレット作製のマイクロデバイスを作製した。

【結果・考察】PapD と基質のドッキングモデルを基に、基質認識に関わるアミノ酸残基を予測した。その結果、PapD の 200 番目のセリン残基 (S200) と 4APhe のベンゼン環のアミノ基とが近い位置にあり、その酸素原子と窒素原子の距離は約 2.2 Å であることが示された (図2)。当該残基、およびピリドキサルリン酸 (PLP) が結合する 260 番目のリジン残基近傍のロイシン残基 (L258) に着目し、これらをそれぞれアラニンおよびフェニルアラニンに置換した変異酵素 S200A および L258F を調製した。4APhe を含む種々の α -アミノ酸に対する野生型 PapD (WT), S200A, L258F の比活性を測定したところ、WT は本来の基質である 4APhe の他に、チロシン、フェニルアラニンに対して弱い活性を示したが、S200A はす

べてのアミノ酸に対して活性を示さなかった。一方、L258F はフェニルアラニンに対する比活性は野生型と同様であったが、4APhe およびチロシンに対する比活性が野生型に比べ 1.5 倍程度高かった。これらのアミノ酸残基が基質の認識に関与することが示唆された。WT および L258F の酵素反応液を LC-MS 分析に供したところ、チロシンおよびフェニルアラニンから当該ピラジンが生成していることが示された。

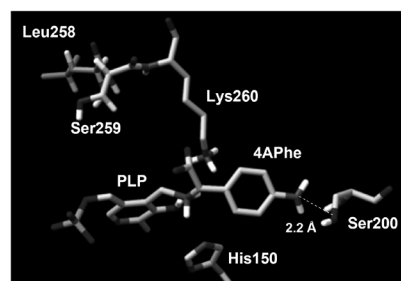


図2 PapD と PLP-4APhe のドッキングモデル

S200 および L258 をターゲットとし、前後のアミノ酸残基も含めた領域にランダム変異を導入した発現株ライブラリーをそれぞれ作製した。96 ウェルプレートを用いたアッセイ系を用いて変異株の各アミノ酸に対する活性を測定したものの、目的酵素は得られなかった。よりハイスループットなスクリーニングを実施するため、water in oil in water (W/O/W) ドロップレットの作製法を開発した。独自に設計したマイクロデバイスを用いて、平均内径 13 μ m、直径 20 μ m の W/O/W ドロップレットを 667 Hz の頻度で安定的に作製することに成功した。OD600 が 0.1 の大腸菌液を用いてドロップレットを作製すると、全体の 26% のドロップレットに 1 菌体が封入されることが示された。これを回収し、37°C で 18 時間インキュベートしたところ、ドロップレット内で大腸菌が増殖した。CoA-SH 標準液と検出用蛍光試薬を含むドロップレットを作製し蛍光顕微鏡観察を行ったが、蛍光が弱く、CoA-SH の遊離を指標に PapD のスクリーニングを行うには、より高感度の検出系が必要であることが示された。

本研究により PapD の基質認識に関わると予想されるアミノ酸残基が特定された。チロシンとフェニルアラニンから新たなピラジンを生産することにも成功した。また、ドロップレットを用いたスクリーニング系の基礎を構築することができた。

腸内細菌が産生する芳香族アミノ酸による腸管病原菌の感染制御

西山 啓太

【目的】腸管病原菌の多剤耐性化は脅威であり、腸管感染症の制御は重要な課題である。多剤耐性菌の対応策の一つに健常者の便移植療法の有効性が知られる。これは、腸内細菌叢がもつ外来細菌への抵抗性を利用し、多剤耐性菌の腸管定着を排除するものである。このように、多様な細菌から構成される腸内細菌叢は、その均衡性を維持するための共生機構を持つ。これまでに、ヒト便を用いた共培養実験から、腸内細菌由来の代謝産物が *Bifidobacterium* の腸管接着因子である線毛の発現を誘導し、腸内定着を促進することを見出した。さらに、分離・精製技術を駆使し、特定の *Clostridium* が産生する芳香族化合物の一種 Phenylpropionic acid (PPA) を責任物質として同定した。すなわち腸内には、異種細菌の共生関係を司るシグナル物質が存在することを意味している。一方、PPA はいくつかの細菌に対して抗菌活性を示すことが知られており、*Clostridium sporogenes* が産生する PPA の異なる2つの性質に着目し、特に PPA が腸管病原菌の増殖や感染に及ぼす影響を理解し、感染予防に応用することを目的とした。

【方法】*C. sporogenes* の培養上清の *Salmonella* Typhimurium に対する抗菌活性を agar well diffusion 法により確認した。次に、PPA の特性を評価するため、複数の腸内細菌に対する増殖阻害活性を継時的な濁度測定により評価した。また、*S. Typhimurium* の蛍光色素 SYTOX の取り込み試験から膜の透過性変化を確認し、さらに緑色蛍光タンパク質を発現した *S. Typhimurium* の細胞内 pH を測定することで、PPA による抗菌活性の作用機序について調べた。In vivo 試験として、無菌マウスに *C. sporogenes* と *Bifidobacterium longum* を定着させたノトバイオートマウスを用い、そこに *S. Typhimurium* を経口感染させた際の感染率を生菌数測定により評価した。

【結果・考察】*S. Typhimurium* を播種した寒天培地に *C. sporogenes* の培養上清をスポットし阻止円の形成を確認したところ、*C. sporogenes* 野生株の培養上清は増殖阻害活性が認められたが、*C. sporogenes* PPA 非産生株の培養上清では活性は顕著に低下した。したがって、*C. sporogenes* の培養上清に含まれる PPA が重要な物質であることが示唆された。次に、PPA が複数の腸内細菌（約30菌種）の増殖に及ぼす影響を評価した。PPA は10mM でグラム陽性・陰性細菌に対して広く増殖阻害活性を示したが (MIC₉₀)、*C. sporogenes* の培養上清や腸内で検出される

PPA 濃度と比較し、生理的なレベルとは言えなかった。そこで、腸内での主要な有機酸である酢酸を10mM添加したところ、1.25mM PPA でも十分な抗菌活性を示し (図1)、とりわけ *S. Typhimurium*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae* など複数のグラム陰性細菌に対して増殖阻害活性が認められた。さらに多剤耐性大腸菌に対しても同様の効果を示した。一方、グラム陽性細菌や *Bacteroides* に対しては、本濃度での増殖阻害活性は確認できなかった。

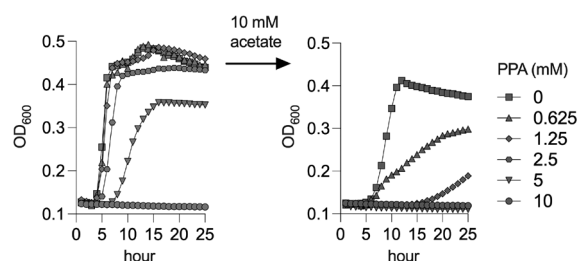


図1 *Salmonella* Typhimurium の増殖評価 (各濃度の PPA と 10mM 酢酸が増殖に及ぼす影響を濁度にて評価した)

PPA が *S. Typhimurium* の膜透過性に及ぼす影響を SYTOX 取り込み試験により評価したところ、PPA 存在下で細胞内への取り込みの顕著な上昇が確認された。さらに GFP を発現した *S. Typhimurium* を用いて細胞内 pH を測定したところ、PPA や酢酸のみでは生理的な細胞内 pH を維持していたが、PPA と酢酸が同時に存在すると細胞内 pH が顕著に低下した。すなわち、PPA による細胞膜の透過性変化と酢酸による細胞内 pH の低下が、PPA による増殖阻害活性のメカニズムと考えられた。

以上の結果を受け、*C. sporogenes* と *B. longum* を無菌マウスに定着させたノトバイオートマウスをモデルに、*S. Typhimurium* を経口感染させた。*S. Typhimurium* 単独感染群では全個体の最大生存日数は感染後5日であるのに対し、*C. sporogenes* と *B. longum* を前投与した群は感染後10日目でも8割以上の個体が生存した。*C. sporogenes* PPA 非産生株ではこのような効果は認められなかった。

これらより *C. sporogenes* が産生する PPA がグラム陰性病原菌の増殖や感染において密接に寄与すること、さらに本菌種やその代謝産物を腸管病原菌の感染制御に利用できる可能性が考えられた。

日本人の腸内に特有な酢酸生成菌の多様性解析および新規分離株の取得

山田 千早

【目的】腸内フローラとヒトの健康との関連性が注目を浴びているが、その形成機構には不明な点が多い。腸内において糖などの発酵により発生する水素は主に酢酸生成菌・メタン生成菌により消費されるが、そのどちらが優占するのには個人差がある。特に日本人では酢酸生成菌が優占する傾向にあり、その健康・長寿との関連が期待されている（図1）。

しかしこれまでにヒト腸内酢酸生成菌として分離され詳細に研究されているのはモデル微生物である *Blautia* 属細菌のみであり、腸内における酢酸生成菌の多様性、生理生態、ヒト健康への影響は不明な点が多い。そこで本研究では、日本人の糞便サンプルを対象とした酢酸生成菌の機能遺伝子解析、集積・分離培養により、腸内における酢酸生成菌の多様性を解明し新規分離株を取得することを目的とする。

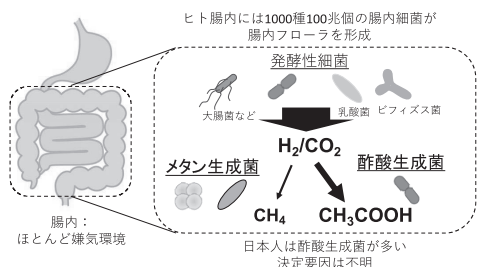


図1 水素をめぐる競争するメタン生成菌と酢酸生成菌

【方法】

・機能遺伝子解析による酢酸生成菌の多様性解析
 サンプル：日本人の糞便サンプル（子供および大人）
 糞便サンプル・集積培養液から核酸を抽出し特異的プライマーを用いたPCR、塩基配列解析を行った。一般的な系統分類の指標となる16S rRNA 遺伝子に加え、酢酸生成菌の中心代謝系（還元的アセチル CoA 経路）に特徴的な機能遺伝子 (*acs*, *fthfs*) を対象に解析し、日本人の腸内にどのような種類の酢酸生成菌がどのくらい存在しているのかを明らかにした。

・腸内酢酸生成菌の集積培養
 酢酸生成菌の培養時には基質として2気圧（200kPa）程度の水素を供給するのが一般的である。しかしこれは実環境の水素濃度（1～100Pa）とはかけ離れており、それが腸内酢酸生成菌の分離培養例が少ない要因の一つであると考えられる。本研究では、0 価の鉄粉を培地溶液に

添加し、鉄の腐食作用によって発生する水素を培養槽の気相に供給する低水素供給培養システムを利用し、より実環境に近い条件下で酢酸生成菌の集積を試みた。糞便サンプルを微生物源とし低水素供給培養システムで集積培養を行い、水素消費および酢酸生成をモニターし酢酸生成菌の増殖を確認した。また、メタン生成菌の生育を抑えるために阻害剤（10mM 2-プロモエタンスルホン酸）を集積培地に添加した。

【結果・考察】

・日本人糞便サンプルを対象とした16S rRNA 遺伝子解析および機能遺伝子解析による酢酸生成菌の多様性解析
 大人糞便サンプル5つと子供糞便サンプル3つからDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子解析、Wood-Ljungdahl 経路を担う遺伝子である *acsB* と *fthfs* 遺伝子の増幅と解析を行った。子供の糞便（0歳児、1歳児、4歳児）からは *Blautia* 属細菌が検出されていなかったのに対して大人の糞便では10%程度占めていた（図2）。*ascB* と *fthfs* の増幅を行ったため多様性解析を行うところである。

・腸内酢酸生成菌の集積培養
 低水素供給培養条件および高水素培養条件で集積培養を行った結果、高水素培養条件（100kPa, 20% H₂ 80% CO₂）で水素の消費が見られたが、酢酸量の増加は見られなかった。酢酸を消費する細菌も同時に集積されている可能性があり、集積培養を引き続き行っている。*Blautia* 属細菌が検出されなかった子供の集積サンプルにおいて、水素消費が見られていたため、引き続き集積培養を行っており、他の糞便サンプルについても集積培養を開始するところである。

