NUMBER 38

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2024

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 38



$2 \ 0 \ 2 \ 4$

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

田 申 巨	山 凌 - 世	
生 尹 文	中俱 一 唯	
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

卷頭言	清水	E ⊟	1
発酵研究所設立の経緯	中濱	一雄	3

■ 2022年度大型研究助成

日本人腸内細菌種を宿主とするファージの同定と分離須田	亙	9
アミノ基キャリアタンパク質を介した生合成システムによる		
化合物構造多様性創出の分子機構に関する研究西山	真	21
細菌の新たな元素状硫黄呼吸システムの分子機構三原	久明	37
腫瘍内複合細菌 AUN を用いるがん診断・治療都 🕴	英次郎	51

■ 2018年度寄付講座助成

革新的技術による輸送系膜タンパク質機能の解明と 「微生物膜輸送工学」への応用展開

革新的技術による輸送系膜タンパク質機能の解明と 「微生物膜輸送工学」への応用展開	•••	川崎	寿	59
メカノセンシティブ チャネルの解析と その微生物膜輸送工学に向けた応用展開橋本 賢一	,	川崎	寿	73
<i>Corynebacterium stationis</i> の 5′-IMP 排出膜輸送タンパク質 遺伝子の同定とその変異解析による排出膜輸送タンパク質 高機能化機構の解明	,	川崎	寿	87
高精度全原子分子動力学シミュレーションによる 膜輸送タンパク質の機能解析	,	川崎	寿	101
チラコイド膜局在性イオンチャネルの 電気生理学的解析と生理的役割の検討	,	川崎	寿	117

■ 2022年度一般研究助成

制限酵素断片のエンドシーケンシングによる細菌の 129到 多細胞化と性進化のモデル生物群「ボルボックス類」を次世代に伝える……野崎 久義 130 多重微小電極培養装置を用いた未培養電気合成微生物の分離および 電気合成生物カルチャーコレクションの拡充………………………………若井 暁 131 雅晴 132Actinotignum 属菌種の系統分類における新規解析手法の確立…………富田 純子 133嫌気性環境に棲息する未知の捕食性原核微生物の探索・分離と多様性解明……山本 京祐 134醤油酵母の分類に関する研究……………………………………………………………………………<</p> 潤 135シングルセルソーティングによる新規温泉アーキアの 網羅的分離培養およびリソース化・・・・・・加藤 真悟 136日本産アミガサタケ類の多様性解明と栽培化実現に向けた系統分類的整理……吉田 裕史 137 ヒト腸内有益放線菌の役割―迅速検出法と選択分離法の構築―………武 晃 138新規乳酸菌の系統分類とバイオリソースの整備……………………野田 悟子 139プラスミド宿主域を用いた微生物微分離法の利用域拡大…………………………木村善一郎 140出芽酵母より見出した新規な糖リン酸化酵素の生理的役割の解明…………梅川 碧里 141D.サイクロセリン生合成に関わる金属酵素の活性制御機構 ……………的場 康幸 142オミックス解析による酵素の探索とその理解…………………………松沢 智彦 143 極低濃度の抗生物質が示す新作用:細菌の細胞間形質転換を促進する作用……前田 純夫 144生体内の GTP 量を感知しエピジェネティックに発現制御される 昌也 145砂漠植物の根部内生微生物の多様性と培養可能な微生物の検証…………谷口 武士 146酵母の成長・分裂様式の可塑性の基盤解明…………五島 剛太 147Bifidobacterium bifidum 糖質分解酵素によるムチン糖鎖コア切り分けの 紀彦 148TORC1 シグナル経路を介した酵母細胞の高温増殖制御 ……………………… 両角 佑一 149バイオエコノミー技術への貢献を志向した 植物ホルモン様物質による微細藻類の増殖制御と回収法の開発……………高橋 利幸 150

腸炎ビブリオ菌が腸管の粘性環境に応答して病原性を発揮する仕組みの解明…寺島	浩行	151
麹菌の製麹時に見られる発熱現象の分子生物学的、生化学的解析外山	博英	152
ゲノム構造から紐解くヒト常在性日和見レンサ球菌の病原性進化メカニズム田端	厚之	153
エゾマツの天然更新を阻害する雪腐病菌の種構成と 冬季の環境条件との関係の解明松下	範久	154
異なる木質基質に依存するシロアリ腸内微生物叢の解析	岳	155
細菌外膜の機能維持に関与するシャペロン/プロテアーゼの新規機能の解析成田親	新一郎	156
超好熱性アーキアにおける RNA 耐熱化機構の研究平田	章	157
卵菌の温度に応答した形態形成制御に関わる因子の同定と機能解析谷	修治	158
植物病原糸状菌の新規病原性獲得機構に関する遺伝学的研究宇佐	見俊行	159
原始的リボソームの構築と進化の考察赤沼	元気	160
アスガルド古細菌から紐解く細胞形態の制御機構の分子進化千住	洋介	161
コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物と一酸化窒素の 生合成機構・生理的役割の解明~ 崔	宰熏	162
ビブリオのステロイド誘導性自己凝集体形成機構の解析松田	重輝	163
擬似有性生殖を介した植物共生菌および病原菌の進化機構の解明竹本	大吾	164
土壌微生物に共通する腐植物質応答制御機構の解明	拓哉	165
NADH 酸化能を失った非ミトコンドリア型呼吸鎖複合体Iの生理機能井上	真男	166
出芽酵母前胞子膜の MCS 再編成を介した伸長の分子機構解明 舘川	宏之	167
細菌セルロース分泌システムの完全再構成による バイオフィルム形成機構の解析奥田	傑	168
薬剤耐性に寄与するパーシスターの生理および誘導機構の解明山口	良弘	169
植物病原菌 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> におけるジャスモン酸生合成経路 およびその生理機能の解明佐藤	道大	170
グロムス亜門菌類が異なる形態のアーバスキュラー菌根を形成する メカニズムとその生理的意義の解明上中	弘典	171
分裂酵母における細胞間コミュニケーションを介した寿命決定機構の解明 山崎	晴丈	172
新規立体構造に基づく大腸菌 S2P 膜内切断プロテアーゼの切断制御機構の 解明と薬剤スクリーニング系の開発	洋平	173

酵母において空間的制御を受ける発酵経路酵素による解糖系調節機構の解明野村	亘	174
遺伝子の発現抑制最適化による高収率物質生産技術の開発山田	亮祐	175
植物関連放線菌が生産する二次代謝産物の解析よびその作用中島	琢自	176
ビックデータを活用した生物活性天然物の生合成経路の推定と実験的検証南	篤志	177
酵母由来再構築型生体外タンパク質合成系を利用した 非天然アミノ酸導入システムの確立	野乃	178
微生物によるリン酸セメントの生産技術開発	章夫	179
農耕生態系における共微生物叢の包括的把握と 作物強靭化に関わる作用機序の解明	昌男	180
腸内細菌に対するヒトモノクローナル抗体の探索と抗原分子の解析中野	秀雄	181
多様化するカンジダ症原因菌の病原因子および 抗真菌薬感受性と分子系統分類との関連性	由佳	182
リン酸化ネットワークを介したワックスエステル発酵制御機構の解明石川	孝博	183
宿主環境に最適化された抗菌治療薬探索法の確立	洋	184
合成生物学的手法による液体燃料の自在合成基盤の確立湯澤	賢	185
穿孔貝の共生微生物の生存戦略	龍文	186
病原性関連因子を分解代謝する微生物による植物病害防除佐藤	育男	187
好冷性放線菌のラッカーゼを用いた新規タンパク質架橋酵素の創出時下	進一	188
高効率な嫌気的ベンゼン分解を実現する最適微生物群の構築鈴木	研志	189
細菌スフィンゴ糖脂質の高度利用を目指した研究基盤の構築	望	190
複合微生物系プロセスの基盤制御技術の開発および理論構築田代	幸寛	191
発酵経路に依存しない適応進化機構の解明と C5 糖からの 有用二次代謝物生産への応用田中	勉	192
大規模ゲノム再編成を用いる休眠型二次代謝産物生産法の開発浅井	禎吾	193

■ 2022年度若手研究者助成

植物地上部に棲息する非病原性真菌類の分類及び C1 酵母の分布と特性評価…白石	晃將	195
ヒトロ腔内に蔓延する細菌の細胞壁/膜合成に関与する 巨大な染色体外エレメントの発見	悠也	196
分離株とゲノム情報から紐解く Epsilonproteobacteria 綱細菌の分類体系 長谷川	万純	197
ボタンタケ目の新規昆虫病原性系統 "ハスノミウジムシタケ" の分類学的検討山本	航平	198
細胞性粘菌が持つ膜受容体タンパク質の構造解析を突破口として G タンパク質共役型受容体の起源に迫る	英明	199
食の質的変化に依存した腸内環境変化が生体に及ぼす影響	潤基	200
ガスや液体寒天がラボスケールの液内培養中の 微生物に及ぼす影響の網羅的解析高橋	将人	201
ビフィズス菌における全てのオリゴ糖取込みを制御する グローバル ATPase:生理的意義の理解に向けて 阪中	幹祥	202
放線菌が真菌の侵略を防ぐメカニズムの解明	呆利紀	203
ゲノム解析とメタボローム解析による腟内優性乳酸桿菌の 生息に関わる代謝経路の解明神谷	知憲	204
典型的な DNA 修復因子が示す新規 RNA 結合活性の意義白石	都	205
アーキアにおけるセレンタンパク質合成機構の解明青野	陸	206
大腸菌の酸耐性発現誘導メカニズムの解明による次世代型感染防除法の構築…神田	健	207
水田細菌叢形成メカニズムの解析 - 土壌理化学性改変による菌叢制御の試み鈴木	一輝	208
水圏生態系におけるロドプシン集光アンテナの構造と機能志甫名	子 渉	209
アーキアのゲノム安定性維持に関わる新規タンパク質の機能解明尾木野	爭弘実	210

■ 2022年度学会・研究部会助成

日本乳酸菌学会における微生物の分類・培養分野の研究推進と啓発…………片倉 啓雄 211

卷 頭 言

卷 頭 言

清水 昌*

本誌の読者は、なんらかの意味で、微生物と関りを持っておられると思います. 最初に出 会った菌のことは、印象深く覚えておられるのではないでしょか?

私は、京都大学農学部発酵生理及び醸造学研究室で卒論をしました. 恩師の緒方浩一先生 から与えられた菌は、*Clostridium kainantoi*,それは、砂の中に胞子が混ざったものとして、 試験管に封入されていました. 試験管には IFO の番号がついていました.「手始めに、この 菌で Coenzyme A(CoA)をスコップで掬える程造れるようにできるか?やってみなさい.」 というのが課題でした. 培養後、遠心機で集菌、扇風機で乾燥・粉末化、基質液と混ぜて反応、 CoA ができるかどうか調べるわけです. IFO が何であるかを知ったのは、不注意で、使って いた菌株を死滅させた時でした. 緒方先生が、IFO つまり、発酵研究所に連絡してくださっ て、数株の Clostridium が手元に届きました.

当時,研究室には800株ほどの保存菌がありました.それらの8割程は,IFOから頂いた もののようでした.緒方先生は京都大学に来られる前は,発酵研究所におられたので,IFO の菌株が沢山あったのだと思います.結局,私は,研究室の保存菌のほぼすべてを,乾燥菌 体にしてバイアル瓶に入れて保存することになってしまいました.

それで、どうなったかという話ですが、CoAを作る菌は見つかりました. IFO12071, Brevibacterium ammoniagenesで、しばらくして、この菌が造る CoA は研究用試薬としてマー ケットに現れました. 乾燥菌体のコレクションは今も研究室でスクリーニングのために使わ れています. その中から、多くの有能な菌が見いだされて、研究や生産の場で活躍していま す. 長い年月が経つと、こういうことが実績になって、最近では、コレクション自体を公開 して、興味のある方々に使っていただけるものにしようという展開になっています(https:// www.jba.or.jp/b-production/overview.php). まあ、こんなことで、微生物のコレクションに は、いろんな形があって、それぞれが、一種の財産みたいなものだと思います. 大切に・有 効に使いたいものです.

さて、私は長年、こんなことをしてきたのですが、感じることは、「菌にはいろんなやつ がいるなあ」です、学術的に言うと、「多様性がある」ということでしょうか?もうひとつは、 「バイオは永くて(時間が長いという意味です)、不確か、あいまいさを許容する分野だ」と いうことです、それは、研究の対象が「生き物」だからだと思います、研究費の申請に、し ばしば、ロードマップを示すことが要求されることがありますが、バイオは、「こうすれば、

^{*}清水 昌(しみず さかゆ)

京都大学名誉教授, 公益財団法人発酵研究所理事

ああなる」というようなことがきちんと示せないというか、先が見えない分野でもあります. これは、子育てとよく似ているなあと思います.子供は両親の遺伝子の組み合わせでできて います.そういう意味では、一応の設計図があって、はっきりとしているのですが、子供は、 決して親の思ったようには育ってくれません.また、赤子がすぐに大人になるわけでもあり ません.長い年月が必要です.忍耐・試行錯誤の連続です.先が見えない世界です.その中 には、意外性や例外を多く含んでいます.また、説明はしがたいが、「おのずとそうなる」 あるいは「鳶が鷹を生む」ということもあります.研究・開発も同じです.このような部分 も逃すことなく、将来に繋がる発見やジャンプの基になるものを捕まえられるといいですね.

私の経験ですが,予め設定した研究のテーマとか手法は,始めてみるとそのほとんどが 「スカ」だと分かります.ですから,たくさん,色々トライしてみることも大事です.これは, 魚が,何故,あれ程たくさん卵を産むかというのと同じような理屈だといえばお分かりにな ると思います.また,野球でもバットを振らないとボールに当たりません.どうぞ,たくさ ん空振りしてください.その中から,将来にインパクトを与える何かが生まれれば,それは とても嬉しいことです.一方で,「感」とか「センス」など「論理」とはちょっとかけ離れた 部分も受け入れることがありうる領域でもあります.ちょっと面白い分野だと思っています.

人は、その先に何かがあるという目立てがあれば、積極的に動きますが、理由がないと動 かないという傾向に陥りがちです。例えば、禅の世界でもこうやったら悟りが得られるとい う確証や方法論がないという理由で、続けることが出来ずに辞めてしまう人も多いと聞いて います.これ、バイオにおける「不確かさ、あいまいさ」をどう考えるかと同じだなあと思 います.どうぞ失敗を恐れずに思い切ってやりましょう.

発酵研究所設立の経緯

中濱一雄*

発酵研究所(IFO)は、戦時中の昭和19年(1944年) に当時の内閣技術院と武田薬品工業株式会社(以下,武 田薬品という)との共同出資により設立され,約60年間, 微生物株の保存機関として国内外の研究を支援してき た.平成14年(2002年)にこの業務をNBRCに移し, 平成15年(2003年)に微生物の研究に特化した研究助 成事業を開始して現在に至っている.

発酵研究所は今年で設立80周年を迎えることになる. これを機に,設立の経緯に関する事柄が記載されている 書物,文献および当研究所の保管資料を調べてこれらを まとめ,発酵研究所の歴史の記録として残しておくため 本稿を執筆した.発酵研究所設立の経緯の概要は次のと おりである.

のちに発酵研究所の初代所長となる中澤亮治博士 (図1)は、台湾総督府中央研究所を定年退官後、昭和 14年(1939年)に武田薬品の顧問となり、微生物株の 収集、保存、分譲を行う中核保存機関(カルチャーコレ



図1 中澤亮治博士

*中濱一雄

1944年10月7日生まれ

クション)の設立を提唱し,同博士の下で設備,人員, 経費などが立案されていた.一方,昭和19年の戦時下 において科学技術の統制機関であった内閣技術院は有用 微生物の収集保存頒布と航空用の燃料,食糧,医薬品の 研究を強化するため民間へ協力を求めた.武田薬品は, この求めに応じて内閣技術院との共同出資により財団法 人航空醱酵研究所を設立するに至った.

発酵研究所設立の経緯に関する資料を以下に示す.なお,文中の資料を引用した際には,読みやすくするため, カタカナを平仮名に改めた.また,適宜,原語を現代語 に変更し,句読点を補った.

発酵研究所の設立に関する最も古いと思われる資料と して、手書きの「醱酵菌類ノ蒐集並ニ保管ニ関スル事業 企劃草案|(昭和16年6月2日と記入してある)があり、 事業の趣旨、内容、設備、人員、経費について記載され ている.事業の趣旨には「醱酵菌類の蒐集並に保管を行 う中央培養保管所の如き機関の設立は我国に於ける識者 間に夙に希望されたる所であって、今回中澤亮治博士之 を提唱せられるや、各大学、研究所等の研究室より挙手 して之に讃同せられ、それぞれ保管せられ居る菌類を提 出すべく申出て居られる.本事業は中澤亮治博士の指導 の下に蒐集せる菌類培養を保管し、希望者には一定の條 件の下に之を分譲し、その間に於て菌類の分類学的研究 をも行ひ、以て名実共に中央培養保管所の役割を果さん とするものである.(後略)」とあり、当時、中澤博士の 指導のもとで、菌類を収集、保管、分譲するとともに菌 類の分類学的研究を行う中核微生物株保存機関の設立が 企画されていたことがわかる.

発酵研究所の設立に関する資料のファイルの中に,内 閣技術院からの昭和18年9月23日付の文書「保存菌株 調査ニ關スル件」がある.これには「今般當院に於ては 微生物の活用方策樹立上の基礎資料として各地關係試験 研究機關に保存せらるる各種菌類及菌株の調査を實施致 すことと相成候に付ては別紙様式に依り御手數乍ら御記 入の上十二月末日迄に御回報相煩度此段及依頼候」とあ り,内閣技術院は微生物を活用するため国内の研究機関 が保存している菌株を調査していたようである.武田薬 品はこの調査依頼に回答したと思われるが,回答書の写

¹⁹⁶⁹年4月に武田薬品工業株式会社に入社,研究所に配属 2003年4月に武田薬品から財団法人発酵研究所(IFO)に転職 2003年4月から2017年6月までIFO常務理事 2017年6月からIFO理事長

しは発酵研究所には残っていない.

発酵研究所の長谷川武治元所長が所長退任後の1978 年頃に,後身に伝えるために書き記した文書「財団法人 発酵研究所 設立当時から昭和51年まで」には,発酵 研究所のみならず日本の微生物株保存機関の設立につい て参考になる記述があるので,次に示す.

「微生物株保存事業は生活している状態で、各種の生 体細胞を半永久的に保存していく仕事であるから、元来、 莫大な経費と担当技術者の確保を必要とするものであ る.わが国では、明治初年以来、早くから微生物学の進 展を見てきたが、その成果の1部としての微生物株を保 存し、次の研究目的に役立てる機関の育成はきわめて困 難であった.わが国の科学技術教育の中心であった東京 帝国大学でも、国立教育機関としてのいろいろな制約が あって、人材の確保さえ困難であった、そこで、東京帝 国大学農科大学が中心となり、大蔵省国税庁が母体とな り, 酒造業者の指導機関として醸造試験所が明治38年 に設立を見. 保存事業の基盤ができ上ることになった. そして、この試験所で育った2人の微生物学者、斎藤賢 道博士と中沢亮治博士は日本の興隆期に乗じて、明治末 年、それぞれ南満州鉄道株式会社中央試験所、台湾総督 府中央研究所という,植民地機関に移り,当時の内地で は得られない、自由で豊かな研究環境のなかで、CLMR、 GRIFという国際的に見ても遜色のない微生物コレク ションを育成されたのである、これらのコレクションは 第2次世界大戦前に両先生によって内地に持ち帰られた が、保存事業の困難さを知る両先生は、定年退官後、民 間企業の財力に支えられた研究機関を作って、コレク ションの維持を企てられ、その熱意が実って、昭和15年、 財団法人長尾研究所,昭和19年,財団法人航空醗酵研 究所が誕生することになった次第である.」

また、長谷川元所長が執筆した「日本の微生物株保存 事業」(長谷川,1999)には、「1940年前後、すでに戦時 下の日本では、物質生産手段として微生物工業への期待 は大きく、カルチャーコレクションはその基盤として重 要視された.しかしながら、これを備えるほどの研究施 設は、いずれも生産研究の主要拠点であったから、コレ クションだけの管理部門を設ける余裕などはなく、研究 者は自分たちの研究テーマに必要な微生物株の収集管理 と並行して、研究所のカルチャーコレクションの分担保 存を義務づけられた.戦局がきびしくなり、研究関係者 の軍務に召集される数が増えると、そのような管理態勢 をとることさえ困難になった.これが民間に微生物株保 存を事業目的とする研究機関設立の機運を生じた.1941 年、東京に財団法人長尾研究所が、1944年、大阪に財 団法人航空醱酵研究所ができて活動を始めたのは、いず れもそうした時代の要請によるものであった.しかしな がら、これらの民間機関も、たとえば碧素(ペニシリン) 研究会に参加して菌株の探索に当たるなどといったよう な生産協力研究を要求されたから、それらが保有してい たカルチャーコレクションの維持管理が容易でなかった のは、他の諸機関と大差はなく、保存活動を進めるため には戦争の終結を待つほかはなかったのである.」とあ るように、当時は微生物株保存機関の設立と活動が容易 ではなかったことがわかる.

「武田百八十年史」(武田薬品, 1962) には,発酵研究 所設立の経緯について次のように記述されている.

「武田薬品工業株式会社研究所には既に述べたように 第一醱酵科. 第二醱酵科の二研究室があって早くから有 用菌類の研究が行われていた.昭和十五年に同社顧問農 学博士中沢亮治(元・台北帝大教授)は、醗酵菌類の収 集保管を行なう菌類培養中央保管所ともいうべき機関の 設立を提唱して、各研究機関の賛同を得、十六年には諸 大学の研究室から菌類分譲の話もまとまり、設備、人員、 経費などが中沢博士の下で具体的に立案されていた. 一 方. 十九年に内閣技術院では. 有用微生物の収集保存領 布と航空用の燃料食糧医薬品の研究を強化するため、そ の中心となるべき研究所をつくり、これを他の関係研究 機関や生産機関と有機的に連絡して戦力増強に寄与させ ようとする方策をたてた. そこで武田研究所の醱酵部門 を中核として新たな研究所をつくり上げることとし、当 分は現在の設備を利用するが、将来は適当な地に研究所 を建設する考えであった.

また、「微生物株保存事業とIFO」(長谷川, 1995)には、発酵研究所設立の経緯とその後の経過について次の とおり記述されている。

「中沢博士は、1939年(昭和14年)に台湾総督府を 定年退官,大阪の株式会社武田長兵衛商店研究部に顧問 として迎えられ、このとき,GRIFの複製コレクション が研究部にもたらされた.このころから,日本の戦時態 勢は厳しさを増し,世情の緊迫化に伴って,東京帝国大 学農学部醱酵学教室(坂口謹一郎教授)でも,微生物株 コレクションの複製を作って遠隔の地に置くことが必要 になり,武田の研究部に保管を依頼した.1942年のこ とである.武田は1943年(昭和18年),社名を変更し て武田薬品工業株式会社(以下,武田薬品と略称)になっ た.そのころ,戦時下における科学技術の統制機関であっ た内閣技術院は,有用微生物資源の収集確保と微生物に よる航空関係物質の生産研究のために民間へ協力を求 め,坂口謹一郎教授の勧めもあって武田薬品がこれを引 受けることになった.その結果,同社研究所の発酵学研 究部門が分離独立し、1944年(昭和19年)、財団法人 航空醱酵研究所が設立されて中沢博士が初代所長に就任 した.これが現在の発酵研究所の前身である.1945年(昭 和20年)8月、第二次世界大戦は終結して内閣技術院 が解散し、同年11月以降、航空醱酵研究所は文部省の 管轄下に移り、所名を醱酵研究所に変更し、同時に英文 名をInstitute for Fermentation, Osaka (IFO)とした. 翌1946年(昭和21年)、広島工業専門学校(長西廣輔 教授)から、原子爆弾の被害で実験施設が使用不能に なったため、CLMRコレクションに重大な影響が出て いるとの救援依頼があり、IFOは同コレクションを引受 けて、その保存管理を担当することになった.」

昭和19年10月31日,武田薬品大阪工場研究所におい て財団法人航空醱酵研究所設立発起人会が開催された. 発起人33名のうち20名が出席.発起人代表者の中澤亮 治(武田薬品工業株式会社顧問)が議長となり,議長よ り提案された次の案について審議のうえ可決された.