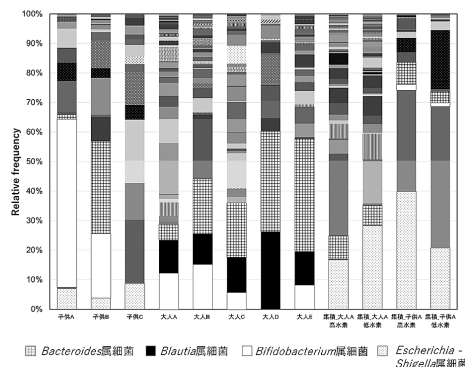


図2 日本人糞便サンプルと集積培養液の16S rRNA 遺伝子解析

国内における外生菌根性担子菌類 *Tomentella* 属の 分類学的研究と分離培養法の確立による菌株拡充

早乙女 梢

【目的】 広義 *Tomentella* 属（担子菌門イボタケ目）は、子実体が背着生、子実層托が平滑～針状、子実層表面が赤褐色～黄褐色～黒色で、菌糸の隔壁にクランプを有し、担子胞子が球形～多角形、担子胞子表面に不規則で微小な突起があることによって特徴づけられる。本属は、枯死木上や土壌表面に薄膜状（コウヤクタケ型）の子実体を形成し、外生菌根性樹種に加え、ツツジ科やラン科、葉緑体を欠くギンリョウソウを含むシャクジョウソウ科など多様な植物と共生関係を持ち、冷温帯域～熱帯域に汎世界的に分布する。

NCBI データベースには、本分類群の DNA 配列が約 9,000 も登録されるが（2023 年 3 月）、その大半は環境 DNA や菌根由来で、子実体の特徴に基づき種が同定されたものはごく少数である。Index fungorum によると約 200 種が本属種として掲載されているが（2021 年 3 月）、国内既知種は 3 種のみであり、日本産本属菌の分類学的研究は未着手である。そこで、本研究では、国内に分布する広義 *Tomentella* 属の種構成を明らかにすることを旨とし、各地で子実体（標本）を収集し、分類学的検討を行った。また、難培養性であるため、国内外の菌株保存機関には提供可能な本属種の菌株は限られている。本研究では、多孢子分離法を用い、類似種と本属種の菌株拡充も試みた。

【方法】 新型コロナウイルスの蔓延防止のため、県外移動は厳しく規制されていたが、それでも 2019 年～2022 年に 8 道県（岡山県、鹿児島県、静岡県、鳥取県、兵庫県、長野県、北海道、山口県）にて子実体を収集し、これらの一部を多孢子分離に供試した。DNA 抽出は、実態顕微鏡下で僅かに掻き取った担子胞子および菌糸より行った。ITS 領域および nrLSU 領域の部分配列を TA クローニング法またはダイレクトシーケンス法で決定し、最尤法およびベイズ法で分子系統樹を構築した。子実体の肉眼的形態的特徴に加え、顕微鏡的な特徴を光学顕微鏡で観察し、種の分類形質として重要な担子胞子表面の微細構造については走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果・考察】 国内各地での採集調査の結果、広義 *Tomentella* 属として 55 標本を得た。NCBI データベースに登録される DNA 配列のうち、タイプ標本由来や分類学的研究により同定されているものを加え、類似種 3 属を含む 110 配列による分子系統樹を作成した。nrLSU 領

域については、13 属 59 配列を用いて分子系統解析を行い、結果、各領域の系統樹間に矛盾がないことを確認した。次に、分子系統関係、形態的特徴、文献情報を併せて分類学的に各標本を検討し、結果、得られた 55 標本のうち、9 標本は日本既報告種 2 種（*Thelephora ellisii* (= *Tom. ellisii*) および *Th. terrestris*) と日本新産種 4 種（*T. papuae*, *T. pilosa*, *T. tedersooi* および *T. viridula*）と同定した（図 1, 2）。残りの 46 標本は子実層托の形状や色、

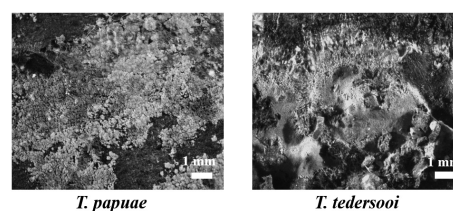


図 1 日本新産種の子実体。

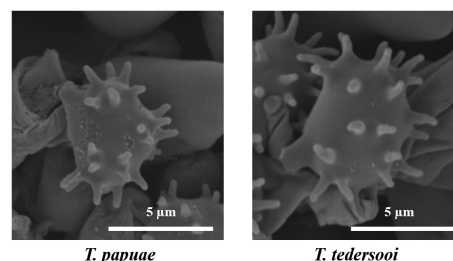


図 2 日本新産種の担子胞子（側面）。

菌糸表面への結晶付着の有無、菌糸束の形成および担子胞子の色や特徴に既知種と差異のある多数の未同定種で構成されることを明らかにした。本研究により、国内には菌根や環境 DNA としても検出されていない未記載種が多数存在することが明らかとなった。本研究で検出された未同定種のうち、鳥取県のスダジイ林で複数の標本（7 標本）が採集された菌種やラン菌根に由来する登録配列と同一の単系統群を形成する菌種（2 標本）について、新種の可能性を含めた検討を進めている。

本研究により、広義 *Tomentella* 属に加え、近縁な属である *Pseudotomentella* 属 1 種を含む合計 5 菌株を確立することに成功した。これらは、鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターに寄託し、DNA 配列と菌株情報を付与して公開する予定である。

細菌のセカンダリータンパク質分泌モーター SecDF の活性化状態構造の基盤

塚崎 智也

【目的】 細菌は、ペットボトルを分解する酵素やペロ毒素など様々なタンパク質を細胞外へと分泌する。この分泌過程は Sec タンパク質群が担っている。SecYEG 複合体がタンパク質膜透過チャンネルを形成し、2つのモータータンパク質が関与する。一つは細胞質に存在する SecA ATPase であり、ATP の加水分解のエネルギーを利用してタンパク質の輸送を促進する。もう一つが膜タンパク質 SecDF (プロトン駆動のモーター) である (図1)。分泌される前のタンパク質はシグナル配列があり、この情報をもとに Sec 複合体に運ばれたのち、アンフォールドのまま膜を超えて細胞質外へと輸送されていく。最終的に基質タンパク質はフォールディングして成熟体となる。この過程において、SecDF は SecYEG と相互作用することではじめてモータータンパク質として機能するとされているが、その詳細は SecDF と SecYEG の複合体の構造報告がないため不明である。本研究では SecDF と SecYEG の構造決定により相互作用の詳細を明らかにする。さらに、未だ不明の SecDF の基質認識機構も構造生物学的に明らかとし、タンパク質分泌過程を理解することを目指した。

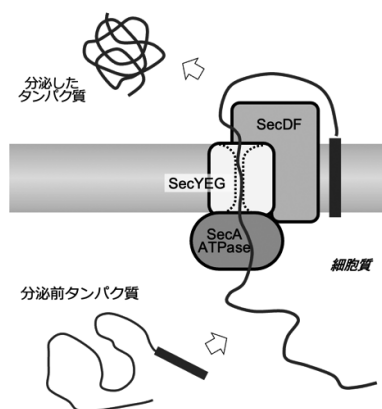


図1 タンパク質の分泌
SecYEG 複合体を通るタンパク質の膜透過を SecA, SecDF が駆動する。

【方法】 *Thermus thermophilus* (高度好熱菌) または *Deinococcus radiodurans* (放射線抵抗性細菌) 由来の Sec タンパク質を大腸菌に発現させて、その膜画分からタンパク質の抽出・精製を行なった。SecDF と SecYEG の結晶化では、SecDF と SecYEG を 1:1 で混合し、脂

質との共結晶化法である LCP 法を用いて結晶を得た。SecDF と基質との相互作用を検出するために、基質断片を用いて、バイオレイヤー干渉法で相互作用を測定した。SecDF をナノディスクに再構成し、電子顕微鏡による単粒子解析の準備を進めた。

【結果・考察】 SecDF と SecYEG の結晶を用いた SPring-8 BL32XU での X 線回折実験の結果、約 6 Å 分解能のデータセットを得た。空間群は $P4_12_12$ であり、分子置換法により、位相が決定できた (図2)。詳細構造を決定するには分解能が低かったため、さらなる高分解能構造の決定を目指す。Sec 複合体は、分泌するタンパク質のほとんどが基質となるため、SecDF と基質との複合体を解析するには、その中でも親和性の高い基質が必要であると考えた。そこで、マニュアルで 10 アミノ酸からなる基質ペプチドを 5 つ選別し、合成により準備した。SecDF とこれらのペプチドとの相互作用をバイオレイヤー干渉法で確認した結果、1 つのペプチドが強く相互作用を示した。次に SecDF とペプチドとの共結晶化を進める。また、複合体の構造解析はクライオ電子顕微鏡による単粒子解析も並行して進めるため、予備的に SecDF 含有ナノディスクを用いて、測定を行ったところ SecDF の構造解析が可能となる像を得た。今後、基質との複合体の解析を進めていく。

どの複合体についても、今後更なる条件検討が必要であるが、SecDF の構造を報告した我々が、Sec システムの詳細を明らかとすべく、SecDF を含む複合体の解析を進めることが、当該分野に大きく貢献すると考えている。次の段階として SecDF が基質タンパク質を輸送中に、どのように分子内構造変化を起こすのかについて、さまざまな方法を用いて明らかとしていきたい。

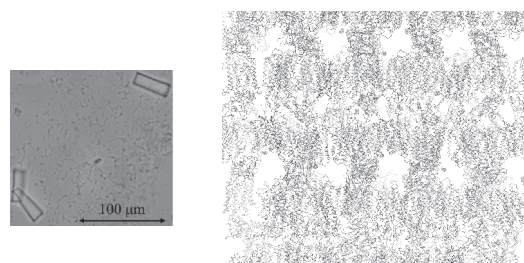


図2 SecDF-SecYEG 複合体の構造解析
(左) SecDF-SecYEG 複合体の結晶
(右) SecDF-SecYEG 複合体の結晶のパッキング

出芽酵母におけるリボソーム品質管理の分子機構

北 島 真

【目的】 真核生物のリボソームは4本のRNAと約80個のたんぱく質から形成される、高度に保存された巨大複合体である。主な活性はRNA成分に担われており、重要塩基に一塩基置換が導入されるだけでリボソームの機能は失われてしまう。われわれは、このような異常リボソームを検出して分解する「品質管理機構」が出芽酵母に存在することを発見し、研究を続けてきた。これまでに、機能不全となったリボソームを選択的にユビキチン化するE3リガーゼを見出すなど、その概要を明らかにしつつある。しかし細胞がどのようにして分解すべき異常リボソームを見出しているか、もっとも重要な「識別」の原理についてはいまだ分かっていない。最近になって、われわれはE3リガーゼとリボソームを物理的に結びつける因子Xを同定することに成功した(図1)。この因子Xと相互作用する因子を網羅的に探索し、分解に導かれるリボソームの上でのそれぞれの結合位置を明らかにすることで、「細胞がどのようにしてリボソームの機能を検査しているのか」を解明するのが本研究の目的である。

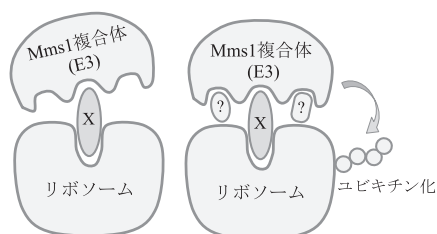


図1 ユビキチン化に必要な因子
XはリボソームとE3の両方に結合するが(左)、
ユビキチン化にはそれ以外の因子も必要である(右)。

【方法】 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741株を用いてXにより免疫沈降したリボソームの生化学的分析を行い、Xと直接・間接的に結合する因子の網羅的解明を目指した。得られた因子の遺伝子破壊を行い、機能不全rRNAの分解への影響を確認することを予定していた。この目的でXにタグ標識を行い、そのタグを認識する抗体を用いて目的のリボソームを精製する手法を開発した。Xを含め関連因子のリボソーム上での位置が、メカニズムの解明に重要である。これらを解明する目的で、CLIP法(紫外線照射することでタンパク質とRNAを共有結合で架橋した後、RNAを部分分解してから目的産物を精製し

て結合したRNA断片の配列を解析することで、RNA結合タンパク質が結合するRNA領域を特定する手法)を導入した。

【結果・考察】 Xにタグ配列を融合させて発現させ、タグを標的にした抗体を用いて、Xが結合したリボソームの精製に成功した。しかし予想外の結果として、天然のXの場合と比較してタグの融合により機能不全リボソームの分解効率が大幅に低下することが明らかになった。沈降したリボソーム複合体にも、品質管理機構の補助となるような分子は存在しておらず(ほとんどが大量のリボソームタンパク質であった)Xと共に働く因子の結合をタグが阻害している可能性が考えられた。この問題を解決するためにXを認識する抗体を受託で作成したが、得られたポリクローナル抗体は結合力が非常に低く、免疫沈降に使用できないものであった。