- 第1号案 設立趣意書及び寄附行為に関する件
- 第2号案 初年度事業計画書並に初年度収支予算に 関する件
- 第3号案 基本財産に繰入れる件
- 第4号案 役員選任の件

同理事会で決定された当初の役員には,理事として朝比 奈泰彦(東京帝国大学名誉教授),斎藤賢道(大阪帝国 大学名誉教授),坂口謹一郎(東京帝国大学教授),武田 長兵衛(武田薬品工業株式会社取締役社長)らが名を連 ねている.

設立趣意書を次に示す.

「現下大東亜戦争において航空戦力の増強に對する要 望はいよいよ熾烈となりつつありますが、これを充たす 一環として航空燃料, 航空糧食あるいは航空用醫薬等の 整備改善の極めて重要なることは多言を要しません. 周 知のごとくアルコール、イソプロパノール、ブタノール のごとき航空燃料の原料は主として菌類を利用して製造 せられ. また航空糧食において欠くべからざる栄養剤た るビタミン B_2 又はビタミンCのごときものも、これま た菌類を使用して製造せられつつあります。諸種の菌類 は古くから醸造物に利用せらる傍ら、第一次世界大戦に おいてはグリセリン、アセトン、ブタノールの製造のご ときいわゆる新興醱酵工業の分野を開拓し、また、ドイ ツ國においては蛋白質又は油脂の給源として食糧, 飼料 に供せられましたが、次で今次の大東亜戦争に至る間、 これらの溶剤の製造以外に乳酸、フマル酸、クエン酸、 グルコン酸のごとき有機酸類あるいはビタミンA. B₁ B₂, C, Dのごとき諸種のビタミン栄養劑等の製造に, さらにアミラーゼ、ペクチナーゼ等の製品として脱糊 劑. 繊維の醱酵精錬等に用いられ. 最近には一般菌類の 病原菌に對する拮抗能を利用して治療剤を得るがごとき 極めて廣汎なる範囲にまでその用途が見いだされつつあ ります。然るに我國ではこれらの有用菌類が恣意に各研 究所、工場に分散して使用せられ、その間、これらの菌 類を統一的に保管する機關は今なお不幸にして設立され てはおりません、これらの事情とともに頻時にわたる空 襲等の災害を憂慮するとき。かくのごとき有用菌類の保 管、頒布を営む中枢組織の設立はまことに邦家の緊急時 とも言うべきであります. そればかりでなく, 既述の如 く菌類の新しき利用面が刻刻に開かれつつある現状にお いては、これを研究する機關の擴充もまた極めて重要な るは明らかでありまして、これらの両種の事業はあたか も楯の両面にも譬ふべく、両両あいまって一の総合的な る南類研究所として始めてその機能を完全に発揮し得る のであります。たまたま技術院よりの慫慂により、武田 薬品工業株式会社の既往の経験ならびにその實績を基礎 として關係各位方面の援助協力を得てここに財団法人航 空醱酵研究所を設立し、陸海軍その他關係方面との緊密 なる連携の下に一般菌類の保管及びその利用に關する研 究事業を行い、以て航空戦力の増強に貢獻せんとするも のであります.

また,寄附行為第二章(目的及び事業)の第三条は「本 財團法人は政府の科學技術の刷新向上方策に既應し菌類 の蒐集保存をなすと共に菌類を重要資材特に航空關係資 材の製造に應用する研究並にその生産化研究をなし航空 戰力の増强に貢獻するを以て目的とす」としている.

上記の設立趣意書と寄附行為から明らかなように,財 団法人航空醱酵研究所は,菌類を収集,保存,配布する とともに航空燃料,食料,医薬品の製造に応用すること によって航空戦力の増強に貢献することを目的として設 立することとした.

昭和19年11月1日,設立趣意書,寄附行為,その他, 関係書類を政府へ提出して設立認可を申請し,同年12 月22日付で設立認可の通達が政府から発せられた.申 請から認可までわずか52日であるが,これは財団設立 が政府からの要請であったためと思われる.

昭和20年1月24日に財団法人航空醱酵研究所第1回 理事会が武田薬品研究所(大阪市淀川区十三)で開催さ れた.当時の理事は12名で,このうち8名が出席した. 理事であった坂口謹一郎教授は,戦時下で米軍による空 襲がある中,はるばる東京から来られたことには頭が下 がる思いである.議長は,理事長である武田長兵衛社長 が務めた.

議事の第1号議案では,創立日は昭和19年11月1日 としている.

第2号議案「昭和19年度事業計画」には、「研究施設 の整備」に「建物及び設備として武田薬品工業株式会社 大阪工場研究所の一部を借用し」とある.「菌類の収集. 保管ならびに頒布 | には「有用菌種のみならず既知種で ある定型種をも収集し、これを整理し、且つ適当な条件 の下に保管し、原則として希望者に対してこれを分譲す ると共にこれらに付随する研究を行う、とくに航空燃料 あるいは航空食料に関係する諸種の有用菌種について検 索し、もって、その性能の向上を期するとともに、自然 界におけるこれらの菌類の分布状況を調査して新菌種の 発見に役立てる」としている. また、「研究事項」には 「菌類の基礎的研究」として、「収集した菌類の形態学的 ならびに生理学的研究を行い、以て有用菌類の定型を明 らかにし、また新しく諸種の菌類を分離して新しき用途 を発見、検索する」とある、菌類を収集、保存、分譲す るとともに、 南類の分類学的研究のみならず、 生態学的 研究や応用研究を含めた広汎な研究を計画しており、微 生物株保存機関としての業務を明確に示している. その 他.「菌類による有機酸の製造に関する研究」.「菌類を 利用するビタミン剤の製造に関する研究」、「菌類の拮抗 能に関する研究|.「菌類を利用する医薬品の製造に関す る研究 |. などが挙げられている.

同理事会では、上記の2つの議案を含む6つの議案が 承認された.このほか、武田薬品は財団に対し10万円 を昭和19年度分として寄付すること、財団はこのうち 5万円を基本財産にあて、残りの5万円を昭和19年度運 用財産として使用することが決定された.その後、昭和 20年度に入って、内閣技術院から研究補助金10万8,600 円が支給された. 財団法人航空醱酵研究所(理事長 武田長兵衛,所長 中澤亮治)は,武田薬品研究所に入居し(図2),昭和 19年度事業計画に基づいて業務を開始した.

保存菌株は、中澤亮治博士が台湾総督府中央研究所の 時に作成したGRIFコレクションおよび東京帝国大学 (坂口謹一郎教授)から戦時下に危機管理として保管を 委託されたATUコレクションをベースとし、その後、 斎藤賢道博士が南満州鉄道株式会社中央研究所で作成し たCLMRコレクションを合わせた。

発足当時,総員 39 名,このうち研究部 34 名 (研究者 が 22 名,補助員 12 名),事務部 5 名であった.各職制 ならびに研究者および所属は次のとおりである.

研究所長(専務理	[事) 「	中澤亮治	
事務部長(常務理	理事) 亻	尹藤正夫	
研究部長(常務理	理事) (左藤喜吉	
所長室	Ī	西山徳平	
第1醗酵課 課長	を平	友恒	
松村 親, 森服	易弘,	池田辰夫,	長谷川武治*,
大和谷三郎*,	藤井繁	Ц*,	
第2醗酵課 課長	を 植村	定治郎	
阿部又三,児ヨ	巨礼次朗	,福田重夫	5, 三上正己,
中沢鴻一*,石	田安成	*,近藤圭二	二*,緒方浩一*
望月一男*,多	田統雄	*, 田所 勇	放*,山野藤吾*
*印は、設立当時	,軍務	のため不在	であった者

第2回理事会(昭和20年5月10日)で承認された昭 和19年度事業報告書には、「昭和19年度において本研究 所が他の研究機関へ頒布せる菌種は9種にして又本研究 所保存菌種の増加数は72種なり」とある.また、研究業 績として、(1)粉末納豆とその利用の研究および(2)菌種



図2 発酵研究所が入居していた武田薬品研究所

の拮抗作用に関する研究,特にペニシリン製造の研究が 挙げられているが,航空燃料に関する研究は報告されて いない.なお,この事業報告書には保存している全菌株 数については記載されていないが,当時のものと思われ る「保存菌株表」には430株が記載されている.

終戦で平和な時代になり、航空関係の研究を行う必要 がなくなったため、昭和20年(1945年)8月25日に開 催された第三回理事会で、寄付行為の「特に航空關係資 材」および「航空戰力の増強に貢獻する」を削除すると ともに、「財団法人航空醱酵研究所」を「財団法人醗酵 研究所 | に変更することが決定された(さらに 1961 年 に「財団法人発酵研究所」に改称).昭和35年(1960年) 6月に応用研究部門を武田薬品に移管し、以来、微生物 株の収集、保存、分譲の業務に特化した微生物株保存機 関として活動してきた. 平成14年(2002年)にこの業 務をNBRCに移し、平成15年(2003年)から微生物の 研究に特化した研究助成事業をおこなっている. 設立後 の発酵研究所の歴史については長谷川武治(長谷川. 1995), 飯島貞二 (飯島, 2001), 長谷川 徹 (長谷川, 2014). 竹内昌男(竹内. 2016). 波多野和德(波多野. 2017) および中濱一雄(中濱, 2018) が執筆し,「発酵 研究所の歴史1,2,3,4,5&6」として本機関紙(IFO Research Communications) に掲載している. また, 生 物工学会誌の"資料"「微生物株の保存とバックアップ ~発酵研究所設立当時の理事会議事録から~|(中濱. 2015) には、第1~4回理事会の議事録が原文のまま記 載されている.

発酵研究所が設立されることになった契機の1つは国 からの要請で航空戦力の増強に貢献することであり,軍 事目的であった.しかし,それ以上に武田薬品の関係者 が「中核的な微生物株保存機関を作って活動したい」と いう強い熱意を持っていたと思われる.

発酵研究所は、昭和19年(1944年)に設立され、今

年で80周年を迎えることになるが、このように長きに わたって存続している財団法人は日本では珍しい.また、 微生物の研究だけを対象とする研究助成をおこなってい る財団法人は、日本はもとより世界でもほとんどないこ とから、発酵研究所は助成財団としての特徴ある存在感 を十分に発揮していると自負している。今後も、この研 究助成を通して微生物の研究の進歩・発展に寄与してい きたい。

文献

- 長谷川武治 1995. 微生物株保存事業とIFO. IFO Res. Commun. 17: 9-18.
- 長谷川武治 1999. 日本の微生物株保存事業. IFO Res. Commun. 19: 83-115.
- 長谷川 徹 2014. 発酵研究所の歴史~所長当時を回想して(1990~1995)~. IFO Res. Commun. 28: 1-10.
- 波多野和徳 2017. 発酵研究所の歴史(5) 微生物株保存事業から 研究助成事業への転換-その激動の2年間(2001.4~2003.3). IFO Res. Commun. **31**: 1-12.
- 飯島貞二 2001. 発酵研究所の歴史. IFO Res. Commun. 20: 15-33
- 中濱一雄 2015. 微生物株の保存とバックアップ~発酵研究所設 立当時の理事会議事録から~. 生物工学会誌 93: 139-148.
- 中濱一雄 2018. 発酵研究所の歴史(6) ~研究助成事業を中心に (2003.4~2017.6). IFO Res. Commun. 32: 1-12.
- 武田薬品 1962. 武田百八十年史.
- 竹内昌男 2016. 発酵研究所の活動-発酵研究所を継いだ人たち (1995.4-2001.3). IFO Res. Commun. **30**: 1-16.

略号

- NBRC: 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロ ジーセンター (NITE Biological Resource Center)
- CLMR:南満州鉄道株式会社中央研究所(Central Laboratory, South-Manchuria Railway Co.)
- GRIF :台湾総督府中央研究所(Government Research Institute of Formosa)
- ATU :東京大学農学部(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo)

2022年度大型研究助成の研究報告

助成期間:2022年4月~2024年3月

日本人腸内細菌種を宿主とするファージの同定と分離 須田 互

理化学研究所生命医科学研究センター共生微生物叢研究チーム 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22

Identification and isolation of intestinal phages from Japanese population. Wataru Suda

Laboratory for Symbiotic Microbiome Sciences, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences 1-7-22, Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045

Since the intestinal microbiota has a significant impact on the physiological state of the host, the development of technologies to control it is an urgent task. It is also thought that there are twice as many phages as bacteria in the intestine, and although the relationship between diseases and the intestinal phage flora is being reported, the overall structure of the intestinal phage flora and its relationship with diseases are still largely unknown. In this study, we performed metagenomic analysis of the intestinal phage flora of healthy Japanese people and multiple sclerosis (MS) patients to construct full-length genomes and deepen our understanding of the overall structure, and to explore the relationship between the intestinal phage flora and diseases and the possibility of controlling their pathology.

Feces were collected from a total of 90 volunteers, including those with relapsing-remitting MS, progressive MS, and healthy individuals, and DNA and RNA were extracted, followed by shotgun metagenomics and RNA sequencing using short- and long-type sequencers. The resulting reads were used for assembly, quality checks, and high-quality contigs were obtained. The high-quality contigs were classified using various tools to obtain full-length or nearly full-length phage genomes. The obtained phage genomes were subjected to gene function analysis and host estimation to identify the characteristics of the phages and to confirm the relationship between gene expression levels and diseases.

By assembling short and long reads, 6,185 nearly full-length phage genomes were obtained. When the obtained phage genomes were subjected to a homology search in existing phage genome databases, more than half were phages with novel genome sequences that had not been reported before. As a result of performing a pipeline process for host estimation, it was possible to estimate the hosts for approximately half of the phages. By using these phages as a reference, we analyzed the intestinal phage flora of MS patients and discovered phages and phage-derived functions (coenzyme B12 biosynthesis) that were significantly decreased by the disease. We also discovered active lysogenic phages that activate some pathogenic intestinal bacterial species by treating them with mitomycin. We are also investigating the control of pathogenic bacteria using these phages.

Key words: phage, microbiome, multiple sclerosis, coenzyme B12

E-mail: wataru.suda@riken.jp
共同研究者:木口 悠也 (東京大学大学院・理化学研究所).
竹脇 大貴 (国立神経精神研究センター).
増岡 弘晃 (理化学研究所).
黒川 李奈 (理化学研究所).
緒方 勇亮 (理化学研究所).
山村 隆 (国立神経精神研究センター).

緒 言

ヒトに常在する細菌の数は40兆個程度といわれ、ヒ ト細胞数と同等かそれよりも多いと見積もられている (Sender *et al.*, 2016).特に腸内細菌叢は1,000種以上の 細菌種から構成されており、その遺伝子数は1,000万以 上に上り、高い個人・国間多様性をもっているだけでな く、ヒトの生理状態(健康と病気)と密接に関係するこ とが明らかにされつつある.一方、腸内には細菌に感染

亙

するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)も 存在しており、ヒトの腸内には腸内細菌の2倍かそれ以 上の数のファージ粒子が存在するともいわれ(Reyes et al., 2012). ヒトの腸内微生物叢の主要構成要素の1つ であることが示されている.ファージには宿主細菌を溶 解することで腸内細菌叢を変える溶菌 (virulent) ファー ジと (Hsu et al., 2019), 細菌に感染しともに過ごす溶 原性(temperate)ファージが存在する.近年腸内ファー ジ叢の変化が、炎症性腸疾患(Norman et al., 2015). 糖尿病 (Zhao et al., 2017), 関節リウマチ (Tomofuji et al., 2022) などのさまざまな疾患で報告されている。ま たいくつかのファージは、モデル動物において記憶機能 を改善し、加齢に伴う認知機能障害を促進することが知 られているが (Mavneris-Perxachs et al., 2022). 腸内 ファージ叢の全体構造や疾患との関連はいまだ不明な点 が多く、疾患に関連するヒト腸内ファージ叢の変化を詳 細に解明し知見を深めることが重要である.

多発性硬化症(MS)は、中枢神経系(CNS)の自己 免疫性脱髄疾患であり、2つの臨床状態に分類される。 ほとんどの患者は急性神経炎(再発寛解型 MS; RRMS) を断続的に発症するが、患者の一部は二次進行性 MS (SPMS) に移行し、進行性の神経障害となる、最近の メタゲノム研究では、腸内細菌叢のディスバイオーシス が MSの病因と有意に関連していることが明らかになっ ている (Miyake et al., 2015; Takewaki et al., 2020).ま た特定の腸内細菌は、自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウ スモデルにおいて,腸内で病原性T細胞を誘導し,自 己免疫機能を悪化させることが示されている(Mivauchi *et al.*, 2020). さらに、短鎖脂肪酸(SCFA)、芳香族炭 化水素受容体 (AhR), スペルミジンなどの腸内細菌由 来の免疫調節代謝物は、MSにおける神経炎症を抑制す る可能性があることが報告されている (Haghikia et al., 2015; Yang et al., 2016; Duscha et al., 2020). これらの 知見は、MSにおける腸内微生物叢の関連性を示してい るが、研究のほとんどは腸内細菌叢のみの解析に焦点を 当ててきたため、MS患者の腸内ファージ叢の特徴とそ の機能がMSに与える影響はほとんどわかっていない. そこで本研究では、糞便ファージ粒子のDNAを取得し、 高品質のファージゲノムを再構築することによって, MS の発症における腸内ファージ叢の関与を明らかにす ることとした.

実験方法

腸内ファージ叢解析の概略

本研究で用いた腸内ファージ叢解析の概略図を Fig.1 に示した (Fig.1).



Figure 1 Workflow of this research Workflow of this research from DNA extraction to analysis.

糞便サンプル収集と DNA・RNA 抽出

本研究は国際神経精神研究センター(NCNP)と理 化学研究所生命医科学研究センターの倫理委員会の承諾 のもと、インフォームドコンセントを行った上でサンプ ル収集を行った. NCNPにて診断された RRMS 患者 40 名, SPMS 患者 20 名, および健常ボランティア(HC) 30名から糞便サンプルの提供を受けた.得られた糞便 サンプルを-80℃で冷凍保存した.保存した糞便サンプ ルは氷上で解凍後200~300mgを取り分け、リン酸緩 衝生理食塩水(PBS)を10mL加えた後,100μmのフィ ルターを通して糞便中の残渣を取り除いた. 濾過液を遠 心し(4℃, 9,000g, 10分間), ファージが濃縮された 上清 (VLP) を1mLを回収し、300mg/mLのリゾチー ムを 100 µLと 10 mMトリス塩酸緩衝液・20 mM EDTA 溶液(TE20)を1mLを加え,37℃で振盪しながら反 応させた. 1時間後, 100 units/µLのアクロモペプチダー ゼを40µL加え,37℃で振盪しながら反応させた.さら に1時間後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、最終濃度 1%)と2mgのプロテナーゼKを加え、55℃で振盪し ながら1時間反応させた.反応後,溶液に等量のフェノー

ル・クロロホルム・イソプロパノール溶液を加え,良く 混和した後に遠心(室温,12,000g,10分間)した.得 られた上清に等量のイソプロパノールと酢酸ナトリウム 溶液(最終濃度0.3M)を加えた後遠心(4℃,12,000g, 5分間)し、上清を破棄したのち75%エタノール溶液 で洗浄をおこなった.得られたペレットに500µLの 10µg/mL RNase・TE20溶液を加え、37℃で振盪しなが ら30分間反応させた後、300µLの20%ポリエチレング リコール(PEG)6000を加えた.混和後遠心(4℃, 12,000g,5分間)し、上清を破棄したのち75%エタノー ル溶液で洗浄をおこない、得られたペレットを10mM トリス塩酸緩衝液・1mM EDTA(TE)溶液に溶解した. バルク DNA については、残渣除去後の糞便溶液を遠心 せずに、同様の行程で抽出をおこなった.

RNA 抽出は、残渣を取り除いた糞便 500 mg を遠心 (4℃, 12,000g, 10 分間)して得られた細菌ペレットに ついて、ISOSPIN Fecal DNA (ニッポンジーン社)の プロトコルを改変して行った。細菌ペレットを700 µL の FE1 buffer と 100 µL のフェノール・クロロホルム・ イソアミルアルコールで懸濁し、FastPrep (MoBio 社) を用いてビーズ破砕を行った(ドライアイスによる冷温 化で 6 m/s, 40 秒のサイクルを 3 回).ビーズ破砕後遠心 (4℃, 10,000 g, 10 分間)を行い、上清 500 µL を回収 した後、Rneasy MINI kit (QIAGEN 社)を用いて RNA の精製を行い、得られた RNA は RNaseOUT (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて -20℃で保管した。

メタゲノム・RNA シークエンス

ショートリード・メタゲノムシークエンスにおいて、 Accel-NGS 1S Plus DNA(Swift Bioscience 社)を使用 してライブラリを作製した. RNAシークエンスにおい ては、Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus を用いてライブラリを作製した. 得られたライブ ラリについて、NovaSeq(Illumina 社)を用いて 150bp のペアエンド・シーケンスを行った. 得られた逆鎖リー ドの先頭 15bp をトリミングした後、ParDRe(González-Domínguez & Schmidt, 2016)を用いて重複リードを取 り除いた. 次に fastp(Chen *et al.*, 2018)を用いて平均 QV が 20 未満、またはリード長が 50bp 未満、あるいは 末端の QV が 20 未満であるリードを除去した. 最後に、 ヒトゲノム (hg38)に minimap2 (Li, 2018)を用いてマッ ピングし、マッピングされなかったリードを後の解析に 用いた.

ロングリード・メタゲノムシークエンスにおいては, VLP から得られた DNAを multiple displacement amplification (MDA)によって増幅後, SMRTbell ライブラリ (PacBio 社)を作製し, Sequel II (PacBio 社) によってロングリー ド・シーケンスを行った.得られたリードからCCS (https://github.com/PacificBiosciences/ccs)を用い てhigh fidelity (HiFi)リードを作製し(パラメータ: -min-passes 3, -min-rq 0.95),最後にSACRA (Kiguchi *et al.*, 2021)を用いてキメラ・リードを補正し、後の解 析に用いた.

メタゲノムアセンブリとファージゲノムの構築

VLP およびバルク DNA から取得したフィルター通過 済ショートリードと、VLPから得たキメラ補正済ロング リードを用いて、hybridSPAdes (Antipov et al., 2016)を 使用してハイブリッド・アセンブリを行った (パラメー タ:-pacbio). アセンブルされたコンティグから, 長さ が4kb 未満または virsorter2 (Bin et al., 2019) のスコ アが0.9未満のものを除去した後、構築したプラスミド データベース (RefSeg プラスミド release 202 および報 告済の71個のプラスミド(Suzuki et al., 2019)に対して minimap2でマッピングを行い (パラメータ:-asm20), 相同性が70%以上、カバレッジが10%以上であるコン ティグを除去した. 得られたコンティグに対し, prodigal (Hvatt *et al.*, 2010)を用いて Open reading frame (ORF) を予測し、プラスミドでよくみられる Clusters of Orthologous Genes (plasmid-enriched COGs) (Suzuki et al., 2019) に対して diamond を用いて相同性検索を行 い (パラメータ:--more-sensitive), アミノ酸同一性お よびカバレッジが50%以上で、plasmid-enriched COGs にアラインメントされる ORFを1つ以上含むコンティ グを除去した. 除去後のコンティグに対し. RNAmmer (Lagesen et al., 2007)を用いてリボソーム RNA(rRNA) 細菌マーカー遺伝子と, fetchMG (Milanese et al., 2019) を用いて細菌マーカー遺伝子をそれぞれ予測し、これら を1つ以上含むコンティグを除去した. 最後に CheckV (Navfach et al., 2021) を用いて汚染度を評価し、汚染 度が10%以上であるコンティグを除去した.

ファージゲノムの分類と宿主予測

過去の報告(Kiguchi et al., 2021)と RefSeq(release 212)から構築したファージゲノムに対し,minimap2 を用いて相同性検索を行い(パラメータ:-asm20),相 同性 95%以上・カバレッジ 85%以上でアラインされる コンティグを既知のファージゲノムとして分類した.メ タゲノム解析で使用したショートリードを,bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012)を用いてファージゲノム にマッピングし,マッピングされたリード比が0~5%, 35~50%のコンティグをそれぞれ一本鎖(ss)DNA, 二本鎖(ds)DNAファージとして分類した.ファージ の生活環予測には BACPHLIP(Hockenberry & Wilke,

亙

2021)を用い, それぞれのスコアが 0.8 以上のものを溶 菌・溶原性ファージとして予測した.