他の因子の同定が行き詰まった一方で、CLIP法を用いてXのリボソーム上での結合部位の解明は明快な結果が得られた。具体的にはユビキチン化されるリボソームタンパク質の近傍の、リボソーム表面のRPL22に隣接した25S rRNA配列が多数読み出されてきた。結果をリボソームRNAの二次構造にマッピングしたのが図2である。

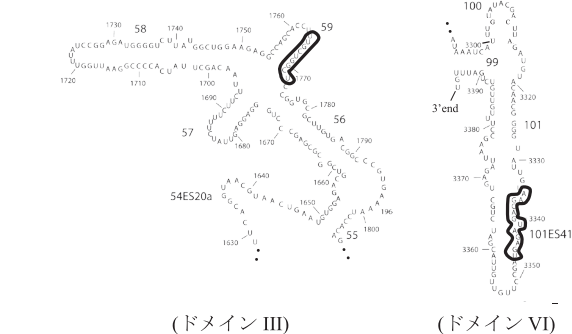


図2 因子Xのリボソーム結合部位(黒い太線部分)
60Sの表面の隣接した2つのドメインに集中している。
Xは40Sとの接触面の近傍に結合するようだ

この結果から品質管理において60Sと40Sの接触の重要性が示唆されている。今後立体構造の解析をすすめ、全容の解明に迫りたいと考えている。そのためE3複合体を大量培養する系の構築や、Xが結合したリボソームを大量調製する系の構築を行い、それぞれ効率のよいものが得られている。

植物病原細菌が感染植物組織中に形成する バイオフィーム高次構造と植物病原性との相関解析

別 役 重 之

【目的】 植物病害防除は食糧生産における古くからの重要課題である。そのうち、細菌性病害に関しては有効な薬剤も少ないが、その大きな原因としては感染過程の生態学的理解が遅れていることが挙げられる。そこで我々は、蛍光タンパク質を用いた植物病原細菌感染過程のイメージング解析系を立ち上げたところ、細菌が植物細胞間隙においてバイオフィーム (BF) 様構造体を形成することを見出した。一般に BF 形成した細菌は BF 内部での機能分化を介して環境耐性を獲得することなどが知られており、植物病原細菌においてもその病原性に大きく寄与している可能性が高い。そこで本研究では、植物病原細菌の毒素合成遺伝子活性に着目し、このバイオフィーム様構造と病原力の相関を解析することで植物病原細菌防除法開発につながる新規知見を得ることを目的とした。

【方法】 本研究においては、シロイヌナズナ野生型 (Col-0) 植物と *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 株 (*Pst*) を用いた。*Pst* 株は *psbA* プロモーター (*psbApro*) 制御下で構成的に *tdTomato* を発現するプラスミドを持たせた株を用いた。また、本菌が生産する植物毒素コロナチンの合成経路遺伝子 *cmaD* 遺伝子のプロモーター (*cmaDpro*) 制御下で *GFPuv* を発現するプラスミドも保有する株を用いた (両株は筑波大学・石賀康博博士との共同研究)。*Pst* 接種実験においてはポット栽培した植物の葉に接種を行い、接種葉は非切断状態で共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8x を用いて定点経時観察を行った。

【結果・考察】 各種条件検討を行い、植物葉組織内における *Pst* (*tdTomato* 発現株) の増殖を経時的に定点観察できる系を構築した。一般に、*Pst* の病原性解析等のための感染実験はより安定な結果が得やすい注入接種法が用いられるが、*Pst* を含む細菌病原体の主要な感染経路としては気孔を介した侵入が知られている。そこで、まずこの観察系を用いて両接種法での増殖様式に違いがあるのかを検討した。その結果、注入接種では球状のコロニーがそのまま拡大していく一方、スプレー接種では植物細胞間隙を抜けて非感染部へとより早く広がるように増殖し、接種方法によって異なる増殖様式をとり、最終的にコロニー形態も異なることが見出された (図 1)。

この形態の違いが植物に対する *Pst* の病原性においてどのような意義があるのかを調べるために、*Pst* の重要な病原因子として知られている毒素コロナチンの生合

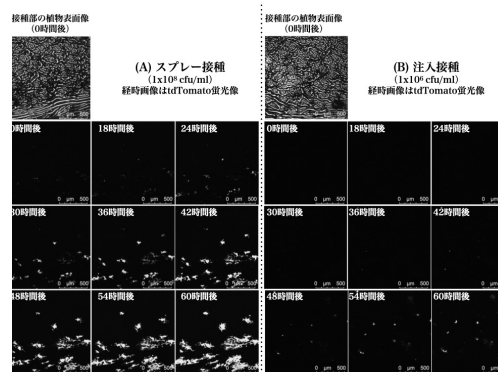


図 1 接種法で異なる宿主植物葉内での *Pst* 増殖

成に関係する遺伝子 *cmaD* のプロモーターレポーター株を構築し、植物細胞間隙での *Pst* コロニー内での活性を調査した。その結果、注入接種ではまず、コロニーごとに活性の強弱や有無に違いがあり、コロニー内でも活性細胞が偏在していることが明らかとなった。一方、スプレー接種では全体として強い *cmaDpro* 活性は見られず、孔辺細胞に囲まれた一群の菌体でのみ活性が見られた (図 2)。

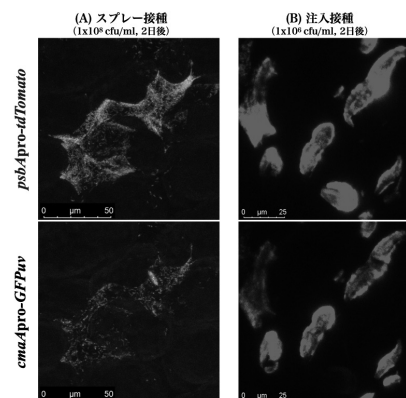


図 2 BF 内部での毒素合成遺伝子活性化細胞局在

以上のことは、これら *Pst* コロニーがその内部で機能分化した BF であること、そしてその形態や形成・発達過程、そして病原因子の活性化状況が接種法によって大きく異なることを示唆しており、植物病原細菌の病原力発揮機構と BF 形成に関する興味深い関連を見出すモデルとなる可能性がある。今後、更なる詳細な研究を進めていきたい。

氷河微生物の地球規模での地域比較と寒冷適応戦略の解明

瀬川 高弘

【目的】 極地や高山に分布する氷河には、寒冷環境に適応したシアノバクテリアや藻類などの光合成微生物、従属栄養細菌、無脊椎動物などが生息している。中でも「クリオコナイト」と呼ばれる雪氷微生物と鉱物が凝集した粒状の集合体は、氷河上の生化学反応が集中するホットスポットであり、氷河生態系の物質循環を駆動する中心的存在である。クリオコナイトの微生物の活動は、氷河のみならず周囲の土壌・海洋を含めた物質循環に影響を与えている。さらに近年の気候変動と連動した微生物繁殖域の拡大は氷河縮小の大きな要因となっている。しかし、こうした氷河微生物の生理機能や地域多様性、さらに進化過程に関する知見はほとんど知られていないのが現状である。そこで本研究では、氷河微生物のメタゲノム情報を元に、クリオコナイト細菌の代謝能や雪氷微生物種の進化過程を解析した。

【方法】 グリーンランド北西部やスバルバル諸島、南極半島のキングジョージ島などの極地氷河に加え、ネパール・ヒマラヤ山脈や中国・天山山脈、キルギス共和国・天山山脈などのアジア山岳域の氷河表面から広くクリオコナイト試料を収集し、DNA抽出をおこない、ショットガンメタゲノムシーケンシングをおこなった。また微生物種の分子進化解析では、上記試料に加えてキルギス共和国のグレゴリア氷河の山頂から掘削された8000年前のアイスコア試料からもDNAを抽出し、ITS2領域のアンプリコンシーケンシングを行った。

【結果・考察】 メタゲノム解析の結果、クリオコナイトに含まれる細菌の種類とそれらが保有する様々な遺伝子を群集総体レベルで把握することに成功し、各々の細菌がどのようにして栄養やエネルギーを獲得しているのかを解析した。さらに、極域とアジア山岳域の間でクリオコナイトを構成する細菌の種類や有する代謝能が大きく異なることを初めて明らかにした(図1)。顕著な例として、脱窒遺伝子はアジアのクリオコナイトから豊富に検出されたが、極域からはほとんど検出されなかった。また、シアノバクテリアにも大きな地域差が認められた。極域では単一のシアノバクテリア種(*Phormidesmis priestleyi*)がクリオコナイトの形成に関与しているのに対し、アジアではそれとは全く別の複数のシアノバクテリア種が生息していることが判明した。さらに、シアノバクテリアの光エネルギーの捕集に関する地域差が遺伝子情報から明らかとなった。極域のシアノバクテリア

P. priestleyi は、光合成に主に赤色光を利用していたが、アジアのクリオコナイトには赤色光に加えて緑色光も利用するシアノバクテリアや、赤色光と緑色光を光環境変化に応じて使い分ける能力を有するシアノバクテリアが多く存在していた(図1)。アジアのクリオコナイトで脱窒遺伝子が豊富に検出され、また複数のシアノバクテリア種が共存していた背景として、降着物による比較的豊富な栄養供給があると推察された。加えて、利用する光波長の選択枝を種間で広げることも、複数シアノバクテリア種の共存につながっているものと考えられる。

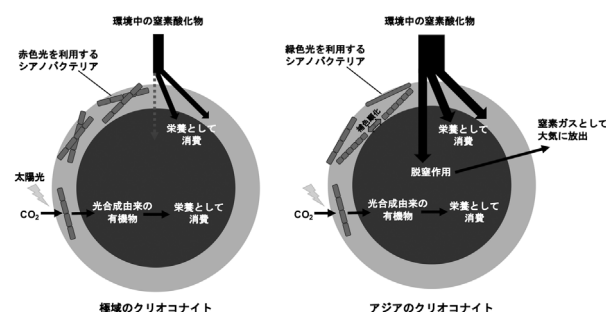


図1 メタゲノム解析から推測された極域とアジアのクリオコナイトの違い

雪氷微生物種の分子進化解析では、極地と中緯度の両方に分布し、幅広い年代のアイスコア層からも検出される *Raphidonema* 属 (*Trebouxioephyceae*) の雪氷藻類に着目した。これまでの研究で、雪氷藻類は、特定の地域にのみ分布する固有種と全球的に分布する汎存種が存在し、両者が同所的に混在して生息していることが明らかとなっている。アイスコアの試料年代と絡めた *Raphidonema* 属の分子進化解析の結果、汎存種の系統は最終氷期以前から存在していること、さらに各地域固有の系統は、汎存種の系統から派生したものであることが判明した。この結果から、汎存種が世界中に分散した後、各地域で独立した微小進化が進行して特定の地域にのみ分布する固有種が生じ、現在の雪氷藻類の地域多様性が創出されたことが示唆された。本研究により、自然環境下における微小進化による微生物群集形成の理解や、氷河生態系構造の実態解明を進める上での重要な知見が得られた。

適応育種的変異を利用した酢酸菌セルロース合成酵素変異体の 作成とそのセルロース合成能の解析

松谷 峰之介

【目的】 酢酸菌が生成するバクテリアセルロース (BC) は微細なナノファイバーであり、ナノセルロース素材として化粧品などに利用されている。酢酸菌のBC生成能は、ゲノム不安定性に起因するセルロース生合成 (*bcs*) オペロンへの変異により消失し、アミノ酸置換を伴い復帰することを見出している (図1)。酢酸菌においては菌膜生成能を有するR (Rough) 株と生成能を失ったS (Smooth) 株が見いだされている。R株で振盪培養を繰り返すと、菌膜形成能を失ったS株が出現し、S株で静置培養を繰り返すと、再び菌膜形成能を有する復帰変異株 (R'株) が現れる。この性質を利用し、*Komagataeibacter oboediens* MSKU3株 (R株) からS株E3を取得したが、この株から静置培養によって、4種のアミノ酸置換を伴うR'株が得られ、親株の数倍のBC生産能や微細繊維のBCを有する株を獲得して報告した (Taweecheep *et al.*, 2019)。しかしながら、これらの復帰変異は単一の破壊変異からの復帰であるため、今回この手法を拡張して、様々な変異パターンを有する多数のS株を取得することでBCの増産や物性改変を可能にする多数のBC生産変異株を育種し、その原因について明らかにすることを目的とした。

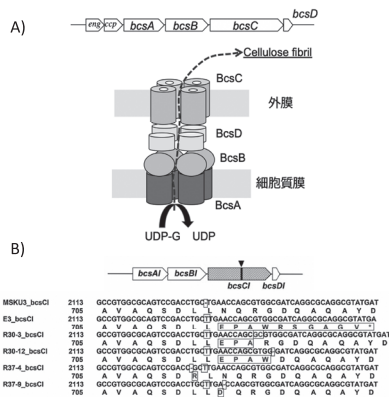


図1 セルロースオペロンの3次構造モデル (A) と1塩基挿入変異株から得られた4種の復帰変異パターン (B)

【方法】 MSKU3R株はYPD培地 (Yeast extract : Hipolypeptone : D-glucose = 1% : 1% : 3%) を用いて培養した。また、YPD培地は5mlをL字試験管に調製し、30℃、121rpmで2日間振とう培養を行い、培養2日目に別に調製したYPD培地に植継ぐことで複数系統での継代培養を行った。通気条件を変えるために、バッフル

付き三角フラスコを用いた継代培養も実施した。200ml バッフル付き三角フラスコに調製したYPD培地100mlに白金耳接種し、28℃、121rpmの円形回転の振とうにより2日間培養した。培養2日目に別に調製したYPD培地に植継ぐことで同様に複数系統からなる連続継代培養を行った。BC生産が見られなくなった株について、コロニーを単離し、Illumina シークエンサを用いたゲノムリシーケンスを実施した。公開済みのMSKU3R株のゲノム配列 (RefSeq assembly acc. no. : GCA_014905215.1) をリファレンスとしてゲノムマッピング解析をすることで変異箇所を同定した。得られたBC非生産株を用いて三角フラスコで静置培養することで復帰変異株の取得についても検討した。

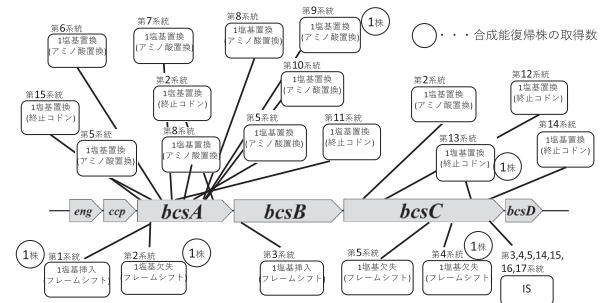


図2 非生産株に生じたセルロース生合成オペロンへの変異 (一部抜粋)

【結果・考察】 L字試験管またはバッフル付き三角フラスコを用いた連続振盪培養により、それぞれ9系統28株および8系統12株からなる計40株のBC非生産株を取得した。ゲノムリシーケンスにより *bcs* オペロンに対する変異を調べて同一系統の重複変異を除いた結果、12系統から15種のアミノ酸置換またはストップコドン挿入を伴う塩基置換、6系統から7種の1塩基挿入・欠失および8系統から8種のIS挿入変異が見られた (図2)。このうち、8系統から検出されたISは全て *bcsC* 遺伝子の同一箇所 (Leu1261Tn) に挿入されている。塩基置換や1塩基挿入・欠失についても別系統で同一変異がいくつか得られており、これらは変異が集中するホットスポットであることが示唆された。40株の非生産変異株から三角フラスコを用いた連続静置培養を実施した結果、それぞれ1アミノ酸置換体から1株、ストップコドン変異株から1株、フレームシフト変異株から3株のR'株が得られており、現在解析を進めている (図2)。

2021年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：2021年4月～2023年3月

医療施設で分離される *P. putida* グループ新菌種の 分類とサブグループ形成関連因子の検索

遠矢 真理

【目的】近年の遺伝子解析技術の発展と細菌学への導入は、細菌の分類学を大きく変えており、菌株の全ゲノム情報を基にした average nucleotide identity (ANI) や digital DNA-DNA hybridization (dDDH) などの *in silico* 解析ツールを用いることで精確に菌種判定ができるようになった。*Pseudomonas* 属菌は、系統分類学的に13のグループに分類される。これらのグループには *P. aeruginosa* グループや *P. putida* グループ等がある。*P. putida* グループは、ヒトを含む動物から分離される菌種と主に植物や環境から分離される菌種が含まれている。

Pseudomonas 属菌は近縁な菌種の場合、菌種間の16S rRNA 遺伝子配列の相同性が99%を超える場合があり、正確な菌種同定が難しい属であるため、誤同定が起りやすい。当研究室で保存され、過去に全ゲノム情報を取得していた *P. putida* 臨床分離菌株を調査したところ、細菌同定機器で *P. putida* として同定された菌株の半数以上は全ゲノム情報を基にした解析では異なる菌種であった。そこで本研究では、緑膿菌以外の *Pseudomonas* 属菌の菌種の再同定を行い、どのような菌種が医療施設で伝播拡大しているのか、さらに新菌種が含まれているのかも明らかにする。

【方法】日本の医療施設で分離され、*P. putida* もしくは *P. fluorescens* として同定された42菌株を用いた。これらの菌株の全ゲノム情報はMiSeqを用いて決定し、ANI及びdDDH解析を実施した。臨床分離株とtype strain(基準株)の全ゲノム情報を比較し、ANI値:>95%またはdDDH値:>70%を示すtype strainの菌種をその臨床分離株の菌種とした。また各菌株の薬剤感受性(最小発育阻止濃度:MIC)を2倍段階希釈法によって決定した。薬剤はamikacin, aztreonam, ceftazidime, colistin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem及びtobramycinを使用した。全ゲノム情報を基に再同定された菌株を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-TOFMS)方法で解析し、菌種特異的タンパク質の発現パターンを決定した。

【結果・考察】全ゲノム情報を用いた *in silico* 解析によって、42菌株のうち30菌株(71.4%)は既存菌種であったが、残りの12菌株(18.6%)は既存菌種には同定されなかった。既存菌種に分類された30株は、14菌種に再同定され、更に *P. putida* と再同定された株は1株のみであった。既存菌種に分類できなかった12菌株同士をANI及びdDDH解析を行ったところ、9つの菌種に分か

れていることが明らかとなり、これら9菌種を新菌種として提唱を行った。全ゲノム情報を基にした菌種再同定の結果は、*P. putida* 臨床分離株には未分類の菌種やその他の菌種が多く含まれていること、*Pseudomonas* 属菌株の菌種同定は、ANIやdDDHが望ましいことが示唆された。

薬剤感受性試験では、aztreonam 以外には今回供試した42株は感受性を示した。一方で既存菌種である *P. protegens*, *P. carnis* 及び *P. lactis* と同定された菌種は colistin に耐性を示した(表1)。さらにtype strainについても colistin のMICを測定したところ、臨床分離株と同様に耐性が認められた(表1)。この成績は、*Pseudomonas* 属の中には colistin に対して生来耐性である菌種が存在していることを示唆している。

表1 colistin に対する薬剤感受性

菌株	菌種	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Colistin highly resistant isolates		
BML-PP019	<i>P. protegens</i>	4096
BML-PP025	<i>P. protegens</i>	1024
<i>P. protegens</i> type strain	<i>P. protegens</i>	512
Colistin resistant isolates		
BML-PP010	<i>P. carnis</i>	64
BML-PP012	<i>P. carnis</i>	32
BML-PP016	<i>P. carnis</i>	32
BML-PP035	<i>P. carnis</i>	32
BML-PP038	<i>P. carnis</i>	32
<i>P. carnis</i> type strain	<i>P. carnis</i>	64
BML-PP040	<i>P. lactis</i>	8

分離菌株の質量分析を近縁な菌種ごと(サブグループ)と比較したところ、それぞれのサブグループの中において菌種間で共通性の高いまたは低いリボソームタンパク質がそれぞれ存在することが明らかになった。つまり、医療施設で行われている菌種同定装置は質量分析を基にしているので、質量分析のデータベースに全ゲノム情報を基にした菌種同定結果を加えることで正確な同定結果が得られるようになることを示唆している。

本研究から、緑膿菌以外の *Pseudomonas* 属の菌種分類は不完全であり、これまで *P. putida* や *P. fluorescens* と同定されていた菌株の疫学を見直す必要があること、更に菌種特異的に薬剤耐性を示す菌種が存在することが明らかとなった。以上から *Pseudomonas* 属菌株の全ゲノム情報を基にした更なる疫学調査が必要であることが示唆された。

同型配偶子生殖を行う単細胞性緑藻クラミドモナスを用いた葉緑体母性遺伝の分子機構の解析

小林 優 介

【目的】 地球上の多くの生命を光合成で支える葉緑体は、細胞内共生によって誕生した。その名残として、葉緑体には独自のゲノム DNA が存在する。興味深いことに、葉緑体はメンデルの遺伝の法則から逸脱し、多くの生物で片親からのみ子孫に伝わる（母性遺伝）。母性遺伝は、雌雄で配偶子のサイズが同じである同型配偶子による生殖においても観察されることから、父性オルガネラゲノムを受精卵から排除し、母性オルガネラゲノムを選択的に複製する分子機構が存在すると考えられている。本研究は、同型配偶子で生殖を行う単細胞性緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を材料に、母性遺伝の分子機構に迫ることとした (図 1)。

一般的に、一つの葉緑体には約 80 コピーの相同な葉緑体 DNA が存在する。葉緑体 DNA は裸で存在するのではなく、様々なタンパク質が葉緑体 DNA に相互作用することで核様体という葉緑体 DNA-タンパク質複合体として存在する。クラミドモナスでは、接合後約 60 分で雄由来の葉緑体 DNA が選択的に分解されることが報告されていた。本研究の目的は、雄の葉緑体 DNA の分解を担うヌクレアーゼや雌の葉緑体 DNA をヌクレアーゼから保護する因子を同定することである。

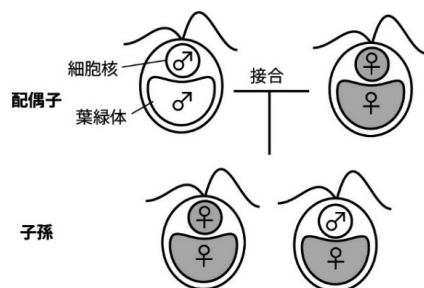


図 1 クラミドモナスの有性生殖過程の概要。雌雄で等量の葉緑体 DNA が接合子に持ち込まれるが、母系の葉緑体 DNA のみが次世代に遺伝する。

【方法】 本研究では、接合子特異的に葉緑体核様体に局在する RECA, Whirly, EZY1 タンパク質の逆遺伝学的解析を行うことにした。各遺伝子の破壊株はクラミドモナスリソースセンターから取り寄せたり、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術によって作成した。変異体で父性遺伝が起きるかどうかは、雄の葉緑体 DNA に *aadA* (スペクチノマイシン耐性) 遺伝子を導入し、交配を行い、

aadA が次世代に遺伝するかどうかで調べた。

【結果・考察】 栄養細胞においてリコンビナーゼ RECA は葉緑体 DNA の相同組換え・ゲノムの安定性に関わる。接合子において RECA の発現は亢進するが、その意義は不明であった。そこで RECA と、葉緑体ゲノムの維持に関わるものが考えられる MOC1, Whirly, MutS2 との多重変異体において母性遺伝が攪乱されるか調べた。変異体同士で交配をすると、スペクチノマイシンに耐性を持つ子孫が高頻度で現れた。しかし、PCR 解析の結果、薬剤耐性をもつ株からは *aadA* 遺伝子は検出されなかった。バクテリアでは、リボソーム遺伝子に変異が蓄積すると、翻訳を阻害するスペクチノマイシンに耐性を獲得することが知られている。つまり、スペクチノマイシンに耐性を示すクラミドモナスの子孫株は、*aadA* を父性遺伝で獲得したのではなく、葉緑体 DNA のリボソーム遺伝子に変異が蓄積することで誕生したと考えられる。この結果は、有性生殖過程では、栄養細胞に比べて葉緑体ゲノムが変異を蓄積させやすいことを示している。

次に、既知のドメインを持たない EZY1 の解析を行った。EZY1 には 3 つのパラログが存在し、雌雄それぞれにコードされている。また、それらは、mating locus と呼ばれる雌雄間で組換えが起きない領域にコードされていることから、交雑で多重変異体を作成することは不可能である。そこで、ゲノム編集を行うことで多重変異体の作成を試みた。Cas9 タンパク質と gRNA をエレクトロポレーションによって細胞に導入し、PCR によって当該遺伝子がすべて破壊された株を探索した。雌雄それぞれ 500 株以上をスクリーニングした結果、複数の多重変異体を作成することができた。そのうち、接合効率がよい雌雄 1 株を単離することに成功した。これらの株を交雑すると、雄の葉緑体 DNA に導入した *aadA* が次世代に高頻度で父性遺伝することがわかった。大腸菌を用いて EZY1 タンパク質を作成し、生化学解析を行ったところ、このタンパク質は DNA に強い結合性を示したが、様々な 2 価の金属イオンを添加してもヌクレアーゼ活性は示さなかった。そこで我々は、このタンパク質が葉緑体 DNA に結合し、母性遺伝の鍵因子をリクルートする足場として機能するのではないかという新たな作業仮説を立てるに至った。当該タンパク質に対する特異性の高い抗体を作成することに成功しており、共免疫沈降実験によって母性遺伝に関与する因子を探索する予定である。