次に得られたファージゲノムについて, dRep (Olm et al., 2017)を用いて相同性 95%・カバレッジ 85% でクラ スタリングを行い (パラメータ:--ignoreGenomeQuality, --S_algorithm ANImf, -coverage_method larger), viral operational taxonomic units (vOTUs) を作製した. また vConTACT2³⁶を用いて Viral cluster (VC)の分類を行っ た. vOTUの代表配列について, RefSeg (release 21) を参照し, crAss-like, Lak, Microviridae, および Inoviridaeへの分類を行った. また本研究で得られた細 菌コンティグ, GTDB (r207) (Parks et al., 2021) の染 色体,および高品質ビン(完全性>90%,汚染度<5%) (Pasolli et al., 2019)からPILER-CR (Edgar., 2007)を使 用して clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) スペーサー配列を取得し, 短い (<10bp) および長い(>50bp) スペーサーを除去した. 得られた CRISPR スペーサー配列について, blastn を用 いて (パラメータ:-task blastn-short) ミスマッチ2未 満および95%以上の相同性・カバレッジでアライメン トされるファージを同定し、宿主予測を行った.

細菌・ファージ組成比の算出

バルクDNAから得られたフィルター通過済のショート リードのうち100万リードを使用して,mOTU (Milanese et al., 2019) によって菌組成を同定した. 少なくとも 1つのサンプルで相対存在量が0.1%を超える mOTUを その後の解析で用いた、ファージの組成分析では、バル ク DNA から得られたフィルター通過済ショートリード のうち1800万リードについて, bowtie2を用いてマッピ ングを行い、相同性が95%以上・カバレッジが50%以 上で各 vOTU にマッピングされたリード数を, コンティ グの長さで正規化して存在比を算出した. 菌組成と同様 に、少なくとも1つのサンプルで相対存在量が0.1%を 超えvOTUを解析に用いた.シャノン指数とVC 数の算 出とメタデータとの冗長性分析には Rstudio と Rの vegan パッケージ, Bray-Curtis 距離の算出には vegdist パッ ケージ, 主座標分析にはBray-Curtis 距離を基にした cmdscale パッケージをそれぞれ使用した.

細菌叢・ファージ叢メタゲノムの機能解析・メタボロー ム解析

得られたファージゲノムの ORF について, eggNOG データベース (バージョン 5.0.2) に対して eggNOG mapper (バージョン 2.1.5) を用いて相同性検索を行い, E 値が 10^{-10} 未満でアライメントされるものについて Kegg Orthology (KO) のアノテーションを行った. アライメ

ントされた ORF のリード数は各コンティグ長で正規化 し、相対比の算出に用いた、細菌叢とファージ叢を含む マイクロバイオームの機能解析について、両者のORF を抽出しCD-HIT(Li&Godzik. 2006)を用いて、相同 性95%以上・カバレッジ90%以上でクラスター化し,非 冗長 ORF を得た.得られた非冗長 ORF について,バル ク DNA から得られたフィルター通過済のショートリー ドのうち 900 万リードを, bowtie2 を使用してマッピング を行い、相同性95%以上でマッピングされたリードに ついて, ORFの長さで補正した後, featureCounts (Liao et al., 2013) を用いて存在相対比を算出した。KOの相対 存在比は,各KOのORFの相対存在比をすべて合計して 算出し、細菌叢とファージ叢それぞれで0.1%以上の相 対存在比をもつKOを解析に用いた. また cluster Profiler (Wu et al., 2021)を用いて、KEGGパスウェイとモジュー ルを取得した.メタボローム解析は(Takeuchi et al., 2023)の方法を用いて行った.

コバラミンに関わるファージの転写活性の同定と解析

コバラミン (coenzyme B12, CoB12) に関わる機能 を保持する糞便 RNA から得られたフィルター通過済の ショートリードについて, bowtie2を用いてマッピング を行い, 相同性 95%以上でマッピングされ, マッピン グされた領域のカバレッジが 50%以上であるファージ ゲノムを, 転写活性ファージとして予測した. マッピン グの結果とファージゲノムの視覚化はそれぞれ IGV (Robinson *et al.*, 2011) と Proksee (Grant *et al.*, 2023) を用いて行った.

MS 病態様 EAE モデルマウスを用いた実験

Tyzzerella nexilis の A1・B1 株を YCFA 培地・嫌気条件 下で培養した後、5から7週齢の野生型 C57BL/6メスの 無菌マウスに培養液を投与し、A1・B1 株それぞれが定着 したマウスを作製した. 菌液投与から2週間後に、200mg の MOG ペプチド、1mg の熱処理した Mycobacterium tuberculosis H37RAをフロイント完全アジュバンドと一 緒に、首の後ろに注射した. さらにその日とその2日後 に 400ng の百日咳菌由来毒素を投与し、EAE を誘導し た. EAE の臨床スコアは毎日計測し、最も重い状態で ある5に達した時点でマウスを安楽死させた.

結 果

ファージゲノム・カタログの解析

メタゲノムアセンブリの結果, 6,185のファージゲノ ムが得られ, それらは3,651のvOTU (種レベルに相当), 1,278のVC (属レベルに相当)に分類された. 同定され たファージゲノムの平均長は50,000 bp 程であったが, 最大ゲノム長は450,000 bp 以上であった(Fig.2a).構 築したファージゲノム・データベースへの相同性検索の 結果,約2/3 が未知のファージゲノムであることが示唆 された(Fig.2b).ファージゲノムがどのDNA由来であ るかを確認すると,約2/3がVLPのDNA由来であり, 残りはバルクDNA由来であった(Fig.2c).ファージ ゲノムの構造を予測したところ,環状と線状ゲノムの割 合はほぼ一緒であった(Fig.2d).ファージの形態を予 測したところ、二本鎖 DNAファージが 77.7%を占めて おり、一本鎖 DNAファージは 21.0%であった(Fig. 2e). ファージの生活環を予測したところ、溶菌ファージが 40.1%であるのに対し、溶原性ファージが 45.7%を占め ていた(Fig. 2f).宿主予測を行ったところ, Bacteroides, Phocaeicola, Parabacteroides, Faecalibacterium, Prevotella といった属が宿主と推定され、約 50%以上が構築した パイプラインによって推定が可能であった(Fig. 2g).





(a-f) Summary of observed phage genomes in genome size (a), novelty (b), resource (VLP or bulk) (c), topology (d), type (single strand (ss) or double strand (ds) DNA) (e), and life cycle (virulent or temperate) (f). (g) Composition of estimated host bacteria in genus-level.



Figure 3 Comparison of phageome between HC and MS patients.
(a) Summary of alpha-diversity in observed number of viral clusters (VCs) and Shannon's diversity.
(b) Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance among HC and MS patients (p*<0.05).
(c) Redundancy analysis between phageome and metadata.

MS患者における腸内ファージ叢の解析

α多様性について、HC、RRMS、SPMS間で観測され たVC数、および多様性指数であるシャノン指数を比較し た結果、各群間での有意な差はみられなかった (Fig. 3a). 一方で、 β 多様性について Bray-Curtis 距離を基にした 主座標分析を行ったところ、HC-SPMS間、RRMS-SPMS 間で有意差がみられ (p<0.05)、HC-RRMS間でも差がみ られる傾向であった (p=0.06) (Fig. 3b). 各メタデータ (MSの有無、BMI、性別、治療の有無、年齢)との冗 長性分析を行ったところ、ファージ叢構造の差に最も寄 与する有意な傾向がみられたのは MS の有無であった (p=0.08) (Fig. 3c). β 多様性に HC-RRMS間、HC-SPMS 間で有意な差がみられたことから、腸内ファージ叢 dysbiosis が MS 患者で発生していることが示唆された.

MS 患者における腸内細菌とファージの関連性

各 VC について、HC・RRMS・SPMS 群における相対 存在比の比較を行ったところ、HC 群で有意に多く/少 なく存在する VC を同定した(Fig.4a). MS 群で有意 に少なく存在する VC のうち、VC0062 と VC0973 は Faecalibacterium を宿主としていることが推定され、 かつ dsDNA の溶原性ファージであることが示唆さ れた(Fig.4a). Bacteroides、Phascolarctobacterium、 Faecalibacterium、Parabacteroides について HC・RRMS・ SPMS 群における相対存在比の比較を行い、これら を宿主とするファージとの関係性を解析したところ、 Faecalibacteriumに感染する VC0062 と VC0973 は RRMS の段階で有意に減少している(p<0.01)一方、 Faecalibacterium 自体は SPMS の段階でのみ有意に減少 していることが判明した(p<0.001)(Fig.4b). VC0062 と VC0973 のゲノムの解析を行ったところ, Shikimate pathway (M0022) といった芳香族アミノ酸生合成に関わる, 基礎的な代謝に関連する遺伝子をコードしていた (Fig.4c).

MS 患者におけるファージ機能遺伝子組成の違い

ファージ叢のメタゲノムデータから機能遺伝子の予測 を行い、その相対組成比の比較をHC・RRMS・SPMS 間で行ったところ、HC-RRMS間とHC-SPMS間に共通 して、CoB12生合成遺伝子の発現量が有意に減少して いた(Fig.5a).またCoB12に関わるKOの総量を比較 すると、HC-RRMS間・HC-SPMS間でそれぞれ有意に 減少していた(Fig.5b).CoB12と臨床スコアである EDSSの関連性を解析したところ、CoB12生合成遺伝子 量とEDSSが負に相関する傾向にあった(スピアマン相 関係数-0.26、p=0.06)(Fig.5c).またCoB12生合成 遺伝子量と全脳体積が有意に正に相関していた(スピア マン相関係数0.28、p<0.0001)(Fig.5d).メタボロー ム解析の結果、CoB12生合成遺伝子量とプロピオン酸 との間に有意な正の相関がみられ(p<0.001)、他の代 謝産物とは相関がみられなかった(Fig.5e).

また、ファージ叢のメタゲノム解析から、CoB12 生合 成遺伝子を保持するファージが26 個特定され(Cob_01 ~26),これらの宿主や生活環は多岐にわたっており、 4つの異なる細菌・古細菌門に感染していた(Fig.5f). RNAシークエンスにより得られたリードをこれら26 個 のファージゲノムにマッピングすると、4つのファージ ゲノム(Cob_03,04,16,17)にこれらがマッピング されたことから、これら4つのファージは腸内における 転写活性があることが確認された.



Figure 4 Relationship between phages and their host bacteria

(a) Heatmap of existence of viral clusters (VCs) which enriched and depleted in HC (*p<0.05, p**<0.01).
(b) Relative abundance of viral clusters and their host bacteria among HC and MS patients (*p<0.05, p**<0.01). (c) Genome structures of VCs which host genera was estimated *Faecalibacterium*.



Figure 5 Relationship between phageome and coenzyme B12

(a) Volcano plot of expression of HC-enriched and depleted genes. (b) Total relative abundance of coenzyme B12 biosynthetic KOs among HC and MS patients (*p<0.05, p**<0.01). (c-e) Correlation between coenzyme B12 biosynthetic genes and (c) EDSS score, (d) whole brain volume. (e) Heatmap of correlation between coenzyme B12 biosynthetic genes and metabolites (p***<0.001). (f) Heatmap of relative abundance of 26 VCs which had coenzyme B12 biosynthetic genes.

MS 患者腸内細菌叢の解析

腸内細菌叢のメタゲノム解析において, RRMS-SPMS 間の種レベルの組成比の比較を行ったところ, SPMSで 有意に増加している菌種が5つあった(Fig.6a). それ らのうち Tyzzerella nexilis (T. nexilis) は HC・RRMS 群で 約 30%であったのに対し, SPMS 群の約 70%に分布し, またその存在比は HC・RRMS 群に比べて有意に高かっ た(Fig.6b). T. nexilis は 2 株存在しておりそのうちの B 株のみが, SPMS 群において有意に増加していること が確認された(Fig.6c). さらに単離した A・B 株を MS 様病態を呈する EAE モデルマウスに投与すると、神経 障害の指標である EAE 臨床スコアが B 株投与群におい て上昇する傾向がみられた(Fig.6d).また大腸粘膜固 有層と中枢神経に存在する Th17 細胞の量的比較を行う と、A 株投与群において無菌マウス群よりも有意に増加 していたが、B 株投与群はA 株投与群よりも有意に増加 していた(Fig.6e).以上の結果から腸内において T. nexilis B 株が増加することで、MSの病態の進行に寄与 する可能性が示唆された.





(a) Volcano plot of relative abundance of SPMS-enriched bacteria (*p < 0.05). (b) Prevalence and relative abundance of *T. nexilis* among HC and MS patients. (c) Relative abundance of *T. nexilis* strain A and B among HC and MS patients. (d) Time course data of EAE clinical scores among germ free and *T. nexilis* strains-fed mice. (e) Comparison of Th17 cells among germ free and *T. nexilis* strains-fed mice in lamina propria (LP) and central nervous system (CNS).

須田 亙



Figure 7 Analysis of prophage in *T. nexilis* strains (a) Heatmap of number of total genes, virulent genes, insertion sequences, prophages and integrative and conjugative elements (ICEs) among *T. nexilis* 6 strains and its type strain. (b) Image of mapping reads from mitomycin treated *T. nexilis* strain B1 medium to its genome. Arrow shows active prophage region of *T. nexilis* strain B1.

T. nexilis の株間におけるゲノム解析

T. nexilisのゲノム解析を進めたところ、A・B株それ ぞれのクラスターに属するゲノムが3つずつ確認され た. これら6つのゲノムとT. nexilis基準株との比較ゲ ノム解析をおこなったところ、B株クラスターに属する 3つのゲノムにおいて、遺伝子の総数・病原性遺伝子数・ 挿入配列数・溶原性ファージ領域の数・integrative and conjugative element (ICE)の数が、他4つのゲノムに 比べて増加していた(Fig.7a).最後に単離したB株に マイトマイシン処理を施した後、ゲノムシークエンスを 行い、B株ゲノムへリードをマッピングしたところ、B 株ゲノム中に他の領域よりも高い深度でマッピングされ る領域があった(Fig.7b). さらにこの領域内に株特異 的に細胞壁を破壊し溶菌させるエンドライシン遺伝子が 存在していた.

考 察

本研究では、ヒトの腸内微生物におけるファージゲノ ムをキュレーションするための新しいパイプラインを開 発し、高度に精製されたファージゲノムカタログを作成 した.本アプローチにより、ファージゲノムの様々な特 徴に基づいた正確なファージ組成を得ることが可能と なった.

本研究で示された MS 患者における腸内ファージ叢の 全体構造の有意な変化は、以前の報告とも一致した (Thirion, et al., 2023). ここで同定された注目すべき特 徴のひとつは、MSにおける Faecalibacterium に感染する 溶原性ファージの減少である (Fig.4a). SPMS 患者の腸 内における Faecalibacterium の減少は、世界的に確認さ れている (Takewaki et al., 2020, Cox et al., 2021, iMSMS Consortium 2022). また、そのユニークな代謝的特徴と 腸内ホメオスタシスへの高い影響も強調されている (iMSMS Consortium 2022). 本研究では、RRMS と SPMS の両 方で Faecalibacterium 感染ファージの存在量が有意に減 少していたが、SPMS でのみ Faecalibacterium の存在量が 有意に減少していた (Fig.4b). 一人の MS 患者から得られ た経時的なデータではないが、Faecalibacterium 感染溶 原性ファージの減少が Faecalibacterium 自体の減少に先行 するこの所見は、溶原性ファージが Faecalibacterium の成 育に有利な遺伝子を共有している可能性を示唆した.

メタボロームの解析によって、RRMS および SPMS 患者の糞便中のプロピオン酸の有意な減少が観察された (Fig.5b, c). プロピオン酸の長期的な補給は、MS患者 のさまざまな臨床パラメータに有益な効果を示している (Duscha et al., 2020). MS 患者におけるプロピオン酸の 減少は、プロピオン酸生合成経路の減少を想起させるが、 MS 患者のファージ叢とバクテリア叢の両方において、 その経路の顕著な減少は見られなかった. さらに、プロ ピオン酸生合成経路で測定されたすべての代謝物の中 で、コエンザイム B12 を用いた触媒反応後の代謝物(プ ロピオン酸)のみが MS 患者で減少していた(Fig.5e). 他の機能的経路の変化がプロピオン酸産生に関与してい る可能性は否定できないが、これらの所見は、コエンザ イム B12 の生合成能が腸内プロピオン酸生合成のボトル ネックになっている可能性があることを示している. 一 部の細菌では,補酵素 B12 が濃度依存的にプロピオン酸 生合成を促進することが報告されており,この仮説が支 持されている (Strobel, 1992, Chen, and Wolin, 1981).

また、コエンザイムB12生合成遺伝子をコードする 26のファージゲノム (CoB12ファージ) は4つの異な る細菌・古細菌門に感染しており、CoB12ファージは ヒトの腸内で様々な微生物分類群とともに生息している ことが示された(Fig.5f).以前の研究では、特定の細 菌株がゲノムアイランドとプラスミドに補酵素B12生 合成遺伝子を持つことが報告されており(Morita et al., 2008, Qi et al., 2023), コバラミントランスポーターは結 合エレメント上にコードされていることが知られている (Frye et al., 2021). これらの結果は、コエンザイム B12 関連遺伝子がファージを含む染色体外遺伝因子に よって多様な腸内細菌間で水平移動していることを示唆 している.特定の代謝産物の生合成には関連遺伝子の発 現が必要であるが.ファージにコードされた補助遺伝子 が機能的に活性化し、代謝産物生産に寄与しているかど うかは、これまで完全には解明されていなかった、我々 はメタトランスクリプトーム解析から, 転写活性のある CoB12ファージの例を見つけることができた(Fig.5f). 4つの転写活性ファージのうち3つが溶原性ファージと して予測されたことを考慮すると、CoB12ファージは プロファージとして機能的に活性な遺伝子を発現するこ とで、宿主の補酵素B12生合成能力を拡大できること が示唆された.

また、細菌叢の解析では、MS群に有意に高い存在量 を示す菌種 Tyzzerella nexilis を同定した. さらに T. nexilis はA株およびB株の2つのクラスターが存在し、その うちB株のみがMSの増悪、すなわちSPMSへの移行 に関連することを特定した(Fig.6c, d). このB株はA 株やType strainのT. nexilis に比し顕著に多くのプロ ファージを含む水平伝搬領域をゲノム中にもつという特 徴があきらかとなった.これは、細菌種自体が増悪因子 ではなく、外部からファージを含む染色体外遺伝因子に よって増悪トリガー因子がもたらされた可能性を示唆し ている. また, B株のマイトマイシン処理で誘導される プロファージ領域は、エンドライシンをコードしている ことから、これらのエンドライシンは活性をもつと考え られる.エンドライシンは、細胞壁の構造に基づいて株 特異的な活性を持つため (Schmelcher *et al.*, 2012). そ の溶原性ファージ中に存在するエンドライシンを合成・ 投与するなど、MSの病態を進行させるB株を特異的に 除去する技術を確立することで MSの病態進行を阻止で きる可能性が示された.

全体として、本研究は MS における腸内ファージ叢の 有意な変化を発見し、腸内細菌叢の代謝能力に対する腸 内ファージの潜在的な役割について示唆した. さらに、 本研究は MS 病態の進行に関連する細菌株の同定とその 除去に関する洞察を提供する.ファージと細菌との相互 作用を理解することは、MS や他の慢性疾患における腸 内細菌叢と病態生理との複雑な相互作用を解明する上で 極めて重要である.今後これらの知見に基づく治療戦略 の開発が期待される.

要 約

腸内微生物叢は宿主の生理状態に大きな影響を及ぼす ため、その制御技術の開発は喫緊の課題である.また腸 内には細菌数の2倍かそれ以上のファージが存在すると 考えられ、疾患と腸内ファージ叢の関連が報告されつつ あるが、腸内ファージ叢の全体構造や疾患との関連はい まだ不明な点が多い.本研究では健常日本人および多発 性硬化症(MS)患者の腸内ファージ叢のメタゲノム解 析によって、完全長ゲノムの構築や全体構造の理解を深 め、腸内ファージ叢と疾患との関連性およびその病態制 御の可能性を探った.

再発・寛解型 MS・進行性 MS・健常者ボランティア 計90名から糞便を採取し,DNA・RNAを抽出したのち 短鎖型・長鎖型シークエンサーを用いたショットガンメ タゲノムおよび RNAシークエンシングを行った.得ら れたリードを用いてアセンブリ後,クオリティチェック を行い,高品質コンティグを得た.このコンティグに対 して各種ツールを用いて分類を行い,完全長または完全 長に近いファージゲノムを得た.得られたファージゲノ ムについて遺伝子機能解析・宿主推定等を行い,ファー ジの特徴をとらえるとともに,遺伝子発現量と疾患の関 連性を確かめた.

ショートリード・ロングリードを用いたアセンブリに よって、6,185 個の完全長に近いファージゲノムを得た. 得られたファージゲノムについて既存のファージゲノ ム・データベースへ相同性検索を行うと、半数以上が未 報告の新規なゲノム配列をもつファージであった. 宿主 推定のパイプライン処理をおこなった結果、約半数の ファージについて宿主を推定することが可能だった. こ れらのファージをリファレンスとして MS 患者の腸内 ファージ叢の解析を行った結果、疾患によって有意に減 少するファージおよびファージ由来の機能(コバラミン の生合成)を発見した. 一部の病原性腸内細菌種をマイ トマイシン処理し、活性化するアクティブな溶原性 ファージも発見した. さらに、これらのファージを利用 した病原細菌の制御についても検討を進めている.

亙

本助成で得られた研究成果の報告

原著論文

 Takewaki, D., Kiguchi, Y., Masuoka, H., Manu, M., Raveney, B. J. E., Narushima, S., Kurokawa, R., Ogata, Y., Kimura, Y., Sato, N., Ozawa, Y., Yagishita, S., Araki, T., Miyake, S., Sato, W., Suda, W., Yamamura, T. *Tyzzerella nexilis* strains enriched in mobile genetic elements are involved in progressive multiple sclerosis. 2024. Cell Rep. 25, 114785.

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技術員に感謝の意を表 します.

文 献

- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J.S., *et al.* 2016. HybridSPAdes: An algorithm for hybrid assembly of short and long reads. Bioinformatics. **32**: 1009–1015.
- Bin, J.H., Bolduc, B., Zablocki, O., *et al.* 2019. Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. Nat. Biotechnol. **37**: 632–639.
- Chen, M., and Wolin, M.J. 1981. Influence of heme and vitamin

B12 on growth and fermentations of *Bacteroides* species. J. Bacteriol. *145*, 466–471.

- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., *et al.* 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics. **34**: i884–i890.
- Cox, L.M., Maghzi, A.H., Liu, S., et al. (2021). Gut microbiome in progressive multiple sclerosis. Ann. Neurol. 89, 1195–1211.
- Duscha, A., Gisevius, B., Hirschberg, S., *et al.* 2020. Propionic acid shapes the multiple sclerosis disease course by an immunomodulatory mechanism. Cell. 180: 1067–1080
- Edgar, R.C. 2007. PILER-CR: Fast and accurate identification of CRISPR repeats. BMC Bioinformatics. 8: 18.
- Frye, K.A., Piamthai, V., Hsiao, A., et al. 2021. Mobilization of vitamin B12 transporters alters competitive dynamics in a human gut microbe. Cell Rep. 37, 110164.
- González-Domínguez, J. & Schmidt, B. 2016. ParDRe: faster parallel duplicated reads removal tool for sequencing studies. Bioinformatics. 32: 1562–1564.
- Grant, J.R., Enns, E., Marinier, E., *et al.* 2023. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. **51**: W484-W492.
- Haghikia, A., Jörg, S., Duscha, A., et al. 2015. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. Immunity. 43: 817–829.
- Hockenberry, A.J. & Wilke, C.O. 2021. BACPHLIP: Predicting bacteriophage lifestyle from conserved protein domains. PeerJ. 9: e11396.
- Hsu, B.B., Gibson, T.E., Yeliseyev, V., et al. 2019. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model. Cell Host Microbe 25: 803–814.

アミノ基キャリアタンパク質を介した生合成システムによる 化合物構造多様性創出の分子機構に関する研究

西 山 真

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Molecular mechanism for the structural diversity in natural products synthesized by amino-group carrier protein-mediated biosynthetic system Makoto Nishivama

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

In a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, lysine was found to be biosynthesized using a novel carrier protein (amino-group carrier protein: AmCP). It has been becoming clear that AmCP system is used for the biosynthesis of non-proteinogenic amino acids in various bacteria, including actinomycetes. In this study, we searched for novel natural products synthesized from non-proteinogenic amino acids that are biosynthesized through the AmCP system, and analyzed the biosynthetic pathways and mechanisms to expand the structural diversity of natural products.