遊離脂肪酸を介した細菌間コミュニケーションによる環境応答機構の解明

神保 晴彦

【目的】 生体膜は、すべての細胞の基本原理の一つであり、リンや糖を極性基としたグリセロ脂質で主に構成されている。膜脂質は、膜の構造的な役割だけでなく、代謝回転によって組成を動的に変化させ、細胞の生理活性を制御している。膜脂質の代謝回転においては、脂質分解酵素であるリパーゼが、グリセロ脂質から脂肪酸を切り出し、リゾ脂質と遊離脂肪酸 (FFA) を生成する。光合成生物であるシアノバクテリアや、大腸菌、黄色ブドウ球菌など多くのバクテリアは、FFAを細胞外に放出したり、細胞外のFFAを膜脂質に取り込むことがわかっている。シアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 (6803株) は、特に強光ストレス下でFFAを細胞外に放出する。オレイン酸 (18:1) などの不飽和脂肪酸は、グラム陽性菌に対して抗菌作用を示すことがわかっており、細胞外FFAが異種細菌との競争に働く可能性もある。本研究では、6803株を用いて、細胞内外のFFAにおける生理学的な意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 本研究では、まずFFAの生成機序を明らかにするため、6803株ゲノムにコードされたリパーゼ様遺伝子の同定を行った。6803株のゲノムにおいてリパーゼドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子は3つ存在する。それぞれのリコンビナントタンパク質を無細胞翻訳系や大腸菌の誘導発現系によって合成・タグ精製し、基質特異性を解析した。また、強光下におけるリパーゼの活性化について、光合成活性との関連を解析した。さらに、強光下における細胞外FFA量をGC-MSで定量した。また、FFAによる細胞への影響を明らかにするために、異なる分子種の脂肪酸をシアノバクテリア培地に添加した時の光合成活性を測定した。

【結果・考察】 6803株における3つのリパーゼ遺伝子のうち、リン脂質の *sn*-2位に結合した脂肪酸を遊離するホスホリパーゼA2 (PlpA2)、及びガラクト糖脂質の *sn*-1位に結合した脂肪酸やトリアシルグリセロール (TAG) に結合した脂肪酸を遊離するTAG/ガラクトリパーゼA1 (LipA) を同定した (図1)。6803株の膜脂質には、*sn*-2にC16脂肪酸、*sn*-1にC18不飽和脂肪酸がそれぞれ結合している (図1)。不飽和脂肪酸は抗菌作用を持つことから、不飽和脂肪酸を生成する *lipA* の遺伝子欠損変異株を作製した。強光下において *lipA* 株では、不活性化した光合成複合体の分解が遅延し、光合成活性が低下した。これらの結果から、LipAが強光ストレスによって活性化することが示唆された。野生株および *lipA* 株

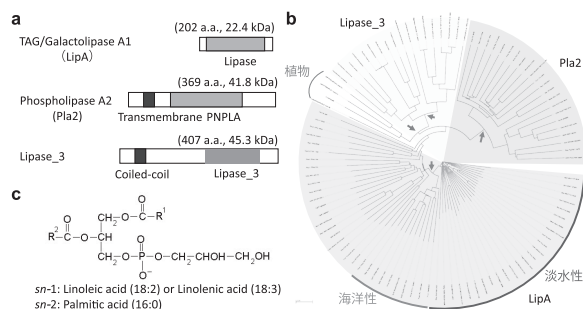


図1 (a) リパーゼのドメイン構造 (b) 遺伝子の保存性を Gclust (<http://gclust.c.u-tokyo.ac.jp/>) を用いて解析した (c) S6803株のホスファチジルグリセロールの分子構造

において、細胞外FFAは、パルミチン酸 (16:0) が主要な遊離脂肪酸であったが、野生株では強光照射後にパルミトレイン酸 (16:1) やリノール酸 (18:2)、リノレン酸 (18:3) の量が増加していた。この増加は *lipA* 株において見られなくなったことから、強光下でのLipAの活性化が、細胞外への不飽和脂肪酸の放出に必要であることが明らかとなった。次に、FFA分子種による光合成への影響を解析したところ、18:2や18:3は、光合成複合体を不安定化させ、光合成を不活性化させた。したがって、細胞外FFAの分子種による、細胞の生育制御が示唆された。

強光は、細胞集団にほぼ一様に照射されるが、ストレスに応答するまでの時間は、細胞毎に異なる。環境変化に素早く応答してリパーゼを活性化し、光合成の代謝回転を促進できた細胞は、不飽和脂肪酸を細胞外に放出し、集団内のまだストレスに応答できていない細胞に対して、生育を抑制することで、集団としての環境応答を促進すると考えられる (図2)。今後は、1細胞解析などにより強光下での光合成活性の変化とリパーゼ遺伝子の活性化、細胞の生育について明らかにする必要がある。

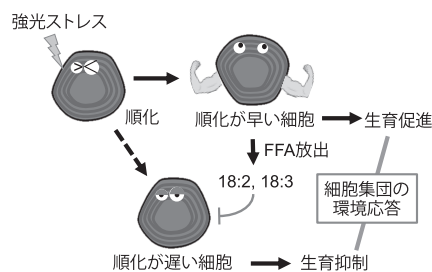


図2 FFAを介した細胞集団の環境応答

地衣化菌が共生藻を認識する仕組みに関する研究

升本 宙

【目的】 約2万種の菌類は緑藻やシアノバクテリアを主とした“共生藻”と地衣共生を営んでおり、これらは“地衣化菌”と呼ばれている。地衣共生は一般に「財の提供」と「サービスの提供」からなる相利共生の関係にあるとされている。すなわち、共生藻は地衣化菌に光合成産物を提供し（財の提供）、地衣化菌は地衣体という特殊な構造体を形成して内部に共生藻を住まわせることで乾燥や紫外線等の環境ストレスから保護する（サービスの提供）、という関係性である。しかし、地衣化菌と共生藻が互いをどのように認識しているのか、また、地衣共生時に物質やシグナル等の相互のやり取りが存在するのかどうかについては未だ解明が進んでいない。本研究では地衣化菌と共生藻の相互認識の機構を解明するためのアプローチの一つとして、地衣化菌 *Multiclavula mucida* (担子菌門アンズタケ目カノシタ科) と共生藻 *Elliptochloris subsphaerica* (緑藻植物門トレボウクシア藻綱) の地衣共生系を材料とした地衣共生の誘導実験を行った。そして、*M. mucida* の遺伝子発現を地衣共生成立時と単独培養時で比較することにより、地衣共生の成立や共生藻の認識に関わる可能性が高い遺伝子の抽出を試みた。

【方法】 地衣化菌 *M. mucida* NBRC 114396 株を用いて、実験1) 本来の共生藻である *E. subsphaerica* NIES-4525 株との共培養 (Mm+Esub)、実験2) 本来の共生藻と同属別種の *Elliptochloris* sp. NIES-4523 株との共培養 (Mm+Esp1)、実験3) 本来の共生藻の姉妹属の *Coccomyxa* sp. S-203-PL-004 株との共培養 (Mm+Cocc)、実験4) *M. mucida* のみの単独培養 (Mm)、以上の4つの培養実験を行った。各培養実験はコーンミール寒天平板培地上に設置した滅菌済みのバルサ材 (3cm 角、厚さ2mm) 上で行い、20℃の培養器内で16h/8hの明暗周期を実施した。そして、培養100日後に各培養系での地衣共生の有無を光学顕微鏡により観察するとともに、菌体を回収してRNA-seqで遺伝子発現を解析した。転写産物の発現の定量においては、HISAT2を用いて *M. mucida* NBRC 114396 株のゲノムへのマッピングを行い、StringTieを用いて遺伝子ごとの発現量 (TPM) を算出し、「*E. subsphaerica* との共培養時/*M. mucida* の単独培養時」の発現量の比が5倍以上となった場合において、共生時特異的に高発現した遺伝子として抽出した。

【結果・考察】 培養100日後の観察において、実験1) では菌糸が藻類細胞に絡みついて粒状の構造体(地衣体)

を形成し、正常な地衣共生の誘導が確認された (図1)。実験2) では地衣体形成が部分的に観察されたものの、菌糸が絡みついていない藻類細胞も多数見られ、地衣共生の誘導は不完全であった。実験3) では菌糸が藻類に絡む様子は観察されず、地衣共生の誘導は確認されなかった。

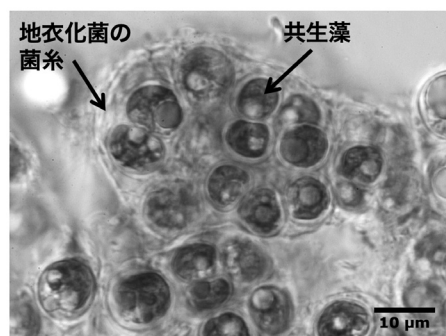


図1 実験1)の共培養で形成された粒状の地衣体

実験1)の場合に単独培養比で高発現した遺伝子として、GPR1/FUN34/YaaH や MFS general substrate transporter, ABC transporterなどの(推定)輸送体タンパク質、C₂H₂型やZn(2)-Cys(6)型の転写因子、炭素代謝に関わる炭酸脱水酵素やリパーゼ、推定分泌型低分子量タンパク質をコードする遺伝子などが見出され(表1)、これらは地衣共生の成立と維持に関わっている可能性が高いと考えられる。特に、実験1)の場合でのみ高発現した遺伝子に関しては、本来の共生藻を認識する過程において関与している可能性が考えられ、その機能について今後詳細に解析すべき対象であるといえる。

表1 地衣共生成立時に高発現した遺伝子

Gene ID	TPM (Transcripts Per Million)				(Mm+Esub)/Mm ratio	Predicted protein	Category
	Mm	Mm+Esub	Mm+Esp1	Mm+Cocc			
MULMUC_008965	8.1	4288.1	2045.9	9.0	524.2	GPR1/FUN34/YaaH transporter	transport
MULMUC_003400	7.1	57.6	9.8	10.6	8.1	MFS general substrate transporter	transport
MULMUC_008788	1.8	14.0	1.1	1.2	7.9	ABC transporter	transport
MULMUC_008615	2.3	27.7	12.3	2.5	12.0	Cys2-His2 (C2H2)-type zinc finger	transcription factor
MULMUC_005079	51.4	421.6	26.6	47.1	8.2	Zn(II)2Cys6-type transcription factor	transcription factor
MULMUC_007233	87.1	1382.2	804.0	191.1	15.6	carbonic anhydrase	carbon metabolism
MULMUC_001280	57.9	1401.6	367.4	207.3	24.2	Lipase (class 3)	carbon metabolism
MULMUC_000894	12.5	79.8	79.8	17.2	6.4	ricin B-like lectin	lectin
MULMUC_007626	5.0	179.7	36.2	9.9	35.7	small secreted protein (SSP)	unknown
MULMUC_006820	18.7	485.9	427.4	19.5	26.0	small secreted protein (SSP)	unknown
MULMUC_001001	8.8	149.8	11.4	9.7	17.0	small secreted protein (SSP)	unknown
MULMUC_008782	3.6	165.4	129.5	2.1	45.9	transmembrane protein	unknown
MULMUC_001293	79.6	1279.9	41.9	13.4	16.1	transmembrane protein	unknown
MULMUC_003217	10.9	140.4	99.2	15.2	12.9	transmembrane protein	unknown

盗葉緑体生物群から探る葉緑体獲得進化の共通原理の解明

大 沼 亮

【目的】藻類は捕食栄養性だった祖先種と取り込んだ光合成性生物との細胞内共生によって誕生したとされる。しかし、捕食栄養性から細胞内共生を経て藻類化する進化過程には不明な点が多い。盗葉緑体現象は、もともと葉緑体を持っていない生物が光合成性生物を捕食し、その葉緑体を一時的に維持して光合成に用いる現象で、葉緑体獲得への進化の中間的段階であると解釈される。盗葉緑体性渦鞭毛藻類 *Nusuttodinium* 属には比較的捕食に近い盗葉緑体現象を見せる種 (*N. poecilochroum*) からオルガネラに近い現象を示す種 (*N. aeruginosum*) までバリエーションが存在するため、葉緑体獲得の研究には格好の材料である。本研究は *Nusuttodinium* spp. を主な対象とし、盗葉緑体現象の種間比較を行うことで葉緑体を一時的に維持する機構を解明することを目的とした。また、*Nusuttodinium* 属に見られる盗葉緑体現象を盗葉緑体性ユーグレナ *Rapaza viridis* と比較することにより、葉緑体獲得進化に関する共通原理を解明することを目的とした。