Key words: amino-group carrier protein, biosynthesis, non-proteinogenic amino acid, secondary metabolites, *Streptomyces*

緒 言

ヒトをはじめ哺乳類で必須アミノ酸として知られるリ ジンは、植物や細菌ではアスパラギン酸を初発物質とし てジアミノピメリン酸 (DAP)を経由する DAP 経路で、 カビや酵母では2-オキソグルタル酸を初発物質として 2-アミノアジピン酸 (AAA)を経由する AAA 経路で合 成されることが知られていた (Vogel, H.J., 1959) (Vogel, H.J., 1964) (Broquist, H.P., 1971). 我々は、高度好熱性 細菌 *Thermus thermophilus* が細菌であるにも関わらず AAAを経由してリジンを生合成することを見出した (Kobashi, N. *et al.*, 1999) (Nishida, H. *et al.*, 1999). *T. thermophilus* のリジン生合成系として特筆すべきこと は、生合成後半部の AAA からリジンへの変換はカビや 酵母とは全く違う代謝スキームによって合成が進むこと に加えて、その後半部分が AAAのアミノ基に LysWと 名付けたタンパク質が共有結合をしたまま生合成反応が

E-mail: umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者:吉田 彩子(東京大学大学院農学生命科学研究科).

進み. 最終段階でLvsW 部分が切り離されてリジンが生 成することである (Horie, A. et al., 2009). 幾つかの生合 成酵素, LvsW単体, 生合成酵素とLvsWの複合体のX 線結晶構造解析を行った(Yoshida, A. et al., 2015) (Shimizu, T. et al., 2016). その結果, まず LysW は金属 を結合する球状ドメインとそれに引き続くC末端アー ム領域から構成されており、C 末端のグルタミン酸残基 の側鎖にAAAのアミノ基が結合していることが分かっ た. 生合成酵素とLysWの複合体の構造解析の結果, 生 合成酵素の分子表面の正に帯電した領域に強く負に帯電 した LysWの球状ドメインが静電相互作用していること が明らかになった.また、生合成酵素の機能解析を行っ た結果, LysW が結合していない基質を用いた場合には 反応速度が著しく低下した. これらの結果は、LysWが 共有結合した基質を酵素へ運ぶキャリアタンパク質とし て機能することを意味している. キャリアタンパク質は. 脂肪酸やポリケチド化合物、非リボソーム型ペプチドの 生合成に使われていることが知られている. これらの キャリアタンパク質はホスホパントテン酸を特定のセリ ン残基に共有結合しホロ化され、付加したホスホパンテ

テイニル基のチオールに基質のカルボキシ基をチオエス テル結合で連結したかたちで、酵素に基質を提供する (Majerus, P.W. et al., 1964) (Stachelhaus, T. et al., 1996). LvsWの場合には、タンパク質のC末端アームがフレキ シブルな構造を取り、その末端にあるグルタミン酸の側 鎖のカルボキシ基で基質のアミノ基とイソペプチド結合 を形成することから、これまでになかったタイプのキャ リアタンパク質であると言える. そこででこのような キャリアタンパク質をアミノ基キャリアタンパク質 (amino-group carrier protein: AmCP) と名付けた. AmCP を介した生合成システムは、好熱性アーキアにおいては リジンだけでなく、アルギニン(オルニチン)の生合成 にも用いられていることも明らかになっている(Ouchi, T. et al., 2013) (Yoshida, A. et al., 2016), その後, 様々な 生物のゲノム情報が公開されたことから、AmCPをコー ドする遺伝子を query としてゲノムマイニングを行った ところ, DAP 経路でリジンを生合成することが分かっ ている細菌にもAmCPの遺伝子があることが判明した. 中でも多くの Streptomyces 属の放線菌に類似タンパク質 をコードする遺伝子が見出された. Streptomyces 属細菌 は高い二次代謝産物の生合成能を有することが知られて いることから、AmCPが二次代謝産物の生合成に関わる 可能性が考えられ、どのような役割を担っているかに興 味が持たれた.そうした放線菌の一種. Streptomyces sp. SANK 60404 (以下, SANK 株) では AmCP が非タンパク 質性アミノ酸である 2.6-diamino-5.7-dihvdroxyheptanoic acid (DADH)の生合成に関わっていることが明らかに なった (Hasebe, F. et al., 2016). SANK 株ではグルタミ ン酸はAmCPのC末端にロードされた後、側鎖のリン 酸化, 還元がおこり, AmCP-γ-glutamate semialdehyde (AmCP-GSA)が生成される. そのアルデヒドにトラン スケトラーゼが作用することで2炭素の増炭反応が起 こり、付加されたケト基がアミノ基転移によりアミノ 基に置換され、AmCP-DADHが生成される. 最終的に AmCP-DADH 間のイソペプチド結合が切断され, DADH がリリースされる. このようにして生じた DADH は修飾 後、非リボソームペプチド合成酵素上で1-アザビシクロ [3.1.0] ヘキサン環 (アザビシクロヘキサン環) 含有アミ ノ酸へと変換された後、バリンとの縮合を経て、最終的 にバザビタイドAと名付けたジペプチドへと変換される.

本稿では、2環性のアザビシクロヘキサン環の環構造 の一つであるアジリジン環形成を触媒する新規なアジリ ジン環酵素の発見とアジリジン環形成の反応機構の詳細 を解明した研究、さらにはアジリジン形成前の6位のア ミノ基の立体異性創出機構を解明した研究について詳述 する.

実験方法

真

細菌株とプラスミド

遺伝子操作用の生化学試薬と酵素は、TaKaRa Bio, TOYOBO,およびBio-Rad Laboratoriesから購入した. 液体クロマトグラフィーの溶離液添加剤は、Sigma-Aldrichおよび富士フイルム和光純薬株式会社から購入 した.遺伝子操作に使用したオリゴヌクレオチドは、 Operon BiotechnologiesおよびFASMACから購入した. 他のすべての試薬は、富士フルム和光純薬株式会社、関 東化学、およびナカライテスクから購入した.

SANK株における vzb21, vzb12, vzb10, vzb11, vzb13 遺 伝子のインフレーム欠失

Streptomyces sp. SANK 60404 株変異体 (それぞれ vzb21, vzb12, vzb10, vzb11, または vzb13 遺伝子を欠く) を以下のように構築した.2種類のポリメラーゼ連鎖反 応 (PCR) を行い, vzb21 遺伝子の上流及び下流領域 (そ れぞれ2kb)を増幅した。増幅された断片の塩基配列 検証後,正しい配列を持つ2つのフラグメントを pUC118-aac(3)IVにクローン化した。得られたプラス ミド p∆vzb21 を接合伝達により SANK 株に導入し vzb21 遺伝子をノックアウトした.この際、宿主として大腸菌 S17-1株を用いて、100mMのMgCl₂を含むM4培地の プレート上で接合を行った. 25µg/mLのアプラマイシ ンを添加したプレート上で増殖したコロニーを選択し. 形質転換体をTSB 培地中で2日間培養した.再生され たコロニーからアプラマイシン感受性コロニーを選択し たのち、PCRによりノックアウトを確認した.得られ たノックアウト変異体を SANK 60404 Δvzb21 と名付け た. それぞれ vzb12, vzb10, vzb11, または vzb13 を欠く 他の変異体も、同様の方法で構築した.

SANK 60404 ∆*vzb21*, ∆*vzb10*, および ∆*vzb11* における *vzb21*, *vzb10*, および *vzb11* の遺伝子相補

SANK 60404 $\Delta vzb21$, $\Delta vzb10$, および $\Delta vzb11$ の遺伝 子相補株を次のように作製した.各遺伝子は,適切なプ ライマーを使用して SANK 株のゲノムから PCR によっ て増幅した.プライマーは,リボソーム結合部位を含む 上流領域を持つ vzb21, vzb10, または vzb11 遺伝子を含 む DNA 領域を増幅するように設計した.増幅された DNA 断片を pSE1014の *lacZ* プロモーターの下流にク ローニングしたプラスミドを得たのち,それぞれ SANK 60404 $\Delta vzb21$, $\Delta vzb10$, および $\Delta vzb11$ を形質転換した. 遺伝子相補株として, $25 \mu g m L^{-1}$ のチオストレプトン耐 性株を選択した. *Streptomyces ficellus* における *fic27*のインフレーム遺伝 子破壊

Streptomyces ficellus JCM4946 株の fic27 を欠損した変 異体を、上記と同様の方法で構築した. p Δ fic27 は、プ ロトプラスト形質転換法を用いて S. ficellus に導入した. 遺伝子破壊は、適切なプライマーを使用した PCR によっ て確認し、得られた遺伝子破壊株を、S. ficellus Δ fic27 と名付けた.

vzb 遺伝子破壊株および遺伝子相補株の代謝物のLC-MS 分析

野生型 SANK株, vzb 遺伝子破壊株,および遺伝子相 補株を10mLTSB培地 (Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A., 2000) に植菌し, 30℃ で2日間振盪培養(300rpm)した.前培養物(1mL)を, 1gのXADTM7HPを含む 100mLのK培地 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 2001) に移し, さらに 27 °C で 振盪(180rpm)しながらさらに2または3日間培養した. 遺伝子相補株を、25µg mL⁻¹のチオストレプトンを添加 した培地で培養した. 培養液を 20,630×gで 10 分間遠心 分離し、得られた上清をメタノールで10倍に希釈した。 希釈したサンプルをさらに 20,630×gで 10 分間遠心分 離した. 上清を. UFLC Nexera システムを備えた高解 像度 Triple TOF 5600 システムに供した. サンプルは ACQUITY UPLC BEH HILIC $\neg \neg \land$, 130Å, 1.7µm, 2.1×50mm で分離した. LC 条件は以下のとおり. 移動 相A, H₂O+0.1% ギ酸. 移動相B, アセトニトリル +0.1% ギ酸. 流量 0.4 mL min⁻¹ で. 5 分間で 95~40 % B. 5分間で40% B, その後5分間で95% B. MS分析は, エレクトロスプレー イオン化をポジティブモードまた はネガティブモードで使用して実行した.

fic 遺伝子破壊株の代謝物の LC-MS 分析

S. ficellus と fic27 遺伝子破壊株を 10mL TSB 培地に植 菌し、30℃で3日間振盪培養(300rpm)した.前培養 物(1mL)を1gのXADTM7HPを含む 100mLの Fic-B 培地に移し、さらに 27℃で振盪(180rpm)しながら、 さらに3日間培養した.培養液を 20,630×gで 10分間遠 心分離し、得られた上清をメタノールで 10 倍に希釈し た.希釈したサンプルをさらに 20,630×gで 10 分間遠心 分離し、その上清を上記と同様の方法で分析した.

SANK 60404 Δ*vzb12* 変異株からの (5*R*,6*R*)-O⁷-スルホ DADH 単離

SANK 60404 Δ*vzb12* 変異体の単一コロニーを10mL TSB 培地に接種し,振盪(300rpm)しながら30℃で2 日間インキュベートした.前培養物(1mL)を,1gの XAD[™]7HPを含む100mLのK培地に植菌し、次いで振 盪(180rpm)しながら27℃で1日間インキュベートし た. 培養液を2,500×gで10分間遠心分離し、上清を回 収した. 上清のpHを約3に調整した. 遠心分離により 沈殿物を除去した後,上清を活性炭カラムに通し,素通 り画分と水洗画分を合わせた. 2N BaOH 水溶液の添加 により画分のpHを約10に調整した後、それらをギ酸 form で陰イオン交換カラム AG1-X8 に供した. 吸着され た化合物は、0~1Mのギ酸の直線勾配で溶出した. DADHを含む画分を合わせて濃縮した. 1N HCl水溶液 の添加により溶液のpHを約3に調整した後、それらを プロトン form で陽イオン交換カラム AG 50W-X8 (Bio-Rad) に供した. 吸着した化合物を0~1MのNH₃水溶 液の直線勾配で溶出し、DADHを含む画分を濃縮した。 残留物をJASCO Extrema HPLC システムを用いて CAPCELL PAK MGII (10×250mm) により分離した. LC条件は以下の通り:移動相A, H₂O+0.1%ギ酸. 移 動相B, アセトニトリル+0.1% ギ酸. 2%B, 流速 10mL min⁻¹. 210nm でのUV 吸光で追跡した. DADH を含む画分から溶媒を真空中で除去し、凍結乾燥した. 4.8mgの(5R.6R)-O⁷-スルホDADHを0.8Lの培養ブロ スから白色粉末として得た.

SANK 60404 ∆*vzb10* 変異株からの (5*R*,6*R*)-*N*²-アセチル -0⁷-スルホ DADHの単離

上記と同様に変異株を培養し、培養上清を活性炭カラムに吸着させた.吸着した化合物を10~100%メタノールの直線勾配で溶離し、 $(5R,6R)-N^2$ -アセチル- O^7 -スルホ DADHを含む画分を合わせ、濃縮し、ギ酸形態で陰イオン交換カラムAG1-X8 (Bio-Rad)に供した.吸着した化合物は、0~1Mのギ酸水溶液の直線勾配で溶出した.同化合物を含む画分を合わせ、濃縮し、HPLCにより分離した.結果として、0.8Lの培養液から、6.9mgの精製 $(5R,6R)-N^2$ -アセチル- O^7 -スルホDADHを白色粉末として得た.

S. *ficellus* ∆*fic27* 変異株からの (5S,6S)-O⁷-スルホ DADH の単離

S. ficellus $\Delta fic27$ 変異株の単一コロニーを10mLの TSB 培地に植菌し、振盪(300rpm)しながら30℃で3 日間インキュベートした。前培養液(1mL)を、1gの XADTM7HPを含む100mLのFic-B 培地に植菌し、振盪 (180rpm)しながら27℃で4日間インキュベートした。 培養液を2,500×gで10分間遠心分離し、上清を回収した。精製スキームは上記(5R,6R)-O⁷-Zルホ DADHのも のと同様に行い、最終的に培養液1Lから24.5mgの (5S,6S)-O⁷-Zルホ DADHが淡黄色粉末として精製された。

真

NMR 測定

NMR スペクトルは ECA-600 分光計 (JEOL, Tokyo) を使用して取得した.¹H NMR スペクトルとすべての 2D スペクトルは 600 MHz で取得し,¹³C NMR スペクト ルは 150 MHz で取得した. サンプルを D₂O に溶解し, 5 mm NMR チューブに移し,測定した. すべての実験 は室温で行った.

組換え大腸菌からの Vzb21 の調製

vzb21 遺伝子を含む DNA 断片は, pRSF_Duet-1 にク ローン化し、大腸菌 Rosetta2 (DE3) に導入した. Vzb21 はN末端に(His)₆タグを有したかたちで生産される. 組換え大腸菌細胞を、50µg/mLのカナマイシンおよび 30µg/mLのクロラムフェニコールを添加した200mLの 2×YT 培地中で 37℃, 3時間培養した. 0.1mM IPTG を添加して、25℃で一晩培養した後、細胞を遠心分離 によって回収し, buffer A (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 20% glycerol) で洗浄した.細胞を破砕 した後、4℃で遠心分離(34,700×g, 20min)し、その 上清を Minisart シリンジフィルターに通し, Ni²⁺-NTA カラムに供した.カラムを buffer B(20mM Tris-HCl. pH 8.0, 150mM NaCl, 20mM imidazole, 20% glycerol) で洗浄し、吸着タンパク質をバッファーC(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 500mM imidazole, 20% glycerol) で溶出した. 溶出液は, VIVASPIN 10,000 MWCO PES 膜を使用して濃縮した. タンパク質 の濃度は Bio-Rad Protein Assay Dye Regent Concentrate を用いて測定した.

組換え Streptomyces lividans TK23 からの Vzb12 の調製

*vzb12*遺伝子を有する DNA 断片を, pSE101 にサブク ローニングした.得られたプラスミドを S. lividans TK23 に導入した.この場合,N末端に(His)₆タグを有する 組換え Vzb12 が産生される.S. lividans のプロトプラス ト形質転換は常法により行った.組換え S. lividans を $25 \mu g/mL のチオストレプトンを含む 500 mL の YEME$ 培地(Hopwood D, A., 1985)中で27℃で3日間増殖させた.細胞を遠心分離によって収集し,Vzb2と同じ方法で Ni²⁺-NTA 樹脂カラムを使用して組換え酵素を調製した.

組換え大腸菌からの Vzb10 および Vzb11 の調製

vzb10 遺伝子を pET Duet-1 にサブクローニングして, pET_Vzb10 を 得た.strep-*vzb11* 遺 伝子 断 片 を pET_ Vzb10 に挿入し,N 末端に (His)₆ タグを有する組換え Vzb10 およびN 末端に Strep タグを有する Vzb11 を発現 するための pET_Vzb10+StrepVzb11 を作製した.得ら れたプラスミドを含む大腸菌 Rosetta2 (DE3) を, 200 µg/mLのアンピシリン (Amp) および 30 µg/mLの Cm を添加した 200 mLの 2×YT 培地中で 37 \mathbb{C} , 3 時間 増殖した.次に, 0.1 mM IPTG を添加し,細胞をさら に 25 \mathbb{C} で一晩培養した.細胞を遠心分離によって回収 し, buffer D (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol)で洗浄した.得られた細胞の破砕液を 4 \mathbb{C} で遠心分離 (34,700×g, 20 min) し,その上清を Minisart シリンジフィルターに通し,Ni²⁺-NTA カラムに供した. カラムを buffer E (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 % glycerol) で洗浄し,結 合 タンパク質を buffer F (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10 % glycerol) で溶 出した.

組換え大腸菌からの Vzb9 および Fic25 の調製

vzb9 遺伝子の発現プラスミドは以前の研究のものを用 いた (Hasebe, F. *et al.*, 2016). *Fic25* 遺伝子を含む DNA 断片を pET Duet-1 にサブクローニングして, pET_Fic25 を得た. この発現系により, Fic25 は C 末端に (His)₆ タ グを有するタンパク質として生産される. 得られたプラ スミドを含む大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL に導入 し, 得られた形質転換体から Vzb9 および Fic25 を Vzb10·11 と同様に精製した.

Vzb21の酵素活性測定

100mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 0.5mM PAPS, 0.5mM DADH, 160µg の Vzb21を含む反応混合物を総量 100µL で調製した.反応混合物を 30℃で1時間インキュベー トし, 100µL のメタノールを加えて反応を停止させた. 得られた混合物を 20,630×g で 10分間遠心分離し,その 上清を UFLC Nexera システムを備えた高解像度 Triple TOF 5600 システムに供した.サンプルは ACQUITY UPLC BEH Amide カラム, 130Å, 1.7µm, 2.1×50mm で分析した. LC条件は次のとおり:移動相A, H₂O+0.1% ギ酸.移動相B,アセトニトリル+0.1% ギ 酸:流量 0.4mL min⁻¹で,5分間で 90~40% B,5分間 で 40% B,その後5分間で 90% B. MS分析は,ポジティ ブモードのエレクトロスプレーイオン化を使用して実 行した.

Vzb12の活性測定

50mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 5mM アセチル-CoA, 5mM (5*R*,6*R*)-*O*⁷-スルホ DADH, および 86µg の Vzb12 を含む反応混合物を総量 100µLで調製した.反応混合 物を 30℃で 2 時間インキュベートし,反応混合物 20µL にメタノール 180µLを加えて反応を停止させた.得られ た混合物を 20,630×g で 10 分間遠心分離した.サンプル は ACQUITY UPLC BEH HILIC カラム (130Å, 1.7 µm, 2.1×50 mm) に供した. LC-MS 分析は, 代謝産物分析 の方法で説明したものと同様に行った.

Vzb10・11 および変異体の活性測定

50mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 4mM (5R,6R)- N^2 -アセ チル- O^7 -スルホ DADH, および適量の共精製された Vzb10·11 または改変酵素を含む反応溶液を総量 50µLで 調製した.反応溶液を30℃で2時間インキュベートし, 反応溶液 20µLにメタノール 180µLを加えて反応を停止 させた.これを 20,630×gで10分間遠心分離したのち, 生成物を LC-MS で分析した.

NMR分析では、50mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 4mM (5R,6R)- N^2 -アセチル- O^7 -スルホ DADH, および 7.5 mg の共精製した Vzb10・11を含有する反応溶液 0.75 mLを マイクロチューブに添加した.反応溶液をゆっくり回転 させながら4℃で一晩インキュベートし、反応溶液中の 低分子化合物を VIVASPIN 10,000 MWCO PES 膜を使 用して酵素から分離した.濃縮した低分子化合物を MilliQ 水で洗浄し、凍結乾燥後、サンプルを D₂O に溶 解し、5 mm NMR チューブに移した.NMR分析は上記 のように実施した.

組換え大腸菌からのAziU3・U2の調製

N末端に (His)₆ タグを有する AziU3 およびN末端に strep タグを有する AziU2 を,上記の組換え Vzb10・11 の 場合と同じ方法で共精製した.セレノ-L-メチオニン (Se-Met) 置換 AziU3・U2 複合体も,組換え大腸菌 B834 (DE3) 株から調製した.Se-Met 置換 AziU3・U2 の調製 は以下のように行った.組換え大腸菌 B834 (DE3) 細胞 を,200 μ g/mLの Amp および 30 μ g/mLの Cm を加えた 100 mgの Se-Met を含む 400 mLのコア培地中で 37 ℃で 5時間培養した.0.1 mM IPTG を添加し,細胞をさらに 25 ℃で一晩培養した.Se-Met 置換 AziU3・U2 の精製は, 野生型 AziU3・U2 と同様の方法で行った.また,酵素溶 液を濃縮し,buffer Dを溶出液としてゲル濾過クロマト グラフィー (Superdex 200 pg) を行ったものを結晶化用 あるいは活性測定用サンプルとした.

AziU3・U2 の活性測定

50mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 適切な濃度の (5*S*,6*S*)-*O*⁷-スルホ DADH, および 100µg の共精製 AziU3·U2 ま たは改変酵素を含む反応溶液を総量 50µLで調製した. 反応溶液を 30℃で 2 時間インキュベートし,反応溶液 20µl にメタノール 180µLを加えて反応を停止させた. この溶液を 20,630×g で 10分間遠心分離したのち,生成 物を同様に LC-MS によって分析した.

Fic25 および Vzb9の活性測定

50mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 0.02mM PLP, 2.5-5mM 2-オキソグルタル酸, 15-20µgの Fic25または Vzb9を含む 50µL または 100µLの溶液に, 0.5-1mMの (5*R*,6*R*)-および (5*S*,6*S*)-*N*²-アセチル DADHを加えて反 応を開始した.反応は 30℃で 15h 行ったのち, 9倍量 のメタノールを添加することで反応を停止させた. この 溶液を 20,630×g で 10分間遠心分離したのち, 生成物を 同様に LC-MS によって分析した.

AziU3・U2の結晶化

AziU3・U2 複合体の結晶化は蒸気拡散法によって行 い、結晶は 10~20 mg/mL のタンパク質 1µLと等量の 14~22% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 3350, 200 mM ギ酸マグネシウム, pH 7.0 を混合し、20 \mathbb{C} で 1週間インキュベートすることで得られた. 基質を結 合した AziU3・U2・(5S,6S)- O^7 -スルホ DADH 複合体の調 製に関しては、ネイティブ AziU3・U2 の結晶を 7.7 mM AziU3・U2・(5S,6S)- O^7 -スルホ DADH を含むリザーバー 溶液に 5 分間浸漬した. リザーバー溶液としては、22 % (w/v) の PEG3350 および 200 mM のギ酸マグネシウム も含むものを用いた.

Fic25の結晶化も蒸気拡散法によって行い,結晶は 10mg/mLのFic251 μ Lと1.0mMクエン酸ナトリウム, 0.1Mイミダゾール,pH8.0を混合し,20℃で1週間イ ンキュベートすることで得られた.これに1mM PLPを 含む不凍溶液に浸すことによりPLP 結合型結晶を得た. Fic25・PLP-10'複合体構造は,化学合成したPLP-10'を 5mMの濃度でFic25を含む溶液に加えた1 μ Lのタンパ ク質溶液と1.1mMクエン酸ナトリウム,0.1Mイミダ ゾール,pH8.0を混合し,20℃で2-3日間インキュベー トすることで得られた.

データの収集と処理

AziU3・U2 については、データ収集前に、結晶を最終 的に10 および20%のPEG 400 (w/v) を添加した一連 のリザーバー溶液に移したのち、結晶を液体窒素に浸漬 することにより急速冷凍した.回折データセットは、高 エネルギー加速器研究機構(KEK)のフォトンファク トリーにある BL-17A(検出器:Eiger X16M)および BL-5A(検出器:PILATUS3 S6M)ステーションのピ クセルアレイ検出器を使用して収集した.すべてのデー タセットは、クライオループに取り付けた単結晶を用い て 95Kで収集した.回折画像はXDS8(Kabsch, W., 2010)で処理し、統計処理はAIMLESS9(Evans, P.R., 2011)で行った.SAD法を使用して初期フェーズを選択 し、CRANK2 (Pannu, N.S. et al., 2011)を使用してモデ

真

ル構造を構築した. Se-Met 置換 AziU3·U2の回折には 0.979Åの波長を使用した. AziU3とAziU2の一次配列 でそれぞれ2つおよび4つのメチオニンの硫黄原子が 同定された(性能指数0.66). AziU3·U2および基質結 合型 AziU3·U2の回折データをそれぞれ0.98および 1.00Åの波長で収集し,それらを分子置換および構造 精密化に使用した.分子置換はCCP4プログラムスイー ト(Collaborative Computational Project, N., 1994) の Phaser (McCoy, A.J. *et al.*, 2007)によって行い,電子密 度マップのモデル補正と精密化はCoot (Emsley, P. *et al.*, 2010)と Refmac5 (Murshudov, G.N. *et al.*, 1997)を用い て行った.

Fic25 については、結晶を最終的に 8.75 および 17%、 あるいは 13 および 26%のグリセロール (w/v) を添加 した一連のリザーバー溶液に移したのち、結晶を液体窒 素に浸漬することにより急速冷凍した. 回折データセッ トは、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のフォト ンファクトリーにある BL-5A ステーションのピクセル アレイ検出器を使用して収集した. 回折データを 1.00Å の波長で収集し、予め AlphaFold2 (Jumper, J. et al., 2021) で作製したモデル構造をテンプレートにして分子 置換を行い (McCoy, A.J. et al., 2007), 上記と同様に電 子密度マップのモデル補正 (Emsley, P. et al., 2010) と精 密化 (Murshudov, G.N. et al., 1997) を行った.

(5*R*,6*R*)-*N*²-アセチル -*O*⁷-スルホ DADH を結合した AziU3 (Y246F/W250G)・U2 複合体のモデリング

(5*R*,6*R*)-*N*²-アセチル-*O*⁷-スルホ DADHを結合した AziU3 (Y246F/W250G)・U2の構造をモデリングするた めに、Cootで構築した(5*S*,6*S*)-*O*⁷-スルホ DADHを結合 した AziU3・U2の構造をテンプレートとして、その Tyr246 残基と Trp250 残基をそれぞれ Phe と Gly 残基に 置き換えた.(5*R*,6*R*)-*N*²-アセチル-*O*⁷-スルホ DADHを (5*S*,6*S*)-*O*⁷-スルホ DADHの電子密度を参考にして手動 で当てはめた、構築したモデルに対して Discovery Studio (BIOVIA)を使用してエネルギー最小化した後、 CHARMM (Brooks, B.R. *et al.*, 1983) (Brooks, B.R. *et al.*, 2009) を用いて水素原子を追加した. PLP-10 を結合した Fic25 (N45A/Q197N) のモデリング

PLP-10 を結合した Fic25 (N45A/Q197N) のモデルを作 製するために, PLP-10'を結合した Fic25 の構造に関して Cootを用いてAsn45をAlaへ, Gln197をAsnへ置換した. PLP-10 を手動で当てはめた後,構築したモデルに対し て Discovery Studio (BIOVIA)を使用してエネルギー最 小 化 し た 後, CHARMM (Brooks, B.R. *et al.*, 1983) (Brooks, B.R. *et al.*, 2009)を用いて水素原子を追加した.

結果および考察

化合物1の生合成経路の推定

アジリジン環は、構造が非常に歪んでいるため、求電 子付加による DNAのアルキル化を引き起こす.実際に、 アジリジン環を含むマイトマイシン C (1) (Bass, P.D. et al., 2013) (Fig.1) は、DNA 複製を阻害する抗がん剤と して使用されている.また、アジノマイシン B (Nagaoka, K. et al., 1986) (2) とフィセロマイシン (Argoudelis, A.D. et al., 1976) (3) は、抗菌および/または抗腫瘍活性を示 し、二環性のアザビシクロヘキサン環の構造にアジリジ ン環を含んでいる.アジリジン環を含む天然物は医薬用 途が期待されるが、環形成の基礎となる生合成機構は依 然として不明であるため、ゲノムマイニングによる新規 のアジリジン環含有化合物の発見には限界があった.

1, 2, 3の生合成遺伝子クラスターには、3'-ホスホア デノシン-5'-ホスホ硫酸(PAPS)を基質として使用す るスルホトランスフェラーゼをコードする遺伝子が含ま れていることから、PAPSの硫酸転移によって形成され る硫酸基がアジリジン環を形成するための脱離基として 作用することが示唆されていた(Mao, Y. et al., 1999) (Zhao, Q. et al., 2008) (Liu, Y. et al., 2017) (Thibodeaux, C.J. et al., 2012) (Yue, R. et al., 2020).

我々が SANK 株から発見した 4 の生合成においては, その構成要素であるアザビシクロヘキサン環含有アミノ 酸は AmCP を介して生合成される非タンパク質性アミ ノ酸 (2*S*,6*R*)-ジアミノ-(5*R*,7)-ジヒドロキシヘプタン酸 (以下 (5*R*,6*R*)-DADH (5)と呼称)から生合成される.2 と3は4と類似の環構造を持ち,それぞれの BGC には



Fig.1 Natural products containing an aziridine ring. Azabicyclo [3.1.0] hexane rings are circled.

5を生合成するすべての酵素の遺伝子のホモログが含ま れるため、それらのアザビシクロヘキサン環もまた同様 な経路で生合成されると考えられた. これら4 (vzbク (azi) (azi) (azi) (azi) (fic) (fic) (fic) (fic)BGC に含まれる DADH の生合成遺伝子の周囲に保存さ れている遺伝子の推定機能に基づいて, SANK株にお ける5から4の生合成経路を以下のように推測した (Fig.2a). 推定生合成経路では、まず5は PAPS シンテ ターゼ複合体 (Vzb18, Vzb19, および Vzb20) によっ て生成される PAPS をスルホ供与体として、Vzb21(ス ルホトランスフェラーゼ)によって (5R.6R)-O⁷-スルホ DADH(6)へと変換される.6はVzb12(N-アセチルト ランスフェラーゼ) により、 $(5R,6R)-N^2$ -アセチル- O^7 -スルホ DADH (7) へと変換される。そして7 が硫酸基の 脱離を伴ってアジリジン環を含むアミノ酸(8)に変換さ れたのち、生成した8はVzb13(ヒドロラーゼ)によっ て脱アセチル化されて、2-アミノ-5-(アジリジン-2-イ ル)-5-ヒドロキシペンタン酸(9)(アジリドリンと命名) を生成する。9はアザビシクロヘキサン環含有アミノ酸 に変換され、その後バリンと縮合して4が得られると推 定した. これまでにいくつかのアジリジン環形成酵素が 報告されているが (Tsutsumi, H. *et al.*, 2018) (Bunno, R. *et al.*, 2021), *vzb*クラスターには他の研究で見出された アジリジン環形成酵素遺伝子のホモログは存在しないこ とから,これらの反応の中で,アジリジン環形成酵素の 同定,およびその形成機構に興味が持たれた.

化合物5から9までの変換経路における生合成中間体の 同定

推定した5から9までの生合成経路を検証するために, vzb21, vzb12, vzb10, vzb11, および vzb13のインフレー ムノックアウト変異株を構築した. それらの代謝産物 のLC-MS分析では, どの遺伝子欠失変異株も4を生成 せず, 5の蓄積が観察されたことから,上記の5つの遺 伝子が5から4への変換プロセスに必須であることが明 らかになった(Fig.3a).また,各変異株で蓄積すると 推測した生合成中間体の質量に一致する化合物も検出さ れた.6に相当する m/z 271.06 [M-H]⁻が Δvzb21 変異 株以外のすべての変異株で検出された(データ示さず). Δvzb10, Δvzb11, および Δvzb13 変異体においては,7 に相当する m/z 313.07 [M-H]⁻が検出され, Δvzb13 変 異株では8に相当する m/z 215.10 [M-H]⁻が検出された



Fig. 2 Proposed pathway to aziridoline in the biosynthesis of 4 (a), 2, and 3 (b).





Fig. 3 Detection of the aziridine-containing intermediate. a, LC-MS analysis of the metabolite of the *vzb* gene knockout mutants. Extracted ion count (XIC) chromatograms for 4, with *m/z* 272.161±0.005 [M+H]⁺, for 7, with *m/z* 313.071±0.005 [M−H]⁻, and for 8, with *m/z* 215.104±0.005 [M−H]⁻, are shown from left to right. b, LC-MS spectrum of the reaction mixture of Vzb21. XIC chromatograms are shown for 6, with *m/z* 273.075±0.005 [M−H]⁻ is shown. c, LC-MS analysis of the reaction mixture of Vzb10·11. XIC chromatograms are shown for 7 and 8.

(Fig.3a). これらの結果は, 推定生合成経路に合致する ものであり, Vzb21, Vzb12, Vzb10, Vzb11, Vzb13の順 序で反応が進行し, 5が9に変換されることが確認された.

Vzb21 および Vzb12 の機能の検証

Vzb21 および Vzb12 による5から7の変換を in vitro で検証するため、Vzb21 を5および PAPS とインキュベー トした.反応産物のLC-MS分析により6が検出され (Fig.3b)、Vzb21 が PAPS のスルホ基を5に転移して6 を生成することが実証された.ついで、6とアセチル CoAを Vzb12 とインキュベートすると、6の消費を伴っ て7の形成が観察され(データ示さず)、Vzb12 が推測 どおりアセチル CoAを共基質として6を7に変換するこ とが明らかになった.

Vzb10・11 の機能解析

Vzb10とVzb11は機能未知のタンパク質であり,これ までに相同な酵素は見出されていない.vzb10とvzb11 の相同遺伝子は,aziクラスターではaziU3,aziU2とし て,ficクラスターではfic26,fic27としてそれぞれ隣接 して保存されており,これら遺伝子産物の機能的関連が 示唆された.そこで,Vzb10とVzb11は複合体を形成し, 7を8に変換する機能を有すると推測した. Vzb10と Vzb11をそれぞれ His タグ付き, Strep タグ付きタンパ ク質として大腸菌で共生産させ, その細胞破砕液から Ni²⁺-NTA カラムを用いて Vzb10を精製したところ, 予 想どおり, Vzb10と同時に Vzb11も精製され, 両タンパ ク質が複合体を形成することが確認された. 共精製され た Vzb10 および Vzb11(複合体を形成することから以下 Vzb10・11と呼ぶ)を7とインキュベートすると, 7の消 費と8の形成が観察された(Fig.3b). Vzb10・11の in vitro 反応産物を NMR に供し, 8の化学構造が推定どお りであることを確認した(データ示さず).

AziU3・U2の結晶構造と触媒機構

Vzb10・11によるアジリジン環形成のメカニズムを解 明するために, Vzb10・11 複合体と共に, azi クラスター にコードされている Vzb10・11の相同酵素である AziU3・U2の複合体の結晶化を試み, AziU3・U2 複合体 について, その結晶構造を1.8Åの分解能で決定するこ とに成功した. Dali (Holm, L., 2020)による解析を行っ た結果, データベース内に同じ全体構造を有するタンパ ク質は存在せず, AziU3・U2 は新規な Fold をもつタンパ ク質であることが分かった.
その一方で、AziU3・U2はVzb10・11とは異なり6や7 を基質として認識しなかったことから、Vzb10・11とは 異なる立体化学を持つ類似の化合物を認識していること が示唆された.また、遺伝子クラスターの情報から、フィ セロマイシン3やアジノマイシンB2は、バザビタイドA4 の場合と異なり、DADHからの生合成中間体のαアミノ 基のアセチル化を経ずに共通の経路で生合成が進行する と予想された.したがって、生合成中間体もまた同じ立 体化学を持っていると考えられた.そこで、フィセロマ イシン産生菌 Streptomyces ficellus で aziU2 および vzb11 に相当する fic27 の欠失変異株を作製し、蓄積する O⁷-ス ルホ DADHを生成し、その立体化学を決定することと した.予想通り、Δfic27 変異株では、フィセロマイシン 産生の消失とともに O^7 -スルホ DADH が蓄積し,蓄積し た O^7 -スルホ DADH を (5S,6S)- O^7 -スルホ DADH (6') と 同定した (データ示さず).実際に,AziU3·U2 を Afic27 変異株の培養上清とインキュベートすると、6'の消費と ともに、(5S,6S)-アジリドリン(9')の質量を持つ化合物 の形成が観察され,AziU3·U2 が 6'を基質とすることが 確認された (データ示さず).ついで、6'を含む溶媒に AziU3·U2 の結晶を短時間浸すことで、6'を結合した AziU3·U2 複合体の結晶構造を 1.8Å分解能で決定する ことに成功した (Fig.4a).

この複合体構造において、6′は幾つかのアミノ酸残基 により認識されていたが、その中でもArg111 (AziU3) は6′の C7の硫酸基とイオン結合を形成、Trp59 (AziU2)



Fig. 4 Figure 3. X-ray structures of the complex of AziU3·U2. **a**, Overall structure of the $(5S,6S)-O^7$ -sulfo DADH (**6**')-bound AziU3·U2 complex. Stereo image of *F*o-*F*c maps of the active site of AziU3·U2 with **6**' (σ =3.0) is shown in frame. Corresponding residues in Vzb10·11 are indicated in parentheses. **b**, Dihedral angle between the C6-amino and C7-sulfate group of **6**'. **c**, Catalytic mechanism of AziU3·U2. (1) The state of the substrate in the absence of enzymes. The C6-amino and C7-sulfate groups may form an intramolecular ionic bond in solution. (II) The catalytic state. Trp59 in AziU2 and Arg111 of AziU3 locate the C6-amino and C7-sulfate group to make the dihedral angle nearly 180° suitable for the S_N2-like reaction. The π -system of Trp59 (AziU2) may temporarily enhanced the nucleophilicity of the C6-amino group, facilitating the formation of the aziridine ring, accompanied with the elimination of the sulfate group (III)

真

は6'のC6のアミノ基とNH…π相互作用を形成してい ることから、Arg111 およびTrp59 が触媒活性に関わる と予想された. この構造から推定された反応機構を以下 に述べる. Trp59のπシステムは塩基としてはC6アミ ノ基の脱プロトン化に十分ではないかもしれないが. C6アミノ基のプロトン化状態に影響を及ぼすには十分 であり、一時的に基質のC6アミノ基に孤立電子対を生 成しうる.また、基質結合型複合体構造では6'のC6ア ミノ基とC7硫酸基の間の二面角が約180度であり、C6 アミノ基からC7にS_N2のような反応を起こすのに適し た基質結合であると言える (Fig.4b). したがって、一 時的に生成されたC6アミノ基の孤立電子対が. 硫酸基 との相互作用により求電子性を高められた C7 を求核的 に攻撃し、硫酸基が脱離を伴って、アジリジン環が形成 されると推定される (Fig.4c). Arg111は, 基質のC7 の求電子性を高めるとともに、C6アミノ基とC7硫酸基 の間の二面角が約180度になるように、硫酸基の位置を 固定することで、C6アミノ基によるC7 求核攻撃を促進 するための重要な残基と言える。また、これらの両アミ ノ酸残基について、そのどちらか一方でも Ala へ置換す ると酵素活性が消失することが確認され、これらのアミ ノ酸が活性に関わることが確認されている.

アミノ基転移酵素 Fic25, Vzb9 による DADH の C6 位の 立体選択性

上述したように、2,3,4の生合成中間体である DADHがC5,C6で立体異性があることを見出しており、 4の生合成では(5*R*,6*R*)-DADH(5)が、2,3の生合成で は(5*S*,6*S*)-DADH(5['])が生合成中間体となる。DADH の生合成は相同性の高い酵素で合成されることから、こ の立体異性が小数のアミノ酸残基によって決定されてい ることが示唆される.そこで、6位の立体を作り分ける ことが予想されるアミノ基転移酵素 Fic25 と Vzb9 につ いて、立体選択性についての解析を行った。

アミノ酸配列上, Fic25 と Vzb9 は 56% という高いア ミノ酸配列相同性を有している. Vzb9 および Fic25 は AmCPのC末端に (5R)-または (5S)-ADOH が付加した 化合物を基質にして, AmCP-(5R,6R)-DADH および AmCP-(5S,6S)-DADHのアミノ基転移反応を行う. 我々 は, AmCPの部分をアセチル基とした (5R,6R)-および (5S,6S)- N^2 -アセチル DADH (10, 10') を化学的に合成 したものについて, これらを疑似基質とした逆反応を行 い, 生成した (5R)-または (5S)- N^2 -アセチル -ADOH (11, 11') を検出することで, 両酵素の立体選択性を評価する ことにした (Fig.5a,b). バザビタイド A4 とフィセロマ イシン3 はそれぞれ 10, 10'から生合成されることが分



Fig. 5 In vitro assay of Fic25 and Vzb9 using two stereoisomers of **10** as a substrate. **a**, Reverse reactions of each aminotransferase. **b**, LC-MS spectra of the reaction mixtures of Fic25 and Vzb9. XIC chromatograms for **11**/**11**' are shown, with *m*/*z* 232.083 ± 0.005 [M-H]⁻.

かっており,他の2つのジアステレオマーは培養液中で も生合成中間体として検出されなかったため,C5とC6 の4つの可能性のあるジアステレオマーのうち,10, 10'のみを基質とした.Fic25反応では,10'を基質とし て使用した場合は11'の生産が認められ,10を使用した 場合は11の生成量は少なかった(Fig.5c).その一方で, Vzb9は10を良好な基質とするが,10'に対してはほとん ど反応しなかった.

Fic25の結晶構造及び基質認識機構

これらのアミノ基転移酵素が立体化学を区別するメカ ニズムを解明するために、結晶化を試み、Fic25 につい て、アポ構造を1.8Åの分解能で、PLPを結合したホロ 酵素 Fic25・PLPの構造を1.9Åの分解能で決定した. さ らに、PLPと10′が結合した中間体を還元した構造類似 物(ここでは PLP-10'と呼ぶ)を化学的に合成し、アポ 酵素とインキュベートすることで共結晶を得た.この構 造についても 1.8Åの分解能で決定した.Fic25・PLP-10' 複合体と Fic25・PLP では PLP の認識は同様であった. C7 水酸基は,PLP 骨格中のリン酸基と相互作用すると 同時に Gln197 と水素結合をしていた.PLP-10'の C5 水 酸基は Tyr343 と、C2 に付加した α アミノ基は Gln394 と水素結合を形成していた.αカルボキシ基は水を介し て Gln197 および Asn45 と水素結合ネットワークを形成 していた(Fig.6a,c).

Fic25 および Vzb9 の6位立体選択機構

Fic25 および Vzb9 は両方とも Fold-type Iのアミノ基 転移酵素に分類され、アミノ基転移におけるプロトンの 引き抜き、付加を含む機構は共通であると考えられる



Fig. 6 Proposed reaction mechanisms of Fic25 and Vzb9. a and b, Schematic views of the binding of AmCP-5' in Fic25 (a) and AmCP-5 in Vzb9 (b). Numbers 5 ~ 7 in the structure of 5 indicate carbon numbers and stereochemistry. The substitutions of Asn45/Gln197 in Fic25 with Ala53/Asn205 in Vzb9 allowed the enzymes to bind the C5-C7 portions of the DADH molecules with almost 180Å rotation at C6, resulting in the opposite stereochemistry at C6. c, The PLP-10'-bound structure of Fic25. d, The modeled structure of Fic25 (N45A/Q197N) binding PLP-10 constructed by Discovery Studio using CHARMm as a force field. e, Superimposition of c and d using with PyMOL (http://pymol. sourceforge.net/).

真

(Hayashi, H., 1995). Lys200 がキノイド中間体において C6からのプロトンの引き抜きのための一般塩基触媒と して働くと考えられ、プロトン付加の際にはsi面より PLPのC4′にプロトンが受け渡される. ではどのように して C6 の立体の違いを生み出すのであろうか. Vzb9 の 構造を決定することができなかったが、Fic25の構造か ら、Vzb9の基質認識機構を推測した。PLP-10′と相互作 用する残基の多くはFic25とVzb9で保存されている一 方で、Vzb9ではGln197がAsn (Vzb9番号ではAsn205) に、Asn45がAla(Vzb9番号ではAla53)に置換されて いる. そこで、Fic25のGln197およびAsn45をそれぞ れAsn および Ala に置換したモデル構造を構築したとこ ろ、PLP-10'のC6位が180度回転したような化合物、つ まりC6位がRになったPLP-10の結合が可能であるこ とが分かった (Fig.6b,d,e). このことはこれら2つの アミノ酸残基がC6立体選択性を決定に寄与し、C6を中 心として C5-C7 が逆位に入ることで S体, R体どちら かの化合物が選択されることを示唆している. Fic25 に おいてAsn45Ala, Gln197Asn, Asn45Ala+Gln197Asn の3種の改変体, Vzb9において Ala53Asn, Asn205Gln, Ala53Asn. Asn205Gln の3種の改変体を作製し. 10. 10' を基質として基質特異性の変化を調べた(Table 1). そ の結果, Fic25 では Gln197Asn のアミノ酸置換によって 10に対する活性が格段に向上し、Vzb9ではそれに相当 する Asn205Gln 置換によって 10 に対する活性が大きく 低下した. このことは Gln197/Asn205 が10 つまり C6の R体立体特異性に重要な働きを持っていることを示して いる.一方で.Fic25においてAsn45Alaで10'に対する 活性の低下 (1/2 程度) が見られ, Vzb9 では Ala53Asn で 10′に対する活性が2倍程度上昇した.この位置の残基 はS体の選択性に寄与していることが分かった.

DADH 生合成と立体化学

バザビタイドAとアジノマイシンB,フィセロマイシ ンでは、生合成中間体である DADH の5位および6位の 立体が異なる. また, 生合成機構も, バザビタイドA生 合成においてアジリジン合成酵素Vzb10.11は(5R.6R)-N²-アセチル-O⁷-スルホ DADHを基質として反応を行うが, アジノマイシンBやフィセロマイシン生合成において は (5S,6S)-O⁷-スルホ DADH を基質とし、2位のアセチ ル基の有無においてもバザビタイドAとアジノマイシン B, フィセロマイシンで異なっている. 我々が決定した Vzb10·11のオルソログのAziU3·U2の(5S.6S)-07-スルホ DADHを結合した複合体の構造では、C5-C6とC6-C7 で形成される二面角が約180度になっており、これは C6アミノ基の孤立電子対からのC7への求核攻撃に伴う 硫酸基の S_N2 様脱離反応に適している. さらには、C6 のアミノ基はTrp59の芳香環とNH…π相互作用を形成 し、Trp59の芳香環の丁度中心に来るようにC6アミノ 基が位置し、アミノ基からのプロトンの引き抜きが容易 な配置になっている. バザビタイドAにおける DADH の2位のアミノ基に付加したアセチル基は、DADH骨 格中の5位および6位が共にR体となったDADHのC6 アミノ基,およびC5-C6とC6-C7で形成される二面 角を反応が起きやすいように適切に配置する機能がある ことが予想される.