【方法】本研究では、以前より研究室で維持している *Nusuttodinium aeruginosum* と *N. poecilochroum* の培養株を用いた。各渦鞭毛藻株には餌生物としてそれぞれクリプト藻 *Chroomonas* sp. Dc01 株と *Chroomonas* sp. Ak01 株を与えて培養した。明暗に応じたトランスクリプトームの変動解析の培養条件として、餌のクリプト藻を取り除いた後、暗期で24時間培養したものを基準とし(0時間)、明期に移して1, 6, 12時間後、再度暗期に移して1時間後(13時間)とし、明期と暗期のトランスクリプトームの変動を比較した。*N. aeruginosum* における異なる窒素源に応じたトランスクリプトームの変動解析の培養条件として、餌のクリプト藻を取り除いた後、硝酸のみ、亜硝酸のみ、アンモニウムのみ、窒素源なしの4条件で5日間の連続明期培養(明暗による影響を避けるため)を行い、トランスクリプトームを比較した。盗葉緑体性ユーグレナ *Rapaza viridis* でもトランスクリプトーム解析によって窒素同化に関する遺伝子群の探索を行った。

【結果・考察】明暗に応じたトランスクリプトーム解析の結果、捕食に近い盗葉緑体現象を示す *N. poecilochroum* は硝酸輸送体(NRT)、硝酸還元酵素(NR)の遺伝子が発現しておらず、その他栄養塩の輸送に関わると考えられる遺伝子群(アンモニウム輸送体, AMT)は明暗の切り替えて発現が変動しないことが明らかとなった(図1)。培養実験の結果、*N. poecilochroum* はクリプト

藻を除いた条件では増殖することができず、明所でクリプト藻添加したときのみに増殖が確認された。これらのことから、*N. poecilochroum* では盗葉緑体への栄養塩輸送を行っておらず、光合成、および葉緑体での無機栄養塩の同化に依存しているというよりは、捕食によって得られる物質に依存していると考えられる。真の葉緑体に近い現象を示す *N. aeruginosum* ではNRT, NR, AMTの遺伝子群が明期で発現上昇することがわかった(図1)。また、硝酸還元酵素の系統解析から、渦鞭毛藻が持っているNRはクリプト藻からの水平転移によって獲得されたものであることが明らかとなった。異なる窒素源に応じたトランスクリプトーム解析の結果、宿主渦鞭毛藻のNRT, NRは硝酸を与えたときに発現上昇し、藻類や植物に共通する発現パターンを示すことがわかった。*N. aeruginosum* はクリプト藻を除去し、それぞれアンモニウム、亜硝酸、硝酸イオンを唯一の窒素源とした培地で増殖することが可能であるため、これらのイオンを積極的に細胞外から取り込み、共生体に輸送していることが示唆された。特に、硝酸単体でも増殖可能であることから、宿主渦鞭毛藻はクリプト藻から獲得したNRを使って取り込んだ硝酸を還元して共生体に与えている可能性も示唆された。

盗葉緑体性ユーグレナ *Rapaza viridis* でも、遺伝子の由来は不明であるが、NR遺伝子を水平転移によって獲得しており、このNRを用いて硝酸を還元し、盗葉緑体に輸送していることが示唆された。これらから、現生の藻類が持つ硝酸同化能は、盗葉緑体性の生物でも獲得しうることが示唆され、葉緑体獲得への進化では光合成に関する遺伝子群の水平転移による光合成の制御機構獲得よりも先に、無機栄養塩輸送・同化の機構を獲得する進化が起こる可能性があることが考えられる。

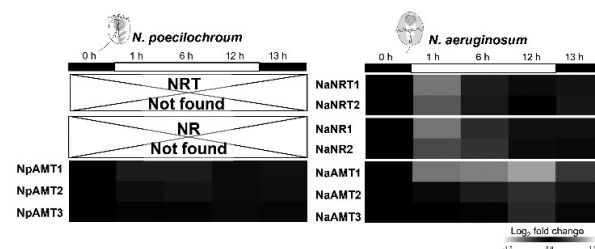


図1 *N. poecilochroum* と *N. aeruginosum* の明暗に応じた窒素同化に関する遺伝子群(NRT, NR, AMT)の発現変動

植物病原細菌の感染プロセスに重要なホスファチジルコリン生合成機構の構造基盤解明

渡邊 康 紀

【目的】 ホスファチジルコリン (PC) は真核生物特異的リン脂質であるが, *Agrobacterium tumefaciens* 等, 植物へ感染し, 宿主の腫瘍形成を導く一部の細菌は生体膜中に PC を含んでおり, 真核生物のリン脂質組成と似ている. PC を生合成できない *A. tumefaciens* は, 植物への感染能を失うことが報告されており, PC が植物への感染プロセスに重要な役割を担うことを示唆している. PC はリン脂質 *N*-メチル基転移酵素 (PmtA) が触媒する *S*-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体としたホスファチジルエタノールアミン (PE) の三段階のメチル化反応によって生合成される. 本研究では, 構造生物学的アプローチを主軸に PmtA による PC 生合成機構の解明をめざした.

【方法】 *A. tumefaciens* 由来 PmtA (AtPmtA) および大豆根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* 由来 PmtA (BjPmtA) について, 大腸菌の発現系を用いて調製した. 結晶化は蒸気拡散法を用いて行った. 得られた結晶を用いて SPring-8 の BL32XU にて回折実験を行った. 位相は AlphaFold 2 による AtPmtA の予測構造を利用した分子置換法により決定した. NMR 測定用 ^{13}C , ^{15}N ラベル化 AtPmtA は, ^{13}C , ^{15}N ラベル化 M9 培地で培養した大腸菌の系を用いて調製した. NMR の測定は, 北海道大学次世代物質生命科学センターの 800 MHz もしくは 600 MHz NMR 装置を用いて行った.

【結果・考察】 結晶化には AtPmtA の *N* 末端 25 残基を欠損させたコンストラクト (AtPmtA Δ N25) を用いた. SAM からメチル基が解離した *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) を AtPmtA Δ N25 と混合することで結晶を得ることに成功した. SPring-8 の BL32XU にて回折データを収集し, 2.0 Å 分解能で結晶構造を決定した. AtPmtA はロスマンフォールドを形成しており, そのフォールド中の溝に SAH が結合していた (図 1). ^{13}C , ^{15}N ラベル化した AtPmtA Δ N25 を用いて, SAH を添加前および添加後のサンプルについて各種三次元 NMR を測定し, 主鎖帰属を行った. SAH の添加に伴って, いくつかの NMR シグナルについて化学シフト変化が見られ, 新たに出現した NMR シグナルも観測された. 化学シフト変化が見られたアミノ酸残基および新たに NMR シグナルが観測されたアミノ酸残基を結晶構造上にマッピングしたところ, 主に SAH 分子近傍に位置しているアミノ酸残基の NMR シグナルが変化していることがわ

かった. AtPmtA Δ N25 は SAH 結合に伴って強固なフォールドを形成することが示唆された.

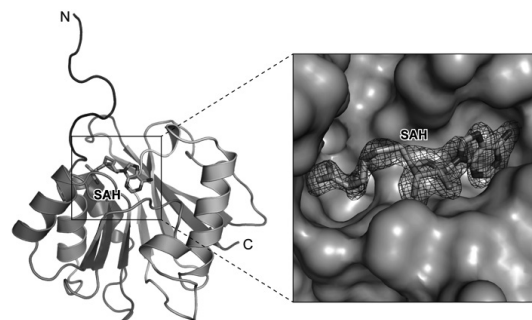


図 1 AtPmtA Δ N25-SAH 複合体の結晶構造. 全体構造(左)と SAH 結合領域の拡大図(右)を示す.

AtPmtA は PE の三段階のメチル化反応全て触媒することで PC の生合成を担うが, BjPmtA は PE の最初の二段階のメチル化反応しか触媒しない. AtPmtA の SAH 結合部位から示唆された PE の認識ポケットを構成するアミノ酸のうち, Ile159 が BjPmtA では Phe161 になっていた (図 2A). 各種 PmtA 発現大腸菌膜のリン脂質を薄層クロマトグラフィー法により調べたところ, AtPmtA の I159F 変異体は PE の三段階目のメチル化反応の触媒活性が低下し, BjPmtA の F161I 変異体は PE の三段階のメチル化反応を全て触媒した (図 2C). 以上のことから AtPmtA の Ile159 (BjPmtA の Phe161) が基質特異性の決定に関与していることが示唆された.

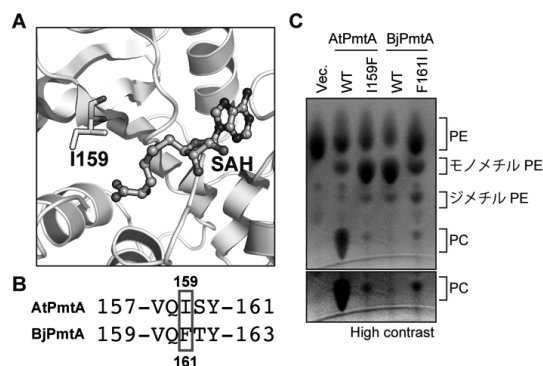


図 2 A. SAH 近傍に位置する Ile159 残基. B. AtPmtA と BjPmtA の配列アラインメント. C. AtPmtA 変異体および BjPmtA 変異体の PC 合成活性.

マウス腸内細菌におけるゲノム進化速度の解明

高安 伶奈

【目的】 ヒト一人あたりが保持している細菌の細胞数、ゲノムサイズ、複製回数と、大腸菌ゲノムで起こるゲノム変異 (SNP) の *in silico* での速度試算からは、一日に腸内で起こりうるゲノム変異は実に10の9乗~12乗とも試算されている。腸内細菌は今も宿主とともに共進化していると考えられているが、腸内細菌が実際に腸内で進化している様子を時系列で追った研究はまだ非常に少ない。本研究では、マウスの一生にわたる腸内細菌の観測に基づく、細菌ゲノムの変化の解明を目的とした。

【方法】 本研究では、8匹の同腹のSPFマウスの糞便を長期にわたりサンプリングし、酵素法を用いてDNA抽出した後、ロングリード (PacBio Sequel II) と、ショートリード (Illumina Novaseq 6000 system) のシーケンス技術で得られる両データを組み合わせ、細菌ゲノムの再構築と一塩基多型 (SNP) の推定、iRep (C. Brown et al., *Nature Biotechnology*, 2016) を用いたゲノム複製速度の推定を行った。また、ショートリードのデータからメタゲノミックアセンブルゲノムを構築し、マウスの生涯を通じて発生した水平遺伝子伝播 (HGT) イベントの推定も行った。

【結果・考察】 今回、ロングリード (PacBio Sequel II) と、ショートリード (Illumina Novaseq 6000 system) のシーケンス技術を組み合わせた最新のメタゲノム解析により、*Lactobacillus*, *Alistipes*, *Dubosiella* 属等を含む計15の完全長細菌ゲノムが再構築され、それらのゲノム比較を行った。これらの解析の中で、一生にわたる複雑な腸内細菌のダイナミクス変化の裏に潜む細菌群の成長速度の変化に加え、細菌のゲノムが一生の中で進化していく様子を捉えることに成功した。

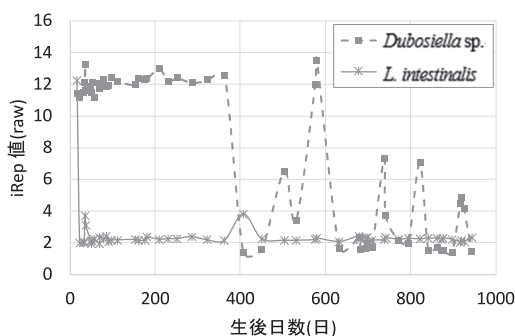


図1 細菌ゲノムの複製速度の一生にわたる変遷例

まず、腸内細菌の長期観測サンプルから、一生の各時期における腸内細菌の成長率の変化を推定したところ、大きな変化が観測された。*Erysipelotrichacea* 科の一種で *Dubosiella* 属に属する細菌ゲノムでは、生後400日程度までの若年期の長期にわたり、非常に活発にゲノム複製を行っていた一方、後半生ではゲノム複製はかなり抑制されていた可能性が示された (図1)。

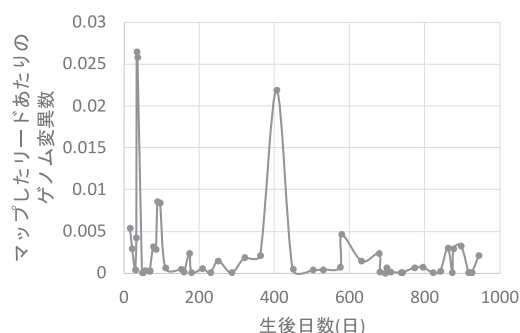


図2 *L. intestinalis* ゲノムにマップしたリード1つあたりのゲノム変異数の一生にわたる変遷

Lactobacillus intestinalis のゲノムでは、特に生まれた直後に非常に高い率でのゲノム複製が観測された一方、離乳後は安定した挙動を見せた (図1)。ただし、観測された突然変異は生まれた直後に偏るわけではなく、特に生後50日程度、400日程度のタイミングで急激なゲノム変異の増加を確認した (図2)。また、個々の塩基変異について相対存在量をショートリードメタゲノムデータから推定し、似た時系列ダイナミクスの変異をクラスタリングすることで、株レベルのダイナミクスの推定を行った。生後すぐは5株程度が存在したと推定される。また、当初独占状態にあった株と、一生の中盤以降に多数を占めた株は異なっていた。ゲノム上に観測された変異をマップすると、13箇所の変異のホットスポットが存在した。

2021年度学会・研究部会助成の研究報告

助成期間：2021年4月～2023年3月

日本微生物資源学会における微生物分類学に関する支援活動

大 熊 盛 也

【活動内容および成果】

日本微生物資源学会は、微生物多様性の理解とその保全及び持続的利用に資するため、微生物資源に関する科学技術や微生物系統分類学の発展を促進することなどを目的としている。2015年日本微生物系統分類研究会の当学会への合流を機に「微生物系統分類部会」を設置し、微生物分類学に関する当学会の学術活動の方策や将来計画についての議論等を行ってきた。公益財団法人発酵研究所 2021年度学会・研究部会助成に基づき、微生物系統分類部会を中心に、微生物分類学を志す若手研究者および関連研究者の支援と人材育成、および、微生物分類学分野の活性化をめざした活動を実施した。

1. 学会参加、論文発表への支援

学会やシンポジウム等における「分離・分類・保存」に関する研究発表に対し、渡航費や参加費等の支援を行った。コロナ禍の影響で学会発表がオンラインとなる場合が多く、論文投稿に対する掲載費・オープンアクセス費等の支援も合わせて行うこととした。支援の対象は、当学会の大会・シンポジウム等で発表実績のある成果、または、今後成果発表をすることを条件とし、会員・非会員は問わないこととした。当学会ホームページやメール配信にて広く案内し、申請に対して系統分類部会メンバー等による審議を経て支援対象とした。

学会発表については、国際学会4件、国内学会2件、計6件の学会発表を、5名の学生と1名のポスドク研究員に支援した(表1)。また、4件の論文発表について、若手研究者に支援することができた(表2)。

これらの支援者には、後述の2023年3月の公開シンポジウムで、講演またはビデオでのショートトークで支援対象の研究成果を紹介いただいた。このうち千葉大の3名の学生は、いずれも初めての国際学会への参加で(図1)、緊張の連続の中での貴重な体験について、日本微生物資源学会誌に学会見聞録を寄稿いただいた(39巻1号に掲載)。3名のうち1名は、この国際学会への参

表1 学会参加への支援

氏名(所属)	発表学会
森 雄吾 (千葉大真菌医セ)	Asian Mycological Congress 2021, Bangkok, Thailand
谷道琢朗 (千葉大真菌医セ)	Asian Mycological Congress 2021, Bangkok, Thailand
日高仁晴 (千葉大真菌医セ)	Asian Mycological Congress 2021, Bangkok, Thailand
青木敬太 (東農大総合研)	36th International Specialized Symposium of Yeasts, Vancouver, Canada
阿部晃大 (茨城大理)	日本微生物生態学会第35回大会 札幌
丸岡直弥 (東工大生命理工)	日本微生物生態学会第35回大会 札幌

表2 論文発表への支援

氏名(所属)	発表論文
酒井博之 (創価大理工)	Microbiol. Resour. Announc., 10 (38): e0058221 (2021)
鈴木重勝 (国立環境研)	Mol. Bio. Evol., 39 (2): msac001 (2021)
加藤真悟 (理研JCM)	Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 72 (8): 005489 (2022)
鈴木重勝 (国立環境研)	DNA Res., 29 (6): dsac037 (2022)

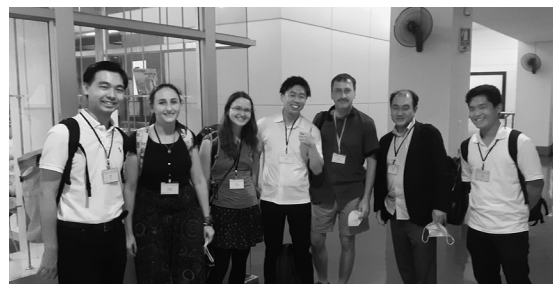


図1 参加した国際会議(Asian Mycological Congress 2021)での支援者らと海外研究者

E-mail: mohkuma@riken.jp

役職: 日本微生物資源学会 2019-2022 年度会長

加を一つの契機として博士課程へ進学し、糸状菌の分類の研究に取り組むとのことである。

2. 技術研修への支援，微生物保存機関紹介動画の作成

当学会は、微生物株コレクションの保存管理・提供の事業を実施する機関会員を有することを特徴としている。機関会員には分類や保存の技術に長けた研究・技術者がおり、関連の技術を広く普及させることを目的に、技術研修への支援を実施した。2023年3月7-8日開催の理化学研究所JCMによるオンラインでの「真菌類の分子系統解析に関する技術研修」に支援を行った。同機関での毎年の技術研修には数名の参加者があるとのことであるが、このオンライン研修には23名もの聴講者が参加し、大変好評であった。研修後のアンケートでは回答者全員が内容等に満足とのことであった（図2上）。

一方で、コロナ禍の影響で多くの機関では技術研修の開催を見合わせる事が多く、技術研修への申請は限定的であった。そこで、機関会員の微生物株保存等の活動と保存されている微生物株について、一般への啓発を目的として、紹介動画を作成することとした。国立環境研NIES、理研JCM、千葉大IFM、東京農大NRIC、鳥取大FMRC、大阪大RIMD、製品評価技術基盤機構NBRC、石巻専修大ISUの7つの機関会員から賛同が得られた。作成した紹介動画はYouTubeにより一般に配信し、当学会のホームページの機関会員のページからYouTubeへのリンクを貼ることとした（図2下）。



図2 オンライン技術研修での集合写真（上）と機関紹介のYouTube動画（下）

3. シンポジウムの開催支援

コロナ禍で現地参集でのシンポジウムの開催が困難な状況であったことから、2021年度は第27回大会に合わせ、オンデマンド配信の形式でシンポジウムを開催した。開催主催者側にもまだWebでの配信のノウハウがなく、本助成によって実現させることができた。シンポジウムは「環境負荷低減に向けた農業・食品関連微生物の分類とその応用」と題し、大会を主催する農研機構に関連した農業・食品分野に焦点をあてたものとしたが、国内外から1名ずつ、微生物リソース情報、ゲノム情報を基盤とした分類学への取り組みについても話題提供をいただき、計6つの講演があった（図3）。

2022年度7月には、第28回大会の前日に「持続可能な微生物の利用と分類」と題した公開のシンポジウムを現地開催（東京理科大）とオンライン配信のハイブリッドで開催した。持続可能な開発目標であるSDGs達成に貢献する微生物と、それら微生物の研究のよりどころとなる持続可能な分類学という趣旨で、海外からの講演者1名（オンライン講演）を含む8名に話題提供をいただいた。オンライン接続だけでも220名もの聴講があった（図4上）。

2023年3月には、「新たな時代を拓く微生物分類学：現状と展望」と題した公開のシンポジウムを、都内での現地開催とオンライン配信のハイブリッドで開催した。

シンポジウム

※本大会におけるシンポジウムについては、公益財団法人発酵研究所から助成を受けています。

<p>S-1</p> <p>The management and application of microbial big data in national and international level</p> <p>Juncai MA</p> <p>動画</p>	<p>S-2</p> <p>原核生物における全ゲノム配列比較解析法 〜過去と未来〜</p> <p>宮崎智</p> <p>動画</p>	<p>S-3</p> <p>食品副産物を発酵できる Lactiplantibacillus plantarum をはじめとした農研機構が保有 する機能性乳酸菌について</p> <p>木元広実</p> <p>動画</p>
<p>S-4</p> <p>市販食品に付着した細菌の分離 について 〜日本およびタイで 販売された豆腐の付着細菌の同 定〜</p> <p>細谷幸恵</p> <p>動画</p>	<p>S-5</p> <p>肥料を効率的に利用するための 植物共生微生物： Glomeromycotina遺伝資源 の収集と管理</p> <p>大友暁</p> <p>動画</p>	<p>S-6</p> <p>生分解性プラスチックの分解コ ントロール使用済み農業資材の 分解機構解析と人為的な分解促 進スニツの開発を支える微生物 遺伝資源</p> <p>北本宏子</p> <p>動画</p>

図3 2021年度のシンポジウム講演のオンデマンド配信



図4 2022年度7月（上）と2023年3月のシンポジウムの様子（中，下）

このシンポジウムは、2022年9月に逝去なされ、微生物分類学に多大なる功績を残された駒形和男先生の追悼の意を込めたものとした。6名の講演者に話題提供をいただき、駒形先生の活躍された時代から現在までを振り返りつつ、培養を介さないゲノム情報による微生物の同定・分類の現状と将来についても熱い議論がなされた。聴講参加申し込み者数は307名までになった（図4中，下）。

それぞれのシンポジウムの詳細については、以下のよう
に当学会誌にて報告を行った。

- ・石田達也，乙黒美彩，高島昌子，佐藤 衛. 2021年シンポジウム「環境負荷低減に向けた農業・食品関連微生物の分類とその応用」*Microb. Resour. Syst.* 37: 72-75 (2021).
- ・河地正伸，飯野隆夫，石田達也，乙黒美彩，鈴木 誠，高島昌子，矢口貴志. 2022年シンポジウム「持続可能な微生物の利用と分類」*Microb. Resour. Syst.* 38: 90-94 (2022).
- ・田中尚人，飯野隆夫，石田達也，伊藤 隆，乙黒美彩，河地正伸，鈴木 誠，高島昌子，駒形和男先生追悼公開シンポジウム「新たな時代を拓く微生物分類学：現状と展望」*Microb. Resour. Syst.* 39: 41-45 (2023).

公益財団法人発酵研究所2021年度学会・研究部会助成をいただき、当学会の系統分類部会を中心とした微生物分類学に関する研究発表の支援と若手人材の育成、技術研修の支援、保存機関活動の啓発、微生物分類学分野の活性化を目的としたシンポジウム等に活発な活動を行うことができた。コロナ禍の状況で、申請時の計画どおりには活動が実施できなかったところもあるが、オンライン・オンデマンド配信など不慣れなことにも本助成がいただけたおかげで柔軟に対応することができた。心より感謝申し上げます。

公益社団法人 日本生物工学会 未培養微生物（微生物ダークマター） 資源工学研究部会の研究推進活動について

青 柳 秀 紀

【はじめに】

生物学は、微生物をはじめ、動物・植物細胞などの生物の機能を活用し、食糧、医療、環境、エネルギーなど、私達の生活を取り巻く、種々の問題の解決に挑戦する学問領域である（基礎から応用まで、様々な研究分野を含んでいる）。公益社団法人日本生物工学会は生物学に関する学理及びその応用の研究についての発表および連絡、知識の交換、情報の提供などを行う場となることにより、生物学に関する研究の進歩普及を図り、もってわが国の学術の発展に寄与することを目的としている（生物をより深く理解し、その機能を生かして豊かで安全な生活と持続可能な社会の実現に貢献する）。本学会には多様な研究部会が活発に活動しており、未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会（図1）（https://www.sbj.or.jp/division/division_mdarkmatter.html）もその中の一つである。

従来の微生物培養法では自然界の微生物の1%程度しか培養ができていない、残された99%の未培養微生物（Microbial dark matter）資源は、国内外で学術、産業

面の利活用が期待され、網羅的なゲノム解析などが活発に行われている。しかしながら、塩基配列だけでは分からない微生物の機能解明や利用を考えた場合、生物工学的視点から、ダークマター微生物の解析、探索、分離・単離、培養、評価、保存、利用に関連する新規技術開発や、ビッグデータとの連携が必須である。このような現状を踏まえ本研究部会が設立され、未培養微生物（微生物ダークマター）に関連する研究、基盤技術開発、利用の活性化を目指し活動をしている中で、2021年度 公益財団法人 発酵研究所 学会・研究部会助成に申請・採択され、下記の活動を行った。