AmCPシステムでは複数の官能基を持つ親水性の非 タンパク質性のアミノ酸 DADH が作られ、それが構造 多様性を創出する構造要因となっていることは間違いない、それに加えて、複数の官能基が付加した DADH で はそれら官能基・置換基の立体化学が制御されているこ とも明らかになった、SANK株は、わざわざ C2のアミ ノ基にアセチル基を付加することで 5*R*,6*R* 体の DADH

Enzyme	Amino acid residue at position		Relative specificity to the wild type for		
	$45(53)^{a}$	$197(205)^{a}$	C6S	C6 <i>R</i>	
Fic25	Asn	Gln	1	1	
Fic25(N45A)	Ala	Gln	0.31 ± 0.011	0.75 ± 0.051	
Fic25(Q197N)	Asn	Asn	$1.0 \hspace{0.2cm} \pm \hspace{0.2cm} 0.045$	8.2 ± 0.44	
Fic25(N45A/Q197N)	Ala	Asn	0.56 ± 0.077	7.4 ± 0.31	
Vzb9	Ala	Asn	1	1	
Vzb9(A53N)	Asn	Asn	0.88 ± 0.14	0.52 ± 0.054	
Vzb9(N205Q)	Ala	Gln	0.73 ± 0.053	0.096 ± 0.0083	
Vzb9(A53N/N205Q)	Asn	Gln	$2.3 \hspace{0.2cm} \pm 0.18$	0.11 ± 0.021	

Table 1 Effects of replacement of amino acid residues on the substrate specificity

^aNumber indicates the amino acid residue of Fic25 and Vzb9 (parenthesis).

やアジリドリン9を生合成する系を構築していることか ら、バザビタイドAの生合成系は、アジノマイシンB やフィセロマイシンの生合成系から進化して構成された 可能性がある. SANK株は立体化学が5*R*,6*R* になった DADH5 やアジリドリン9を生合成するシステムを作り 出した.現在までに、バザビタイドAには生物活性が 見出されていないが、もしかすると、SANK株はアジ ノマイシンBやフィセロマイシンとは異なる生物活性 を有するあらたな分子を作るための準備を着々と進めて いるのかもしれない.

今後の展望

本研究を通じて、アジリジン生合成機構を解明できた. さらにはAmCPを介して(5S,6S),(5R,6R)の2種類の DADHが生合成されることが明らかになったが、DADH がアジノマイシンBやフィセロマイシンのようにアジ リジン環含有のアミノ酸へと変換されるものもあれば, DADHの側鎖がそのままフリーのかたちで最終産物に まで持ち込まれるものも存在する. AmCPを介して生合 成されるものの中には、アジリジン環含有のアミノ酸が 修飾を受けて生産される s56-p1 がある (Matsuda, K. et al., 2017) (Matsuda, K. et al., 2018), s56-p1の生合成に は、N-N 結合を形成する新規酵素 Spb40 が関わる. Spb40 自体はAmCPと直接相互作用するわけではないが, AmCPを介して作られる DADH が有する複数の官能基 が誘導体化、あるいは複雑な化学構造形成を促進してい るように思われる。N-N 結合形成に直接関わる Cupin ド メインの結晶構造解析にも成功しており、近いうちのそ の詳細を明らかにしたい. さらには、AmCPを介して DADH 以外の化合物が生合成される例も見出している. その一つが抗生物質マレイマイシンであり、我々は最近 その生合成系路の全貌を解明することに成功した.マレ イマイシンの生合成を担う遺伝子クラスター中にはこれ までに知られていない非常に興味深い反応を行う酵素を コードする遺伝子が多数含まれている.また.それ以外 にも、AmCPを介して生合成される新規化合物を幾つ か単離し、その生合成の一端を明らかにすることにも成 功している. それらについては、まだ未発表のため、こ こにそれらを述べることはできないが、これら一連の研 究を通して、本研究助成により AmCPを介して作られ る非タンパク質性アミノ酸の生合成機構並びに AmCP が関わる多様な天然物生合成の分子機構の一端を明らか にすることに成功したと言える. これらからも, AmCP を介して生合成される新規天然化合物の探索を続けると 共に,未知の構造や生物活性を与える新規酵素の構造と 機能を明らかにすることで、新たな反応を行う酵素レ

パートリーを増やし,有用機能化合物を自由に設計する ため技術や知識を蓄積していきたい.

要 約

AmCPは、我々が高度好熱菌のリジン生合成におい て発見した、新しいタイプのキャリアタンパク質で、そ の後の研究により一部のアーキアではリジンに加えてア ルギニン(オルニチン)の生合成にも関わることが明ら かになった. さらに、AmCPは二次代謝産物の生合成 において、非タンパク質性のアミノ酸 DADHを供給す る機能を担うことが明らかになっている.本研究では. AmCP が関わる天然化合物の構造多様性創出機構を明 らかにすることを目指したものである. 放線菌が生産す るアジノマイシンBやフィセロマイシンに含まれるア ジリジン環は、これらの化合物の抗生物活性における DNAアルキル化の本体である. 我々はゲノムマイニン グ及び生合成を担う酵素機能の解析を通じて、アジリジ ン環合成酵素を突き止め、基質を結合した酵素の結晶構 造解析を行い、アジリジン環を合成する機構を原子レベ ルで解明することに成功した。また、その過程でアジリ ジン環を含むアミノ酸の生合成中間体である DADH に 立体異性があることに気がつき、アミノ基転移酵素の結 晶構造解析を通じて、DADHの6位のアミノ基の立体 化学を決める機構を明らかにすることにも成功した. AmCPを介する天然物の構造多様性創出機構の一端を 明らかにしたと言える.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 西山真. 2022. 放線菌で明らかになったアジリジン環生合 成機構. 第468回ビタミンB研究協議会. (9月2日, 岡山)
- 2) 森田裕太郎, 志村諒, 吉田彩子, 森脇由隆, 富田武郎, 寺田透, 清水謙多郎, 古園さおり, 西山真. 2023. 高度好熱菌*Thermus thermophilus*のリジン生合成におけるタンパク質間相互作 用に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会. (3月14-17 日, オンライン)
- 3) 宮永寛哉, 曽根祐輔, 古園さおり, 西山真. 2023. 放線菌においてAmCPを介して生産される新規天然化合物の探索と同定. 日本農芸化学会2023年度大会. (3月14-17日, オンライン)
- 4)林勇太,曽根祐輔,吉田彩子,古園さおり,西山真. 2023. 放 線菌Streptomyces lydicus ATCC 25470におけるアミノ基 キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産 物とその生合成に関する研究.日本農芸化学会2023年度大 会. (3月14-17日,オンライン)
- 5) Shi, W., Yoshida, A., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2023. Substrate specificity and evolution of lysine biosynthetic enzymes in *Thermus thermophilus*. 日本農芸化学会2023年 度大会. (3月14-17日, オンライン)

真

- 6) Pramono, H., Hirashima, Y., Kikuchi, K., Yoshida, A., Sone, Y., Kosono, S. & Nishiyama, M. Characterization of a heterodimeric aminotransferase discovered in AmCPcontaining biosynthetic gene cluster from *Serratia* sp. ATCC 39006. 日本農芸化学会2023年度大会. (3月14-17日, オンライン)
- 7)林勇太,曽根祐輔,吉田彩子,古園さおり,西山真. 2023. 放 線菌Streptomyces lydicus ATCC 25470におけるアミノ基 キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産 物とその生合成に関する研究.予知生合成科学若手合宿勉 強会.(8月26-27日,熱海)
- 8) 西山真. 好熱菌リジン生合成酵素の進化と機能変換. 第472 回ビタミンB研究協議会. (9月1日, 徳島)
- 9)林勇太,曽根祐輔,吉田彩子,古園さおり,西山真.2023.放 線菌Streptomyces lydicus ATCC 25470におけるアミノ基 キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産 物とその生合成に関する研究.2023年度(第37回)日本放線 菌学会大会(9月7-9日,東広島)
- Shi, W., Yoshida, A., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2023. Substrate specificity of lysine biosynthetic enzymes in *Thermus thermophilus*. 3rd Japan-Switzerland-Germany Workshop on Biocatalysis and Bioprocess Development. (9 月11-13日, 犬山)
- 西山真. 2023. 微生物における代謝の多様性と分子機構.日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会特別講演. (9月21日,高知)
- 12) Shi, W., Yoshida, A., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2023. Substrate specificity of lysine biosynthetic enzymes in *Thermus thermophilus*. International Workshop on "Neotechnologies for ThermusQ initiative". (10月27-28日, 東伊豆)
- Nishiyama, M. 2023. Enzymatic aziridine formation via sulfate elimination. University of Minnesota – UTokyo Joint Symposium on Innovative Microbiology and Biotechnology. (11月8日, 東京)
- 14) 西山真. 2024. Serratia 属細菌の二次代謝に関わるヘテロオ リゴマー型アミノ基転移酵素. (3月1日, 東京)
- 15) Shi, W., Yoshida, A., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2024. Crystal structure of the LysJ-LysW complex from *Thermus thermophilus*. 日本農芸化学会2024年度大会. (3月23-27日, 東京)
- 16)原田陽道,曽根祐輔,吉田彩子,古園さおり,西山真.2024. マレイマイシン生合成におけるマレイミド環形成機構.日本農芸化学会2024年度大会.(3月23-27日,東京)
- 17)林勇太,曽根祐輔,吉田彩子,古園さおり,西山真. 2024. 放 線菌Streptomyces lydicus ATCC25470におけるアミノ基 キャリアタンパク質を介して生産される新規二次代謝産 物の生合成に関する研究.日本農芸化学会2024年度大会. (3月23-27日,東京)
- 18) Nishiyama, M. 2024. AmCP-mediated biosynthetic machinery: a new platform for proteinogenic and non-proteinogenic amino acid biosynthesis. National University of Singapore - University of Tokyo-Kyoto Joint Symposium: Role of Microbiology in Sustainable Development. (4月3日, Singapore)
- 原著論文
 - 1) Kurosawa, S., Hasebe, F., Okamura, H., Yoshida, A.,

Matsuda, K., Sone, Y., Tomita, T., Shinada, T., Takikawa, H., Kuzuyama, T., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2022. Molecular basis of enzymatic aziridine formation via sulfo-elimination. J. Am. Chem. Soc. **144:** 16164–16170.

2) Kurosawa, S., Okamura, H., Yoshida, A., Tomita, T., Sone, Y., Hasebe, F., Shinada, T., Takikawa, H., Kosono, S. & Nishiyama, M. 2022. Mechanisms of sugar aminotransferaselike enzymes to synthesize stereoisomers of non-proteinogenic amino acids in natural product biosynthesis. ACS Chem. Biol. 18: 385–395.

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. (5*R*,6*R*)-および(5*S*,6*S*)-*N*²-アセチルDADH,PLP-10'を 合成いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の岡 村仁則先生および滝川浩郷先生,大阪市立大学(現大阪 公立大学)理学研究科の品田達郎先生に厚く御礼申し上 げます.

文 献

- Argoudelis, A.D., Reusser, F., Whaley, H.A., Baczynskyj, L., Mizsak, S.A. & Wnuk, R.J. 1976. Antibiotics produced by *Streptomyces ficellus*. I. Ficellomycin. J. Antibiot. (Tokyo). 29: 1001–1006.
- Bass, P.D., Gubler, D.A., Judd, T.C. & Williams, R.M. 2013. Mitomycinoid alkaloids: Mechanism of action, biosynthesis, total syntheses, and synthetic approaches. Chem. Rev. 113: 6816–6863.
- Brooks, B.R., Brooks, C.L., Mackerell, A.D., *et al.* 2009. CHARMM: The biomolecular simulation program. J. Comp. Chem. **30**: 1545–1614.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M. 1983. CHARMM - A prgram for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. J. Comp. Chem. 4: 187–217.
- Broquist, H.P. 1971. Lysine biosynthesis (yeast). Methods Enzymol. 17: 112-129.
- Bunno, R., Awakawa, T., Mori, T. & Abe, I. 2021. Aziridine formation by a Fe(II) /α-ketoglutarate dependent oxygenase and 2-aminoisobutyrate biosynthesis in fungi. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 60: 15827–15831.
- Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D Biol .Crystallogr. 50: 760–763.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. 2010. Features and development of Coot. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66: 486–501.
- Evans, P.R. 2011. An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 67: 282–292.
- Hasebe, F., Matsuda, K., Shiraishi, T., et al. 2016. Amino-group

carrier-protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. Nat. Chem. Biol. **12:** 967–972.

- Hayashi, H. 1995. Pyridoxal enzymes: Mechanistic diversity and uniformity. J. Biochem. (Tokyo). 118: 463–473.
- Holm, L. 2020. DALI and the persistence of protein shape. Protein Sci. **29**: 128–140.
- Hopwood D, A. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. John Innes Foundation,
- Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2009. Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. Nat. Chem. Biol. 5: 673-679.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., et al. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 596: 583–589.
- Kabsch, W. 2010. XDS. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66: 125–132.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation,
- Kobashi, N., Nishiyama, M. & Tanokura, M. 1999. Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: Lysine is synthesized via a-aminoadipic acid not via diaminopimelic acid. J. Bacteriol. 181: 1713–1718.
- Liu, Y., Li, M., Mu, H., *et al.* 2017. Identification and characterization of the ficellomycin biosynthesis gene cluster from *Streptomyces ficellus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101: 7589– 7602.
- Majerus, P.W., Alberts, A.W. & Vagelos, P.R. 1964. The Acyl carrier protein of fatty acid synthesis: Purification, physical properties, and substrate binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 51: 1231–1238.
- Mao, Y., Varoglu, M. & Sherman, D.H. 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. Chem. Biol. 6: 251–263.
- Matsuda, K., Hasebe, F., Shiwa, Y., Kanesaki, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Shin-Ya, K., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2017. Genome mining of amino group carrier protein-mediated machinery: Discovery and biosynthetic characterization of a natural product with unique hydrazone unit. ACS Chem. Biol. 12: 124–131.
- Matsuda, K., Tomita, T., Shin-Ya, K., Wakimoto, T., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2018. Discovery of unprecedented hydrazineforming machinery in Bacteria. J. Am. Chem. Soc. 140: 9083– 9086.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. 2007. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40: 658–674.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **53**: 240–255.

- Nagaoka, K., Matsumoto, M., Oono, J., Yokoi, K., Ishizeki, S. & Nakashima, T. 1986. Azinomycins A and B, new antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation, isolation, and characterization. J. Antibiot. (Tokyo). **39:** 1527–1532.
- Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T. & Yamane, H. 1999. A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: A key to the evolution of amino acid biosynthesis. Genome Res. **9**: 1175–1183.
- Ouchi, T., Tomita, T., Horie, A., et al. 2013. Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in Sulfolobus. Nat. Chem. Biol. 9: 277–283.
- Pannu, N.S., Waterreus, W.J., Skubák, P., Sikharulidze, I., Abrahams, J.P. & de Graaff, R.A. 2011. Recent advances in the CRANK software suite for experimental phasing. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 67: 331–337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Shimizu, T., Tomita, T., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2016. Crystal structure of the LysY-LysW complex from *Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem. **291**: 9948–9959.
- Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M.A. 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. Chem. Biol. 3: 913–921.
- Thibodeaux, C.J., Chang, W.C. & Liu, H.W. 2012. Enzymatic chemistry of cyclopropane, epoxide, and aziridine biosynthesis. Chem. Rev. 112: 1681–1709.
- Tsutsumi, H., Katsuyama, Y., Izumikawa, M., Takagi, M., Fujie, M., Satoh, N., Shin-Ya, K. & Ohnishi, Y. 2018. Unprecedented cyclization catalyzed by a cytochrome P450 in benzastatin biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. 140: 6631–6639.
- Vogel, H.J. 1959. On biochemical evolution: lysine formation in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 45: 1717–1721.
- Vogel, H.J. 1964. Distribution of lysine pathway among fungi: evolutionary implications. Am. Natl. 98: 446–455.
- Yoshida, A., Tomita, T., Atomi, H., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2016. Lysine biosynthesis of *Thermococcus kodakarensis* with the capacity to function as an ornithine biosynthetic system. J. Biol. Chem. **291**: 21630–21643.
- Yoshida, A., Tomita, T., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T. & Nishiyama, M. 2015. Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ-LysW complex from *Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem. **290**: 435–447.
- Yue, R., Li, M., Wang, Y., Guan, Y., Zhang, J., Yan, Z., Liu, F., Lu, F. & Zhang, H. 2020. Insight into enzyme-catalyzed aziridine formation mechanism in ficellomycin biosynthesis. Eur. J. Med. Chem. **204:** 112639.
- Zhao, Q., He, Q., Ding, W., et al. 2008. Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. Chem. Biol. 15: 693–705.

細菌の新たな元素状硫黄呼吸システムの分子機構

三原久明

立命館大学生命科学部 〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1

Molecular mechanism of a novel elemental sulfur respiration system in bacteria Hisaaki Mihara

College of Life Sciences, Ritsumeikan University 1-1-1, Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577

Anaerobic respiration using elemental sulfur as the terminal electron acceptor is a crucial metabolic process in sulfur-reducing bacteria and some archaea, playing an indispensable role in the biogeochemical sulfur cycle. This study aimed to elucidate the molecular mechanism of sulfur respiration in *Geobacter sulfurreducens* PCA. The protein encoded by the esuD gene was identified as a novel polysulfide reductase, MccSep, containing five c-type hemes and one Sec residue. The X-ray crystal structure of MccSep solved at 1.90Å revealed that Cys239 and Sec325, positioned near the His/Cys-coordinated heme, are crucial for the catalytic activity. The reduction of elemental sulfur and the growth of the $\Delta esuD$ strain on elemental sulfur media were significantly impaired compared to the parent strain, highlighting the crucial role of MccSep in sulfur respiration. The esuD gene was part of the esu operon, which includes esuABCDEFGHIJ on the G. sulfurreducens PCA genome. The lack of halo formation on the elemental sulfur agar medium by the $\Delta esuA$, $\Delta esuB$, $\Delta esuE$, and $\Delta esuEFGHII$ strains showed the involvement of the operon in sulfur respiration. Expression of the operon genes was upregulated in response to elemental sulfur in the medium. Enzymatic analysis identified EsuA as a sulfur transferase with high catalytic efficiency for polysulfides using Cys330 as the catalytic residue. The $\Delta esuB$ strain expressing the plasmid-derived C147A mutant of EsuB did not complement sulfur respiration ability, demonstrating the critical role of Cys147 in EsuB for sulfur respiration. Similarly, introducing a plasmid expressing the $\Delta C104$ mutant of EsuC into the $\Delta esuC$ strain did not restore sulfur respiration, indicating that Cys104 of EsuC is also essential for this process. Subcellular localization analysis showed that EsuA predominantly localized to the outer and inner membrane fractions, EsuB to the outer membrane, and ExtJ to the periplasm. These findings offer valuable insights into the molecular mechanisms underlying bacterial sulfur respiration.

Key words: sulfur respiration, polysulfide reductase, elemental sulfur, selenoprotein, multiheme cytochrome

緒 言

元素状硫黄(主にS₈)は、堆積物に広く分布してい る硫黄分子種である(Bb Jørgensen *et al.*, 2019; Findlay & Kamyshny, 2017).元素状硫黄を最終電子受容体とす る嫌気呼吸は、硫黄還元細菌および一部のアーキアに おける重要な異化代謝プロセスであり、同時に地球上の

E-mail: mihara@fc.ritsumei.ac.jp 共同研究者:松村 浩由(立命館大学生命科学部). 吉澤 拓也(中外製薬). 井上 真男(立命館大学 R-GIRO). 生物地球化学的な硫黄循環における不可欠なプロセス でもある(Bonch-Osmolovskaya, 1994; Wasmund et al., 2017). 硫黄還元細菌は,自然界で中温性の淡水堆積物 から,酸性の火山性温泉や海底熱水噴出孔まで広範囲 に生息している(Pjevac et al., 2014; Wasmund et al., 2017). 細菌における硫黄還元の分子メカニズムとして は, Pseudomonadota 門の細菌 Wolinella succinogenes や 超好熱アーキア Pyrococcus furiosus などごく限られた生 物種から,ヒドロゲナーゼまたはギ酸脱水素酵素と共役 したモリブデン補因子・鉄硫黄クラスター含有型ポリ スルフィド還元酵素 PsrABC(Hedderich et al., 1998; Krafft et al., 1995) や,呼吸鎖複合体 I 硫黄還元酵素 MBS (Yu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020), FAD/NADH 依 存性硫黄還元酵素 NSR (Jelen *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2022; Schut *et al.*, 2007) が報告されている. しかし, 元 素状硫黄とは異なる化学形態の硫黄分子種に対する還元 プロセス, 例えば硫酸塩還元, 亜硫酸塩還元, チオ硫酸 塩還元などと比較して, 元素状硫黄還元に関する研究は 著しく遅れている (Grein *et al.*, 2013). 特に, 硫酸を還 元しない「真の」元素状硫黄還元細菌として初めて 1976 年に単離された Desulfuromonas acetoxidans (Pfennig & Biebl, 1976) およびこれを含む Desulfobacterota 門の細菌 においては, 硫黄還元の分子機構は長らく不明であった.

グラム陰性絶対嫌気性の Geobacter sulfurreducens PCA は、エネルギー代謝の一環として酸化鉄等の金属化合物 やフマル酸、元素状硫黄を還元する異化的金属・硫黄還 元細菌として単離・同定された(Caccavo et al., 1994). 本属細菌は、土壌や河川堆積物中の金属の物質循環にお いて重要な役割を果たしていると考えられている. G. sulfurreducens PCA も Desulfobacterota 門に属し、その種 小名が示す通り、硫酸を還元しない元素状硫黄還元細菌 であり、硫黄呼吸に関わるタンパク質や遺伝子の実態に ついては本菌の発見以来30年間報告が無かった。この ような中,バイオフィンフォマティクス解析から,本菌 に前例のない珍しいタイプのタンパク質を見いだした (Fujita et al., 2007). その後の解析により、本タンパク 質がポリスルフィド還元酵素活性を示し、本菌の硫黄還 元に関わることが示唆された、そこで、このポリスルフィ ド還元酵素の解析ならびに本菌の硫黄呼吸系の分子機構 を解明することを本研究の目的とした.

実験方法

細菌株とその培養

G. sulfurreducens PCA は Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbHから入手した. G. sulfurreducens PCAの培地への 接種は嫌気チャンバー内 (グローブボックス・ジャパン) で 行った. G. sulfurreducens PCA は, 20mM 酢酸, 40mM フ マル酸, 0.1% 酵母エキス, 1mMシステインを含むNBAFYE 培地 (Coppi et al., 2001) 中,嫌気条件下, 35℃で培養 した.硫黄添加液体培地は、NBAFYE 培地に 0.1% (w/v) 昇華硫黄粉末 (Strem Chemicals) を添加した.最小液 体培地は FWA-Fe(III) クエン酸培地 (Lovley & Phillips, 1988) を改良したものであり、電子供与体として 20mM 酢酸を、電子受容体として鉄(III) クエン酸の代わりに 0.1% (w/v) 硫黄粉末を含む. Escherichia coli DH5a は DNA 操作に、E. coli BL21 (DE3) はタンパク質発現に使 用した.E. coli は、LB 培地中で 37℃で好気的に培養した. ウェスタンブロッティングは、Immobilon-P(孔径 0.45µm, Merck Millipore)と、Trans-Blot SD セミドラ イ転写装置(Bio-Rad)を用いて行った.抗GSU2936 抗体は、*E. coli* BL21 (DE3)宿主内で封入体としてリコ ンビナント発現したGSU2936を精製し、これを抗原と して免疫したウサギ血清から得た.EsuA、EsuB、EsuC に対する抗体は、各タンパク質のアミノ酸配列を基に設 計したペプチドを抗原としてウサギに免疫して得た.細 胞免疫反応性タンパク質は、二次抗体(抗ウサギ IgG (H+L)、HRPコンジュゲート、Promega)、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク)、およびAmersham Imager 600 (Cytiva)を用いて検出した.

MccSep の精製

G. sulfurreducens PCA からのネイティブ MccSep 精製 は次の方法で行った.G. sulfurreducens PCAを 20Lの NBAFYE 培地で 40 時間培養して得られた菌体を超音波 破砕し、遠心分離により粗抽出液を得た.これをブチル トヨパールカラム (トーソー) およびQ-セファロース カラム (Cytiva) に順次供し、溶出した 画分を抗 GSU2936 抗体を用いたウェスタンブロットにより解析 することで MccSep を収集した.得られた MccSep を 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM ジチオトレイトールで 透析し精製標品とした.

リコンビナント MccSep は次の方法で精製した. pMcasMccSepを導入した $\Delta esuD$ 株を $10\mu g/mL$ クロラ ムフェニコールを含む NBAFYE 培地中で嫌気的に 35° で培養し、1mM IPTG で遺伝子発現を誘導した24時間 後,遠心分離によって菌体を得た.菌体を超音波破砕し、 遠心分離後に得られた上清を Strep-Tactin Superflow カ ラム(IBA GmbH)に供し、1mM D-デスチオビオチン で溶出した.酵素画分を30 mM Tris-HCl(pH 7.5)、 500 mM NaClで平衡化した Superdex 200 Increase 10/300 GLカラム(Cytiva)に供し、AKTA go クロマ トグラフィーシステム(Cytiva)を使用して溶出した. MccSep 変異体酵素は野生型リコンビナント MccSep と 同様に精製した.