【活動内容および成果】

1. 研究部会支援型の公募制度の確立と研究助成

日本生物工学会ではじめて、研究部会支援型の公募制度を確立し、「微生物の分離・培養・分類・保存などに関する研究で、生物学分野におけるダークマター微生物の課題を解決する新たな方法論や基盤技術の確立を目指した研究を推進し、未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会の活動推進に貢献する提案（異分野・融合領域、産官学連携のシーズとなる研究も含む）」を生物工学会の正会員から公募し、審査を行った。その結果、下記3名の若手研究者に研究助成を行い、研究部会と連携して研究を推進することで、一定の成果が得られた。下記に実施した助成課題の概要を紹介する。

1) 坂元 仁 (大阪公立大学 研究推進機構)：生存しているが発芽不能状態の芽胞を標的とした未培養微生物の発芽および培養法の開発

〈研究成果の概要〉 栄養源飢餓などを感知して栄養細胞とは異なる耐久性細胞である芽胞に分化する芽胞形成細菌が存在する。芽胞はその耐熱性や化学薬剤耐性から滅菌評価の指標としても用いられてきた。何らかの原因で発芽不全の場合、増殖できない。そこでVBNC (Viable but non-culturable)とは異なる概念としてVBNG (Viable but non-germinatable)を想定した。VBNGには人為的な殺菌処理による損傷芽胞、環境中での長期間の劣化の蓄積による損傷芽胞、戦略的に発芽しない進化の選択な

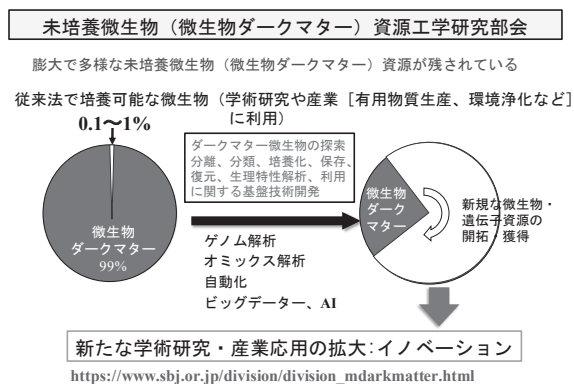


図1 研究部会のコンセプトの概念図

E-mail: aoyagi.hideki.ge@iu.tsukuba.ac.jp
役職：日本生物工学会 副会長 未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会代表

ども予想される。そこで身近な例として最初に好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* の芽胞を選択した。好熱菌芽胞は滅菌のバイオリジカルインディケーターとして使用されるが発芽の詳細は未解明のままであった。この芽胞はCFU法と顕微鏡による直接計数との比較では全芽胞中の1/100程度しかコロニーを形成せず、発芽できないのか戦略的な発芽抑制芽胞なのかは定かではない。これを天然VBGNと想定し、発芽誘起物質を調査した結果、この好熱菌の4種類の発芽誘起物質(L-Aspartic acid, L-Glutamic acid, D-Aspartic acid, D-Glutamic acid)を新たに特定した。だがこれらは10mMで増殖阻害を引き起こした。以上の成果は、書籍1件、学会発表4件として公表した。

2) 高橋 将人(筑波大学 生命環境系)：気相環境に着目した新規培養法による微生物ダークマター資源の探索
 〈研究成果の概要〉 微生物資源を利用するために培養技術は重要である。未培養微生物(微生物ダークマター)を利活用するためには、「未培養の微生物」と「未生産の代謝産物」の両方にアクセスする必要がある。しかし、培養化できる微生物は僅か1%程度であり、培養は従来のノウハウに依存している。このような背景の中、振盪フラスコ培養法による環境試料を用いた放線菌の集積培養中に、フラスコ気相部への間欠的な通気によって従来とは異なる放線菌の群集構造を形成する現象を見出した。この現象に基づき、『新奇なガス環境』の創出を目指した。微生物資源としての真価を引き出すことができる新たな基盤技術の確立を目指し、簡便に多検体を並列実施できるガス制御機構として、Non-electric Bellows Pump (NeBP) を独自に開発した。NeBPは、既存の振盪基盤上のフラスコ間のデッドスペースに設置でき、振盪条件に応じて、培養器内外のガスを無菌的かつ迅速に置換できる換気エンハンサーである。振盪機能を有するガスインキュベーターと併用することで、微生物の液内振盪培養中のガス制御も容易に実施可能となった。バイオプロセス開発上流における好気的な液内振盪培養のガス制御は、未開拓な培養環境であり、培養を介した微生物ダークマター資源の探索に直結する重要な知見となることが期待される。以上の成果は、原著論文2件、書籍1件、学会発表2件として公表した。

3) 辻 雅晴(旭川工業高等専門学校)：南極産菌類を利用した新たな研究分野の開拓への挑戦

〈研究成果の概要〉 ① 南極・昭和基地周辺産菌類の全ゲノム解析と遺伝子予測、② 南極産菌類の低温化で活性のある酵素の探索を通じて、南極産菌類を利用した新たな研究分野の開拓を目指し、下記の成果を得た。

① 南極産菌類の全ゲノム解析と遺伝子予測：辻が南極・昭和基地周辺の東オングル島から分離した担子菌酵母の *Cystobasidium tubakii* 9A-1株と、同じく辻が昭和基地周

辺のスカルプスネス露岩域から分離した担子菌酵母の *Mrakia gelida* MGH-2株について次世代シーケンサー PacBio Sequel を利用し全ゲノム配列解析と遺伝子配列の予測を行った。その結果、*C. tubakii* のゲノムサイズは21.5Mb, GC含量は50.1%, 予測されたタンパク質コード遺伝子の数は7,213であった。また *M.gelida* のゲノムサイズは34.9Mb, GC含量は55.7%, 予測されたタンパク質コード遺伝子の数は11,524であった。

② 南極産菌類の低温性酵素の探索：南極産菌類33株について4℃~15℃の温度条件下でβ-ガラクトシダーゼの活性を測定した。その結果、4℃では *Vishniacozyma* 属が1株と *Mrakia* 属が3株、β-ガラクトシダーゼの高い活性を示した。以上から、南極産菌類は低温性酵素の新たな探索源として有用であることが示された。以上の成果は、原著論文2件、書籍1件、学会発表3件として公表した。

2. シンポジウム「未培養微生物(微生物ダークマター)資源の新展開」の開催

https://www.sbj.or.jp/event/division_dark_matter_20230329.html

上述の研究助成を受けた3名の若手研究者の成果発表も含めた、シンポジウム「未培養微生物(微生物ダークマター)資源の新展開」を主催・開催した(2023年3月29日、御茶ノ水ソラシティカンファレンスセンター 完全対面開催、82名参加)。本シンポジウムでは、新規な培養デバイス iChip を開発、活用することでダークマター微生物を培養化し、新規抗生物質(teixobactin)の発見、生産につなげた Prof. Kim Lewis (Northeastern University) の基調講演(図2)、Lewis 研究室の Dr. Sangkeun Son の招待講演も実施した。

また、上述の3名の研究助成採択者が協力して企画した講演会(ミニシンポジウム)を開催した。演者と演題を下記に記載する。

Plenary Lecture: Discovering New Antibiotics from Unlikely Sources (Northeastern University) Kim Lewis



図2 Prof. Kim Lewisによる基調講演の様子

Invited Lecture: New Peptide Compounds of *Photorhabdus temperata* Identified by the Screening Approach That Monitors the Outer-Membrane Stress in *E. coli*

(Northeastern University) Sangkeun Son, Kim Lewis

2021 学会・研究部会助成 成果発表

高橋 将人 (筑波大学), 辻 雅晴 (旭川工業高等専門学校),
坂元 仁 (大阪公立大学/関西大学)

ミニシンポジウム

講演 1: 小山 純弘 (エイブル株式会社): **ITO** 電極を利用した微生物スクリーニング

講演 2: 橋本 陽 (理化学研究所バイオリソース研究センター): 3つの未知: 未発見・未培養の未利用真菌を環境中から引き摺り出す!

講演 3: 井上 浩章 (アクアス株式会社): アメーバ共培養法による難培養性レジオネラ属菌の検出

本シンポジウムには、産官学の研究者や学生が参加し、対面開催ならではの活発なディスカッションと新たな人的ネットワークの形成ができた。

3. シンポジウム「大規模データとインフォマティクスが拓く未培養微生物研究」の開催

https://www.sbj.or.jp/event/division_bioinfo_20220307.html

本学会の研究部会であるバイオインフォマティクス相談部会 (https://www.sbj.or.jp/division/division_bioinfo.html) と連携し、未培養微生物分野において、大規模計測技術 (オミクス解析や大規模イメージング解析)、実験自動化、ならびにそこから得られた大規模データを読み解くためのインフォマティクスを駆使して研究を進めている研究者を講師として学会内外から招聘し、最新の研究成果、Wet 技術と Dry 解析をどのように組み合わせたり、異分野間で連携しているのかに関する事例、研究現場ならではの「生の声」を聞く、若手研究者を中心としたシンポジウム「大規模データとインフォマティクスが拓く未培養微生物研究」(2022年3月7日、オンライン開催、100名参加) を開催した。演者と演題を下記に記載する。

講演 1: 高橋 将人 (筑波大学): これまで気づかなかったフラスコスケールの振盪培養法の実態

講演 2: 小西 正朗 (北見工業大学): その培地、最適ですか? 培地 AI で読みとく微生物培地

講演 3: 野尻 秀昭 (東京大学): 新しい技術で環境汚染物質分解微生物群集を探索する

講演 4: 西川 洋平 (早稲田大学): 1細胞・1粒子レベルのゲノム情報から読み解く、環境細菌とファージの相互作用

講演 5: 黒岩 恵 (東京農工大学): 代謝ポテンシャル解析を用いた anammox 細菌-共生細菌群間の相互作用の推定

講演 6: 松井 求 (東京大学): 未培養微生物研究におけるバイオインフォマティクスの役割

講演後に行われた情報交換会では、「困っていることや、データを取得するときに気を付けていること」など現場の研究者ならではの議論から、バイオインフォマティクスに対する期待、ダークマター微生物関連研究における、実験自動化、ビッグデータや AI の活用など、様々な議論が交わされ、講師と参加者間の情報交換や交流の機会を提供できた。

4. 第 74 回日本生物工学会大会 (創立 100 周年記念大会) シンポジウム「生物工学が拓く未培養微生物 (微生物ダークマター) の未来」の開催

https://www.sbj.or.jp/2022/symposium/program_4c07.html

上述のシンポジウム「大規模データとインフォマティクスが拓く未培養微生物研究」の討論内容も踏まえ、第 74 回日本生物工学会大会 (創立 100 周年記念大会) でシンポジウム「生物工学が拓く未培養微生物 (微生物ダークマター) の未来」(2022年10月20日、オンライン、150名参加) を開催し、最先端の研究成果の紹介と討論を行った。演者と演題を下記に記載する。

講演 1: 鈴木 志野 (宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所): 複合的極限環境に生きる微生物の生存戦略から紐解く極限微生物の遺伝資源の潜在性

講演 2: 東樹 宏和 (京都大学・生態研): 生物種間ネットワークと微生物叢動態分析で難培養生物に挑む

講演 3: 玉木 秀幸 (産業技術総合研究所・生物プロセス): 未知の微生物を“培養”して新たな生物機能を探る - 未利用微生物遺伝子資源開拓と利活用に向けて -
今井 優^{1,2} (¹信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所, ²ノースイースタン大学・抗生物質発見センター): 有用抗生物質探索源としての線虫マイクロバリオームの利用

講演後に行われたパネルディスカッションでは、キーテクノロジーを駆使した未培養微生物の開拓に関わる様々な分野の研究者が、オミクス計測や実験自動化などによる大規模データの取得、AI やデータサイエンスによる活用など、将来の展望についての討論が活発に行われた。

また、両研究部会は連携をさらに発展させ、自動化に関する研究 (アームロボットを用いた未培養微生物の実験自動化システムの開発に関する調査研究) を進め、プロトタイプのシステムを試作することができた。

以上の様に、2021 年度 学会・研究部会助成により、当該分野の活性化、認知度向上、研究・技術開発の推進、人的ネットワークの拡大、若手研究者育成など、次に繋がる成果を出すことができた。

発酵研究所助成研究報告集 第37号【非売品】

2023年12月10日 印刷

2023年12月20日 発行

編集委員長 左子芳彦
編集委員 太田寛行, 林 哲也, 遠藤銀朗,
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