セレノシステイン残基の同定および鉄定量

精製したネイティブ MccSep を, 6M 塩酸グアニジン および 4mM ジチオトレイトールを含む 0.27 M Tris-HCl (pH 8.5) 中で変性・還元し, 8mM ヨードアセトアミ ドを添加することによりカルボキシメチル化した. 凍結 乾燥したタンパク質を 1.2 M 尿素を含む 80 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解し、トリプシン (2.3 μ g/mL) で 37 C で 16 時間消化した. MccSep トリプシン消化物を Capcell Pak C₁₈ SG120 カラム(大阪ソーダ)および島津 HPLCシステムを用いて分離し、エレクトロスプレーイ オン化トリプル四重極型質量分析計 Sciex API 3000 LC/ MS/MS(Applied Biosystems)で分析した. 精製され た MccSep 分子中のセレン含量は、常法(Watkinson, 1966)に従い、酸分解と 2,3-ジアミノナフタレンを用 いた誘導体化の後に蛍光測定により測定した. MccSep 分子中の鉄含量は、既報の方法(Moulis & Meyer, 1982)により定量した.

各種タンパク質の菌体内局在解析

G. sulfurreducens PCAの細胞分画は,以前に報告された方法(Jahan et al., 2019) で行った. SDS-PAGE 解析は10-12%ポリアクリルアミドゲルを用いて行い,タンパク質はクマシーブリリアントブルーG-250で染色した.ウェスタンブロッティングは上述した方法で実施した.

遺伝子破壊株の作製

各遺伝子破壊株は、遺伝子破壊用 DNA 断片を用いた 相同組換えにより作製された.標的遺伝子の約250bp 上流から 5⁻端約250bpまでを含む DNA 断片,および, 標的遺伝子の約450bp下流から3⁻端約120bpまでを含 む DNA 断片をそれぞれ PCRで増幅し、カナマイシン耐 性遺伝子カセット(*kanR*)の両端に結合させた.得られ た DNA 断片をエレクトロポレーション装置(GTE-10, 島津製作所)により *G. sulfurreducens* PCA に導入し、 400µg/mLカナマイシンを含む NBAFYE 寒天培地上で 遺伝子破壊株を選抜した.標的遺伝子の破壊は PCR お よび PCR 断片の DNA シーケンシングにより確認した.

発現プラスミドの構築および部位特異的変異導入

G. sulfurreducens PCA 菌体内での同種遺伝子発現に は、広宿主域ベクターである pMMB206 (Morales et al., 1991) を利用した. リボソーム結合配列および制限 酵素認識配列 (NdeI, XhoI, XbaI) を含む DNA カセッ トを pMMB206 の EcoRI 部位に挿入して pMcas を得た. PCRによって増幅した各遺伝子断片を NdeI および XbaI で消化し、pMcasの同部位に挿入して、pMcasMccSep, pMcasEsuB, pMcasEsuCを得た. E. coli BL21 (DE3) を宿主とした EsuAの生産には、EsuAの1-29アミノ酸 残基をコードする領域を削除した esuA 遺伝子を pColdI ベクターに挿入して構築した発現プラスミドを用いた. 各タンパク質の部位特異的変異体は, QuikChange 部位 特異的変異誘発法(Agilent)により作製した.構築さ れたプラスミドの配列は, ABI Genetic Analyzer 3130 (Thermo Fisher Scientific) を用いた DNA シーケンシ ングによって確認した.

酵素活性測定

MccSepの活性測定は、窒素ガス密閉ゴム栓付きの石 英キュベット中で還元型メチルビオロゲンを用いて無酸 素条件下で行った.アッセイ溶液は、0.3mMメチルビ オロゲン、0.075mMジチオナイト、2mM CaCl₂、0.2mM 各基質、50mM Bicine バッファー(pH 8.5)、0.4~ 4 μ g/mLの酵素から構成された.反応は基質の添加に よって開始し、30℃で2分間、島津UV-1850 UV-vis分光 光度計を使用して 600 nm での吸光度減少に基づいて測 定した.還元型メチルビオロゲン(MV^{•+})のモル吸光 係数(ε_{600} =13.7mM⁻¹cm⁻¹)(Watanabe & Honda, 1982) を使用し、活性は、酵素 1mg、1分間あたりの MV^{•+}酸 化量として表した.タンパク質濃度は、Protein Assay BCAキット(ナカライテスク)を使用して測定した.

EsuAのチオ硫酸硫黄転移活性の測定は、既報の方法 (Vandenbergh *et al.*, 1979) に一部改良を加えて行った. 反応液は、20mMチオ硫酸ナトリウム、20mMシアン化 カリウム、100mM Tris-HCl (pH 8.0) および酵素を含み、 37℃でインキュベートした後、5.6%のホルムアルデヒド で反応を停止し、115mM 硝酸鉄を加えた. 遠心分離の 後、赤褐色の鉄-チオシアン酸塩錯体の460nmにおける 吸収を島津 UV-1850 UV-vis 分光光度計で測定した. EsuA のポリスルフィド硫黄転移活性の測定には、Klimmek ら の方法(Klimmek *et al.*, 1998) に従って調製したポリス ルフィドを使用し、反応の進行に伴うポリスルフィドの 360nm における吸光度減少により、 ε_{360} =0.38mM⁻¹cm⁻¹ を用いて嫌気キュベット内で測定した.

酵素の各基質に対する速度論的パラメータは、上記の 反応条件下で基質濃度を変化させて測定し、GraphPad Prism (GraphPad Software)を用いたデータの非線形 フィッティングによって求めた.

X線結晶構造解析

結晶化条件の初期スクリーニングは、Mosquito(SPT Labtech)を使用したシッティングドロップ蒸気拡散法 によって行った.各種スクリーニングキットを用いた結 晶化条件の最適化後、0.1M 硫酸アンモニウム、0.1M HEPES(pH 7.5)、10% PEG4000を含むリザーバー溶 液を用いることで、X線データ収集に適した単結晶を得 た.酵素のヨウ素誘導体結晶をMiyatakeらの方法 (Miyatake *et al.*, 2006)に従って作製し、X線回折デー タセットは検出器 Eiger 4M (Dectris)を備えた SPring-8 ビームライン 26B1 で収集された.MccSepの結晶構造 は、ネイティブおよびヨウ素誘導データセットを使用し た単一異型置換法と異常散乱法(SIRAS)により、 PHENIX(Liebschner *et al.*, 2019)のAutosolで解いた後、 リファインメントとモデル構築を行った. 硫黄呼吸アッセイ

元素状硫黄含有 NBAFYE 寒天培地は、2mM ポリス ルフィド溶液を NBAFYE 寒天培地に添加し、オートク レーブ後にシャーレに分注し、空気酸化させるとともに 過剰な硫化水素を除去して調製した.本培地の使用前に は、少なくとも 16時間、アネロパック・ケンキ(三菱 ガス化学)で酸素を除去した.PBSで洗浄した菌液 1µL を 1mM IPTG を添加した元素状硫黄含有 NBAFYE 寒 天培地にスポットし、35℃で2-6日間インキュベート してハロの形成を観察した.培養液中の硫化物イオンは メチレンブルー法(Rabinowitz, 1978)により定量した.

逆転写 PCR (RT-PCR) 解析および定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) 解析

Esuオペロン構造の解析は、各ORF間の断片を増幅 するRT-PCRによって行った.NBAFYE液体培地で培 養したG. sulfurreducens PCAを遠心分離で集菌し、PBS で洗浄後、セパゾール RNA I Super G(ナカライテスク) を用いてトータル RNAを抽出した.DNase I処理、フェ ノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿により RNA を精製した.ReverTra Ace(東洋紡)を用いた逆転写反 応で得られた cDNA、各プライマー、KOD -Plus- Neo (東洋紡)を用いて PCR を行い、得られた DNA 断片を アガロースゲル電気泳動で分析した.

RT-qPCR 解析は, 0.1% (w/v) 元素状硫黄を添加また は無添加の NBAFYE 液体培地で嫌気的に培養した *G. sulfurreducens* PCA 菌体を用い, 上記と同様な方法で cDNAを調製し, StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) および TB Green Fast qPCR Mix (TaKaRa) を用いて行った.

バイオインフォマティクス解析

タンパク質の局在性解析は、SignalP 6.0 (https:// services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/) (Teufel *et al.*, 2022) および PSORTb 3.0 (https://www. psort.org/psortb/) (Yu *et al.*, 2010) プログラムを用い て行った. タンパク質の立体構造予測には AlphaFold 3 (Abramson *et al.*, 2024) を用い、構造の描画は Pymol (Schrödinger) で行った.

結果および考察

gsu2937-gsu2936内の同一読み枠内UGAコドンのリー ドスルー

以前に実施したバイオフィンフォマティクス解析において、データベース内の原核生物ゲノムを対象にして新 奇セレンタンパク質候補を探索した(Fujita *et al.*, 2007). その結果, Desulfuromonadales 目の Geobacter 属 や Desulfuromonas 属の細菌ゲノム上に新奇セレンタン パク質の候補遺伝子を見いだした. セレンタンパク質の セレノシステイン残基 (Sec) は、通常終止コドンとし て機能するUGAコドンにより指定される (Böck, 2000). 従って、ゲノム解析の自動アノテーションでは、 特に未知セレンタンパク質について、セレノシステイン 残基を指定する UGA の位置でオープンリーディングフ レーム (ORF) が終了するミスアノテーションが今なお発 生している (Santesmasses et al., 2020). G. sulfurreducens PCAのゲノム解析アノテーションでは、gsu2937と gsu2936は2つのORFとされていたが (Methé et al., 2003), gsu2937-gsu2936は1つのポリペプチドをコー ドすると予測した(Fig.1A). GSU2937 部分には、マル チヘムシトクロムのタンパク質ファミリーに特徴的な 5つのc型へム結合モチーフ(CxxCH)が存在していた. 一方, GSU2936部分のアミノ酸配列は, 機能既知のタン パク質との有意な相同性は認められなかった. gsu2937 遺伝子の UGA コドンのすぐ下流には、セレノシステイ ンが挿入される際に必須とされる SECIS エレメントに 類似したmRNA二次構造が予測された(Fig.2). しかし, 予測された SECIS では, UGA コドンと頂端 (apical) ルー プの間には13ヌクレオチドの間隔しかなく、先行研究 で提案されたコンセンサスモデルの間隔(16-37 ヌク レオチド) (Zhang & Gladyshev, 2005) よりも短かった.

実際に, gsu2937 遺伝子内の UGA コドンがアミノ酸 残基に翻訳されるかどうかを調べるために, 大腸菌 BL21 (DE3) 細胞で組換え生産した精製 GSU2936 (約 11kDa) に対して作製された抗 GSU2936 抗体を利用し た, G. sulfurreducens PCA の 粗 抽 出 液 に 対 す る 抗 GSU2936 抗体を用いたウエスタンブロット解析では,



Fig. 1 Read-through of the in-frame UGA codon in *gsu2937-gsu2936* mRNA. (A) Schematic drawing of GSU2937-GSU2936 (MccSep) indicating the size of GSU2936 used as antigen to prepare anti-GSU2936 antibody. (B) Western blot analysis of crude extracts from *G. sulfurreducens* PCA. Crude lysate proteins were separated by a 15% SDS-PAGE gel and analyzed by western blot using an anti-GSU2936 antibody.



Fig. 2 Comparison of SECIS element structures.
(A) Predicted secondary structure of the G. sulfurreducens gsu2937-gsu2936 SECIS element.
(B) The consensus bacterial SECIS (Zhang & Gladyshev, 2005). Features in the SECIS structures are indicated.

約 49kDa の単一のバンドが検出され(Fig.1B), これは gsu2937-gsu2936 遺伝子産物の推定分子質量によい一致 を示した.よって, gsu2937とgsu2936 の間に位置する 同一読み枠内 UGA コドンがアミノ酸残基として翻訳さ れ,単一のポリペプチド GSU2937-GSU2936 が生成され ることが示された.

マルチヘムシトクロムcセレンタンパク質 (MccSep) の精製と解析

抗GSU2936抗体によるウェスタンブロッティング検出 を指標に, G. sulfurreducens PCAの無細胞粗抽出液から GSU2937-GSU2936を精製した. 精製GSU2937-GSU2936 は、シトクロムcに特徴的なUV-vis吸収スペクトル(410nm (y帯), 525nm(β帯), 553nm(α帯)に吸収極大を示し (Fig.3A),鉄およびセレンの定量解析の結果,1サブユ ニット当たり、4.88±0.05 個の鉄と0.96±0.13 個のセレン を含有すると算出された. さらに、ヨードアセトアミドでア ルキル化した GSU2937-GSU2936 をトリプシン消化し, 得られたペプチドを ESI-MS 解析したところ,アルキル 化 Sec 含有ペプチド (VEMTNHAGHSIPDGUPTPNR) のアミノ酸配列から計算した分子質量(2237.8Da)と 一致する m/z 位置にピークが観測された(観測ピーク から得られた分子質量:2238.0Da). これにより, UGA コドンに対応するペプチドの位置にセレノシステイン残 基が存在することが分かった.以上の解析結果から. GSU2937-GSU2936は、予想した通り、5つのヘムと 1つのセレノシステイン残基を有する新奇タンパク質で あることが示され、これをマルチヘムシトクロムcセレ ンタンパク質 (MccSep) と命名した.



Fig. 3 Characterization of MccSep. (A) UV-vis absorption spectrum of native MccSep isolated from *G. sulfurreducens* PCA. The protein (0.7 mg/mL) was reduced with 19 mM dithionite in 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), followed by the spectrum measurement. (B) Subcellular localization of MccSep. Subcellular fractions of *G. sulfurreducens* PCA were analyzed by western blotting using an anti-GSU2936 antibody. The sizes of marker proteins were indicated.

MccSepの細胞内局在

SignalP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/ services/SignalP-6.0/) (Teufel et al., 2022) および PSORTb 3.0 (https://www.psort.org/psortb/) (Yu et al., 2010) プログラムによる解析では、MccSepは25ア ミノ酸のN末端シグナルペプチドを持ち,Sec シグナル ペプチダーゼ経路によって切断されるペリプラズム局在 性タンパク質であると予測された. エドマン分析により 決定された精製 MccSepのN末端配列は、アミノ酸残 基 26-39 の配列と一致した. G. sulfurreducens PCAの外 膜,内膜,ペリプラズム,細胞質の各細胞画分に対して 抗GSU2936抗体で検出したウエスタンブロット解析で は、MccSep がペリプラズムに局在することが示された (Fig.3B). これらの結果から, MccSep はN末端シグ ナルペプチド(アミノ酸残基1-25)によってペリプラ ズムに誘導され、これが切断されることで成熟 MccSep としてペリプラズムに局在すると考えられた.

リコンビナント MccSepの調製と精製

MccSepの構造機能特性を更に詳細に調べるため、大 腸菌を宿主とした MccSep 遺伝子 (esuD)の発現を試み たが、大腸菌内では esuD の読み枠内 UGA コドンで翻訳 が停止してしまい, 全長の MccSep を得ることができな かった. そこで、広域宿主ベクター pMMB206の EcoRI 部位に Ndel と XhoI 認識配列を含むカセット断片を挿入 した pMcas を作製した. MccSep の C 末端に Strep-tag を付加するようにデザインした遺伝子断片を pMcasの NdeIとXhoIの間に挿入することで、pMcasMccSep-Strep を得た. pMcasMccSep-Strep を esuD 遺伝子欠損 株(AesuD)株に導入し、培養後の菌体から得られた菌 体破砕抽出液に対して抗 2936 抗体を用いてウエスタン ブロット解析したところ, リコンビナント MccSep の発 現が確認された.本菌体破砕抽出液をStrep-Tactinアフィ ニティーカラムと Superdex 200 Increase 10/300 GLゲ ルろ過カラムを用いて,SDS-PAGE分析において電気 泳動的に均一になるまで精製した. ジチオナイト還元し たリコンビナント MccSep の UV-vis 吸収スペクトルを 測定したところ,ネイティブの MccSep のものとほぼ同 様の吸収スペクトルの特徴を示した.

MccSepの酵素活性

細菌のマルチヘムシトクロム c (MHC) は大きなタ ンパク質ファミリーを形成し,硫黄と窒素の生物地球化 学的サイクルに関与する代謝経路で中心的な役割を果た すことが近年明らかになりつつある (Simon et al., 2011). 具体的には,亜硝酸塩 (Einsle, 2011; Polyakov et al., 2009),ヒドラジン (Shimamura et al., 2007),亜 硫酸塩 (Hermann et al., 2015; Shirodkar et al., 2011), チオ硫酸塩/四チオン酸塩 (Brito et al., 2015; Liu et al., 2013) などを基質とする酵素が報告されており,それ らは細菌の異化的硝酸塩/亜硝酸還元,硝化,嫌気性ア ンモニア酸化,および硫黄化合物の還元/酸化を担うと 考えられている.そこで,MccSepは既知のMHCとのア ミノ酸配列相同性は 30%未満と低いが,MHC 酵素と類 似した酵素活性を有する可能性を考えた.そこで、人工 電子供与体としてジチオナイトで還元したメチルビオロ ゲンを用いた嫌気的アッセイ系により、既知のMHCの 基質およびそれらの類縁体に対する MccSepの酵素活性 を調べた.その結果、ポリスルフィドと亜セレン酸塩に 対する還元活性を示した.速度論解析を行ったところ、 MccSepはポリスルフィドに対して、亜セレン酸塩より も高い V_{max}値および低い K_{0.5}値を示し、V_{max}/K_{0.5}値はポ リスルフィドを基質にした場合の方が約 10 倍高いこと が示された(Table 1).また、いずれの基質に対しても アロステリック効果が見られた.

MccSepのX線結晶構造解析

本精製タンパク質を用いて結晶化条件を検討し、ハン ギングドロップ蒸気拡散法により MccSep の深赤色結 晶を得た. ネイティブタンパク質のデータセットとヨウ 素誘導体のX線回折データセットを収集し、単一同形 置換法によって1.90Åの分解能で MccSepの結晶構造 を決定した (Fig.4A). MccSep は非対称ユニットに四 量体として存在し、これはサイズ排除クロマトグラ フィー解析によって溶液中で決定されたホモ四量体構造 (200kDa) と一致していた. モノマーは、キャップと 茎を持つキノコのような構造を形成していた (Fig.4B). モノマー当たり5つのc型ヘムが各CxxCHモチーフの システイン残基に共有結合していた(Fig.4B). これら 5つのヘムの空間的配置は、アミノ酸配列や高次構造上 の類似性がほとんどない W. succinogenes の亜硫酸還元 酵素 MccA (Hermann *et al.*, 2015) などと重なっていた. 5つのうち4つのヘムについては、ヘム鉄の2つの軸配 位子がいずれもヒスチジン残基であったが、1つのヘム の場合のみ, His122 と Cys239 が配位していた (Fig. 4C). このHis/Cys軸配位は比較的まれであるが、硫酸還元 Desulfovibrio desulfuricans 由来 DsrJ (Pires et al., 2006). Rhodovulum sulfidophilum 由来チオ硫酸酸化酵素 SoxAX サブユニット(Bamford et al., 2002) および紫色硫黄細 菌由来二機能性チオ硫酸デヒドロゲナーゼ・テトラチオ

 Table 1
 Kinetic parameters of MccSep^a

Substrate	$V_{\rm max}$ (µmol MV ^{•+} min ⁻¹ mg ⁻¹)	<i>K</i> _{0.5} (mM)	h^b	$V_{\rm max}/K_{0.5}$ (µmol MV ^{•+} min ⁻¹ mg ⁻¹ mM ⁻¹)
Polysulfide	120	0.19	2.0	630
Selenite	62	1.1	1.4	56

^{*a*}The kinetic parameters were obtained from the best fits to triplicate data using GraphPad Prism 10, based on the allosteric sigmoidal equation.

^b Hill coefficient.



Fig. 4 Crystal structure of MccSep. (A) Structure of MccSep tetramer. (B) The monomer structure shown as cartoon representation. Hemes are shown as stick models. (B) Close up view of the active site heme. Cys239, Sec325, and Cys240 were positioned close to one another. His122 is also depicted.

ン酸還元酵素 TsdA (Kurth et al., 2016) などの硫黄代 謝関連 MCH 酵素が報告されている.これらの硫黄代謝 酵素において, His/Cys 配位のへムは触媒作用に関わる と提案されている. MccSep においては, His/Cys 配位 型へムの近傍にはセレノシステイン残基 (Sec325) が 存在していた (Fig.4C).Sec325 をアラニンあるいはシ ステインで置換した変異型酵素はポリスルフィドおよび 亜セレン酸に対する活性を失ったことから,それら残基 と近傍のヘムが活性中心であると考えられた.また, C239A は活性を失った一方,C240A は野生型酵素と同 等の活性を示した.電子供与体によって酵素表面のヘム に供給された電子が,中間のヘムを介して His/Cys 配位 型へムに伝達され,Sec325 および Cys239 を介した基質 の還元反応に使われると考えられた.

esuD 遺伝子欠損株の作製と表現型解析

MccSepのG. sulfurreducens PCA 菌体における生理的 機能を調べるため, esuD 遺伝子の上流領域と下流領域 のそれぞれ約 500 bp の間にカナマイシン耐性遺伝子を 挿入した遺伝子破壊用 DNA 断片を PCR で作製し, これ を用いた相同組換えによって, G. sulfurreducens PCAの



Fig. 5 Essential role of the *esuD* gene in sulfur reduction in *G. sulfurreducens* PCA. (A) Sulfur-reduction halo assay. The parent strain *G. sulfurreducens* PCA (PCA), the *AesuD* strain, and the *AesuD* strain complemented with a plasmid (pMcasMccSep) expressing MccSep were inoculated onto the NBAFYE agar medium containing elemental sulfur and grown anaerobically for 4 days. (B) Schematic drawing illustrating S₈ reduction by *G. sulfurreducens* PCA, highlighting the essential role of MccSep in S_n²⁻ reduction and HS⁻ formation to facilitate S₈ respiration.

esuD遺伝子破壊株(△esuD)を得た.不溶性の元素状 硫黄を含む NBAFYE 寒天培地に G. sulfurreducens PCA 親株をスポットすると、コロニーの周囲に透明なハロの 拡大が見られたことから(Fig.5A),本菌の元素状硫黄 呼吸において、生成物として生じた硫化物イオンが培地 中の元素状硫黄と反応して可溶性のポリスルフィドを生 成し、これが本菌に取り込まれて還元利用されると考え られた (Fig.5B). 本方法により解析を行ったところ, △esuD 株の元素状硫黄還元能は親株よりも顕著に低下し ていた(Fig.5A). *esuD*発現プラスミド(pMcasMccSep) を ∆esuD 株に導入すると、硫黄還元表現型がほぼ完全 に相補された(Fig.5A). さらに,元素状硫黄を唯一の 電子受容体として含む FWA 液体最小培地においても, △esuD 株の生育は親株と比較して著しく遅延したことか ら, MccSep が細菌の硫黄呼吸に重要であると結論づけ た.

三原久明



Fig. 6 Organization of the Esu operon genes in the genome of *G. sulfurreducens* PCA. Characteristics or predicted functions of the putative gene products were as follows: a transcriptional regulator, *esuR*; a sulfur transferase, *esuA*; an outer membrane porin, *esuB*; a sulfur-carrier protein, *esuC*; polysulfide reductase MccSep, *esuD*; multiheme cytochrome *c*, *esuE*; multiheme cytochrome *c*, *esuF*; a cytochrome *bc*-like complex, *esuGHIJ*.

元素状硫黄還元オペロン(Esu オペロン)の解析

MccSep が関わる硫黄呼吸の分子機構についての手が かりを求めて、esuD 遺伝子周辺の遺伝子群について調 べたところ, G. sulfurreducens PCAのゲノム上で, esuD は他9つの遺伝子とともにオペロン様構造を構成してい た (Fig.6). esuD の上流には, 硫黄転移酵素, 外膜ポー リン,低分子硫黄キャリアタンパク質をコードすると予 測される esuA, esuB, esuC が存在していた. そこで, esuA. esuB. esuCの遺伝子産物は菌体外から外膜を介 してペリプラズムにポリスルフィドを取り込む装置であ る可能性を考えた. また、esuAのさらに上流には、推 定転写因子をコードする esuR が存在していた.一方, esuDの下流には、MHCをコードすると予測される esuE および esuF,シトクロム bc 複合体様複合体をコードす る可能性のある esuGHIJ が見出された. これらの遺伝子 産物については、キノール:シトクロム c 酸化還元酵素 として,硫黄呼吸に関与する可能性が考えられた.

esuAから esuJ までの遺伝子が実際にオペロンとして 転写されるのか調べた. G. sulfurreducens PCA 菌体から mRNAを精製し,これを鋳型とした RT-PCR を行った結果, esuA から esuJ までのいずれの ORF 間の断片についても DNA 断片の増幅が見られたことから, esuABCDEFGHIJ はオペロンを構成することが示された.

esuABCDEFGHIJオペロンが硫黄呼吸に関わるかを調 べるために、ΔesuDと同様な方法で、ΔesuA、ΔesuB、 ΔesuC、ΔesuEFGHIJ、ΔesuRの各遺伝子破壊株を作製 した.得られた各遺伝子破壊株について、元素状硫黄含 有 NBAFYE 寒天培地を用いた硫黄呼吸ハロアッセイを 行った.その結果、ΔesuRを除く全ての遺伝子破壊株に おいて、ΔesuDの表現型と同様に著しいハロ形成能の低 下が認められた(Fig.7).この結果から、本Esu オペ ロンは硫黄呼吸に関わることが示された.

Esu オペロン遺伝子の元素状硫黄による発現誘導 Esu オペロンの硫黄呼吸への関与について更に情報を



Fig.7 Genetic analysis of the role of the Esu operon genes in sulfur respiration by sulfur-reduction halo assay. G. sulfurreducens PCA (PCA), *AesuR*, *AesuA*, *AesuB*, *AesuC*, *AesuD*, and *AesuEFGHIJ* were inoculated onto NBAFYE agar medium supplemented with elemental sulfur and grown anaerobically for 4 days.

得るため、培地への元素状硫黄の添加がEsu オペロン 遺伝子の発現誘導に与える影響を定量 RT-PCR により調 べた. 元素状硫黄添加培地と同非添加培地を用いてG. sulfurreducens PCAを培養し、得られた各菌体から精製 したmRNAを鋳型として, esuR, esuA, esuB, esuC, esuD, esuEの各遺伝子に対して定量的逆転写PCRを行っ た. その結果, esuEを除くこれらいずれの遺伝子につ いても、元素状硫黄の培地添加により有意に転写量が増 加していた(Fig.8A).次に、培地への元素状硫黄の添 加が MccSep, EsuA, EsuB のタンパク質量に与える影 響を、各タンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブ ロットにより調べた. その結果, いずれも元素状硫黄添 加によってタンパク質量が増加しており、特に MccSep と EsuB は 著 し く 増 加 し て い た (Fig. 8B). 以 上 よ り, 元素状硫黄の培地への添加はEsu オペロンの発現を正 に制御することが示された.



Fig. 8 Induction of Esu operon gene expression by addition of elemental sulfur. (A) Quantitative RT-PCR analysis of Esu operon gene expression. G. sulfurreducens PCA cells were anaerobically grown in NBAFYE medium without (white bars) or with (black bars) 0.1 % (w/v) elemental sulfur for 36h before harvesting the cells. *p<0.05. (B) Western blot analysis of crude extracts from G. sulfurreducens PCA grown in NBAFYE medium without (-) or with (+) elemental sulfur.

EsuA の硫黄転移酵素活性

ロダネーゼは、一般に、活性中心システイン残基を介 してチオ硫酸の硫黄原子をシアン化物イオンに転移する 反応を触媒し、解毒に関わる硫黄転移酵素として知られ てきた.しかし近年、ロダネーゼ様ドメインは生物種間 わず広く分布するタンパク質にみられるユビキタスなド メインであり、ロダネーゼ様タンパク質群は多様性に富 んだファミリーを形成し、硫黄含有補因子の生合成など 様々な硫黄代謝に関与することがわかってきた(Cipollone *et al.*, 2007; Müeller, 2006). EsuAのアミノ酸配列を解 析したところ、本タンパク質は2つのロダネーゼドメイ ンを有していた.これら2つのドメインには、Cys129 と Cys330が各々存在していた.また、EsuAのN末端 にはリポタンパク質シグナルが存在し、膜局在すると予 測された.さらに、C末端には Cys468 が存在しており、 Cys468 の近傍領域は天然変性領域と考えられた.

EsuAの硫黄転移酵素としての機能を調べるために, リポタンパク質シグナル配列と予測された1-29アミノ 酸残基をコードする領域を削除した esuA 遺伝子を pColdIベクターに挿入し、C末端にHis-tagを融合させ たEsuAを生産する発現プラスミドを作製した。本 EsuA 発現プラスミドを E. coli BL21 (DE3) に導入し, 発 現した EsuAを Ni-アフィニティークロマトグラフィーに より電気泳動的に均一に精製した. リコンビナントEsuA の基質特異性を検討したところ、一般的なロダネーゼの 硫黄供与体であるチオ硫酸よりも、ポリスルフィドに対 して約 25,000 倍高い反応効率 (Vmax/Km) を示すことが 明らかとなった(Table 2). さらに. *b*-トルエンチオス ルホン酸,メタンチオスルホン酸,過硫化グルタチオン, 3-メルカプトピルビン酸に対しても活性が認められた. また、ポリスルフィドを基質とするロダネーゼ活性の最 適pHは9.0, 最適温度は60℃であった. これらの結果よ り、EsuAはポリスルフィドを最適な基質とする高効率 なロダネーゼ様タンパク質であることが示された.

Substrate	$V_{ m max}$ (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _m (mM)	$V_{ m max}/K_{ m m}$ (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹ mM ⁻¹)
Polysulfide	24,000	0.20	120,000
<i>p</i> -Toluenethiosulfonate	3,600	0.10	36,000
Methanethiosulfonate	23,000	0.70	33,000
Glutathione persulfide	23,000	1.3	18,000
Thiosulfate	31	6.2	4.9
3-Mercaptopyruvate	56	84	0.67

 Table 2
 Kinetic parameters of EsuA^a

^a The kinetic parameters were obtained from the best fits to triplicate data using GraphPad Prism 10, based on the Michaelis-Menten equation.

触媒機能に重要なアミノ酸残基を調べるため、2つの ロダネーゼ様ドメインに存在するCys129および Cys330,ならびにC末端のCys468をそれぞれアラニン に置換した変異型酵素(C129A,C330A,C468A)を 作製し、野生型酵素と同様に精製した.C129Aはポリ スルフィドおよびチオ硫酸に対して野生型EsuAとほぼ 同程度の活性を保持していた.C468Aはポリスルフィ ドに対して野生型と同等の活性を示したが、チオ硫酸に 対しては、野生型の約50%に活性が低下した.一方、 C330Aは両基質に対する活性が野生型酵素の1/650以下 に低下していた.以上の結果から、Cys330が硫黄転移 触媒機能に必須であると結論づけた.

EsuBの機能に必須なシステイン残基

EsuBのアミノ酸配列の解析により、本タンパク質は N 末端に Sec シグナルペプチドをもつ外膜ポーリン様タ ンパク質であることがわかった. AlphaFold 予測構造に おいて、EsuBはポーリンの特徴であるβ-バレル構造を 形成していた.興味深いことに,孔の中央付近に近縁ホ モログ間のみに高度に保存されている Cys147 が存在し ていた. そこで. EsuBがCvs147を介して外膜の菌体 外側からペリプラズム側にポリスルフィドを取り込む可 能性を考え、Cvs147の硫黄呼吸における機能を遺伝学 的相補実験により調べた.上述したように、ΔesuB株は 元素状硫黄を含む NBAFYE 寒天培地上で著しい硫黄呼 吸能欠損表現型を示す。野生型 esuB 発現プラスミド (pMcasEsuB) を ∆esuB 株に導入すると, 硫黄呼吸表 現型がほぼ完全に相補された(Fig.9A).一方. Cvs147 をAlaで置換したC147A変異体を発現するプラスミド (pMcasEsuB-C147A) を ∆esuB 株に導入した株では、 硫黄呼吸能を回復することはできなかった(Fig.9A). この結果より, EsuBの Cys147 は G. sulfurreducens PCA の硫黄呼吸に重要であることが示された.

EsuC の機能に必須なシステイン残基

EsuCは104アミノ酸残基から成り、N末端にはSec シグナルペプチドを有し、その局在はペリプラズムであ ると予測された.また、そのC末端には近縁ホモログ に保存されたCys104が存在し、C末端付近は天然変性 領域が予測された.C末端にCys残基を有する硫黄キャ リアタンパク質は硫黄酸化経路等でいくつか報告されて いる(Stockdreher *et al.*, 2012; Zander *et al.*, 2011).そ れら既知の硫黄キャリアタンパク質とEsuCの間に有意 なアミノ酸配列相同性は認められない.そこで、EsuC はCys104を介して、硫黄呼吸における新奇硫黄キャリ アタンパク質として機能する可能性を考えた.上述の EsuBの解析と同様な遺伝学的相補実験により、EsuC



Fig. 9 Genetic analysis of the role of the Cys residues of EsuB and EsuC in sulfur respiration. (A) *G. sulfurreducens* PCA (PCA), *AesuB*, *AesuB* harboring pMcasEsuB, and *AesuB* harboring pMcasEsuB-C147A were inoculated onto NBAFYE agar medium supplemented with elemental sulfur and grown anaerobically. (B) *G. sulfurreducens* PCA (PCA), *AesuC*, *AesuC* harboring pMcasEsuC, and *AesuC* harboring pMcasEsuC- Δ C104 were inoculated onto NBAFYE agar medium supplemented with elemental sulfur.

の Cys104 の硫黄呼吸における機能を調べた.野生型 esuC発現プラスミド (pMcasEsuC) を Δ esuC 株に導入 すると,硫黄呼吸表現型が相補されたが,EsuC の Cys104 を削った Δ C104 変異体を発現するプラスミド (pMcasEsuC- Δ C104) を Δ esuC 株に導入した場合,硫 黄呼吸能は回復しなかった (Fig.9B). この結果から, EsuC の Cys104 は G. sulfurreducens PCA の硫黄呼吸に おいて重要であることが示された.

EsuA, EsuB, EsuCの細胞内局在とEsuABC 複合体構 造予測

G. sulfurreducens PCA 親株の菌体から各細胞画分を調



Fig. 10 Subcellular localization of EsuA, EsuB, and EsuC. Subcellular fractions of *G. sulfurreducens* PCA were analyzed by western blotting using an antibody against each protein. PP, periplasmic fraction; CP, cytosolic fraction; IM, inner membrane fraction; OM, outer membrane fraction.

製し、EsuA、EsuB、EsuCに対する各抗体を用いたウ エスタンブロットにより、これらタンパク質の細胞内局 在を解析した.その結果、リポタンパク質と予測された ポリスルフィド硫黄転移酵素であるEsuAは、主に外膜 画分と内膜画分に検出された(Fig.10).ポーリンタン パク質EsuBは予測通り外膜画分に局在していた.ExtJ はペリプラズム画分に検出された。

以前の解析により,親株の外膜画分をゲルろ過カラム クロマトグラフィーで分析すると、EsuBの大部分が分 子質量288kDaに相当する画分でEsuAと共に溶出する ことが示されている (Jahan et al., 2019). 一般的なポー リンと同様にEsuBは3量体を形成すると予測し、EsuA が各 EsuB モノマーに相互作用するとした場合, EsuA₃-EsuB₃ ヘテロ6量体の推定分子質量は265kDaであり、 両者が共溶出された画分から計算した分子質量に近い値 を示した. そこで、EsuAとEsuBに加えて、EsuCも相 互作用する可能性を考えた. EsuABC 複合体の AlphaFold 予測構造では, EsuAのC末端天然変性領域 およびEsuCのC末端天然変性領域がEsuBの孔中に差 し込まれており、EsuAのC末端Cys468、EsuCのC末 端 Cys104, EsuB の Cys147 が相互作用可能な位置に近 接していた (Fig.11A). この予測構造は, EsuAのポリ スルフィド基質に対する触媒作用により活性中心 Cys330上に生じるペルスルフィド硫黄が、EsuAの Cys468に転移された後に、EsuBのCys147を介して EsuCのCvs104へとリレーされる可能性を示唆してい



Fig. 11 Predicted complex structures by AlphaFold 3. (A) A predicted structure of the potential EsuABC complex depicting the positions of Cys468 of EsuA, Cys147 of EsuB, and Cys104 of EsuC. (B) A predicted structure of the potential MccSep-EsuC complex.

ると考えられる. さらに, いずれもペリプラズムに局在 する EsuC と EsuD の複合体の AlphaFold 予測構造では, EsuC の Cys104 を含む C 末端領域が EsuD の分子表面 から活性中心に繋がるトンネルに差し込まれており, EsuC の Cys104 にリレーされた硫黄原子が EsuD の基質 を与える可能性も示唆された (Fig.11B).

要 約

本研究では, Geobacter sulfurreducens PCA における硫 黄呼吸系の分子機構の解明を目指し、ポリスルフィド還 元酵素の構造 — 機能相関解析ならびに本菌の硫黄呼吸 オペロン構成遺伝子群の酵素学的および遺伝学的解析を 行った. G. sulfurreducens PCAゲノム上の esuD によっ てコードされるタンパク質は、5つのヘムと1つのセレ ノシステイン残基を有する新奇タンパク質 MccSep であ ることを示した. MccSep はペリプラズムに局在し、ポ リスルフィド還元活性を示す酵素であることを明らかに した. MccSep の X 線結晶構造を 1.90 Å 分解能で決定し た. MccSep はホモ四量体であり, モノマー当たり5つ のc型ヘムが各CxxCHモチーフのシステイン残基に共 有結合していた. His/Cys 配位型ヘムの近傍には Cys239 と Sec325 が存在しており、これらはいずれも本酵素の 触媒活性に必須であることから、本酵素の活性中心を形 成すると考えられた. esuD 遺伝子破壊株の元素状硫黄還 元能および元素状硫黄培地での生育は G. sulfurreducens PCA 親株よりも顕著に低下していたことから、MccSep が細菌の硫黄呼吸に重要であることを明らかにした. G. sulfurreducens PCAゲノム上で esuD 遺伝子は他9つの遺 伝子とともに esuABCDEFGHII はオペロンを構成する ことを見いだした.本オペロンには、菌体外から外膜を 介してペリプラズムにポリスルフィドを取り込む装置お よび呼吸に関わるシトクロム bc 複合体様複合体をコー ドする可能性のある遺伝子群が見いだされた. これらの 遺伝子を破壊した △esuA, △esuB, △esuC, △esuEFGHII の各遺伝子破壊株において、元素状硫黄寒天培地上での ハロ形成が見られなくなったことから、本 Esu オペロ ンは硫黄呼吸に関わることが示された.本オペロン遺伝 子は元素状硫黄の培地への添加によって正に制御される ことを見いだした. 酵素学的解析により EsuA はポリス ルフィドに対して高い触媒効率を示す硫黄転移酵素であ ることを見いだした. EsuAのC330A 変異体は著しく活 性を低下させたことから、Cys330活性中心残基である ことが示された.外膜ポーリン様タンパク質 EsuBの AlphaFold 予測構造において、その孔の中央付近に保存 性の高い Cys147 を見いだした. Cys147 を Ala で置換し たC147A変異体を発現するプラスミドを∆esuB株に導 入した株では, 硫黄呼吸能は回復しなかったことから, EsuBのCvs147は G. sulfurreducens PCAの硫黄呼吸に 重要であることが示された. EsuCのC末端に存在する Cys104を削った ΔC104 変異体を発現するプラスミドを △esuC 株に導入した場合, 硫黄呼吸能は回復しなかった ことから、EsuCのCys104はG. sulfurreducens PCAの 硫黄呼吸において重要であることが示された. EsuA. EsuB, EsuCの細胞内局在解析により, EsuAは主に外 膜画分と内膜画分に、EsuB は外膜画分に、ExtJ はペリ プラズム画分に局在することを示した.本研究で得られ た以上の結果は、細菌の硫黄呼吸に関わる分子メカニズ ムについて新たな洞察を与えた.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 三原久明. 2022. 新奇マルチヘムセレンタンパク質が担う 細菌の硫黄還元. 日本ビタミン学会第74回大会(6月26日, 福岡)
- 藤田大樹, Jahan, M.I., 石戸雄大, 伊豆由記子, 井上真男, 青 野陸, 三原久明. 2022. Geobacter sulfurreducensの硫黄還元 に関わる外膜ポリン-硫黄転移酵素複合体. 第95回日本生 化学会大会(11月10日,名古屋)
- 澤すずな,青野陸,井上真男,三原久明.2022.硫黄還元細菌 Geobacter sulfurreducens由来転写因子ExtRの認識DNA領域 およびエフェクター分子の同定.第95回日本生化学会大会 (11月11日,名古屋)
- 4) Mihara, H., Yoshizawa, T., Izu, Y., Jinno, M., Inoue, M., Aono, R., Tobe, R. & Matsumura, H. 2022. Characterization

of pentaheme cytochrome *c* selenoprotein, a novel polysulfide/ selenite reductase, from *Geobacter sulfurreducens*. The 8th International Symposium on Metallomics (July 14, Kanazawa, Japan)

- 5) Mihara, H., Yoshizawa, T., Izu, Y., Jinno, M., Inoue, M., Aono, R., Tobe, R. & Matsumura, H. 2022. Structure and function of a novel pentaheme cytochrome *c* selenoprotein involved in bacterial sulfur respiration. 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (December 3, Kobe, Japan)
- 5) 井上真男, 澤すずな, 青野陸, 三原久明. 2023. Geobacter sulfurreducens由来LysR型転写因子ExtRのDNA結合は多硫 化物イオンによって抑制される. 日本農芸化学会2023年度 大会(3月16日, オンライン)
- 7) Mihara, H., Yoshizawa, T., Izu, Y., Inoue, M., Aono, R. & Matsumura, H. 2023. A novel beterial selenoprotein involved in sulfur respiration. 9th International Selenium Conference Focused on Selenium in Chemistry, Biology, and Medicine (June 28, Daejeon, Korea)
- 8) 井上真男, 伊豆由記子, 青野陸, 越智杏奈, 三原久明. 2024. セレン含有マルチヘムc型シトクロムは細菌特有の新奇ポ リスルフィド還元酵素である.第7回日本セレン研究会 (3月3日, 東京)
- 9) 井上真男, 伊豆由記子, 青野陸, 越智杏奈, 三原久明. 2024. セレノシステイン含有マルチヘムシトクロムは細菌ドメ インに広く保存されたポリスルフィド還元酵素である.日 本農芸化学会2024年度大会(3月25日, 東京)
- 10) 工藤碧斗,藤田大樹,井上真男,青野陸,越智杏奈,三原久明. 2024. ロダネーゼ様タンパク質ExtHの硫黄転移活性に関わるCys残基の同定.日本農芸化学会2024年度大会(3月25日, 東京)

原著論文

1) Ochi, A. & Mihara, H. 2024. Effects of genetic disruption in thioredoxin and glutathione systems on selenium nanoparticle formation, selenite sensitivity, and selenoprotein biosynthesis in *Escherichia coli*. Metallomics Research 4: reg14-reg20.

その他(総説)

 三原久明. 2023. 新奇マルチヘムセレンタンパク質が担う 細菌の硫黄呼吸. ビタミン 97: 325-331.

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京都大学化学研究所の 栗原達夫教授と研究室の皆様,東北大学大学院農学研究 科の戸部隆太准教授,立命館大学生命科学部生物工学科 応用分子微生物学研究室の青野陸助教,越智杏奈助教, 伊豆由記子研究員,藤田大樹氏,工藤碧斗氏ならびに学 生諸氏に感謝の意を表します. 文 献

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J. *et al.* 2024. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. Nature **630**: 493–500.
- Bamford, V.A., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesman, M.R., Berks, B.C. & Hemmings, A.M. 2002. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. EMBO J. 21: 5599-5610.
- Bb Jørgensen, A.J.F.A.P., Jørgensen, B.B., Findlay, A.J. & Pellerin, A. 2019. The biogeochemical sulfur cycle of marine sediments. Front. Microbiol. 10: 849–849.
- Böck, A. 2000. Biosynthesis of selenoproteins-an overview. Biofactors 11: 77-78.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A. 1994. Bacterial sulfur reduction in hot vents. FEMS Microbiol. Rev. 15: 65–77.
- Brito, J.A., Denkmann, K., Pereira, I.A., Archer, M. & Dahl, C. 2015. Thiosulfate dehydrogenase (TsdA) from *Allochromatium vinosum*: structural and functional insights into thiosulfate oxidation. J. Biol. Chem. **290**: 9222–9238.
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. & McInerneyl, M.J. 1994. Oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3752–3759.
- Cipollone, R., Ascenzi, P. & Visca, P. 2007. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. IUBMB Life **59**: 51–59.
- Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J. & Lovley, D.R. 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3180–3187.
- Einsle, O. 2011. Structure and function of formate-dependent cytochrome *c* nitrite reductase, NrfA. Methods Enzymol. **496**: 399–422.
- Findlay, A.J. & Kamyshny, A. 2017. Turnover rates of intermediate sulfur species (S_x²⁻, S⁰, S₂O₃²⁻, S₄O₆²⁻, SO₃²⁻) in anoxic freshwater and sediments. Front. Microbiol. 8: 2551.
- Fujita, M., Mihara, H., Goto, S., Esaki, N. & Kanehisa, M. 2007. Mining prokaryotic genomes for unknown amino acids: A stop-codon-based approach. BMC Bioinformatics 8: 225–225.
- Grein, F., Ramos, A.R., Venceslau, S.S. & Pereira, I.A.C. 2013. Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. Biochim. Biophys. Acta 1827: 145–160.
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M. & Stetter, K.O. 1998. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. FEMS Microbiol. Rev. 22: 353–381.
- Hermann, B., Kern, M., La Pietra, L., Simon, J. & Einsle, O. 2015. The octahaem MccA is a haem *c*-copper sulfite reductase. Nature **520**: 706–709.
- Jahan, M.I., Juengwiwattanakitti, P., Izu, Y., Tobe, R., Imai, T. & Mihara, H. 2019. Selenite uptake by outer membrane porin ExtI and its involvement in the subcellular localization of rhodanese-like lipoprotein ExtH in *Geobacter sulfurreducens*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **516**: 474-479.
- Jelen, B., Giovannelli, D., Falkowski, P.G. & Vetriani, C. 2018. Elemental sulfur reduction in the deep-sea vent thermophile, *Thermovibrio ammonificans*. Environ. Microbiol. **20**: 2301–2316.
- Klimmek, O., Kreis, V., Klein, C., Simon, J., Wittershagen, A. & Kröger, A. 1998. The function of the periplasmic Sud protein

in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. Eur. J. Biochem. **253**: 263-269.

- Krafft, T., Gross, R. & Kroger, A. 1995. The function of *Wolinella succinogenes psr* genes in electron transport with polysulphide as the terminal electron acceptor. Eur. J. Biochem. 230: 601–606.
- Kurth, J.M., Brito, J.A., Reuter, J. *et al.* 2016. Electron accepting units of the diheme cytochrome *c* TsdA, a bifunctional thiosulfate dehydrogenase/tetrathionate reductase. J. Biol. Chem. **291**: 24804–24818.
- Liang, J., Huang, H., Wang, Y., Li, L., Yi, J. & Wang, S. 2022. A Cytoplasmic NAD (P)H-dependent polysulfide reductase with thiosulfate reductase activity from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Microbiol. Spectr. 10: e0043622.
- Liebschner, D., Afonine, P.V., Baker, M.L. *et al.* 2019. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. Acta Crystallogr. D Struct. Biol. **75**: 861–877.
- Liu, Y.W., Denkmann, K., Kosciow, K., Dahl, C. & Kelly, D.J. 2013. Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria. Mol. Microbiol. 88: 173–188.
- Lovley, D.R. & Phillips, E.J. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1472–1480.
- Methé, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A. et al. 2003. Genome of Geobacter sulfurreducens: Metal reduction in subsurface environments. Science 302: 1967–1969.
- Miyatake, H., Hasegawa, T. & Yamano, A. 2006. New methods to prepare iodinated derivatives by vaporizing iodine labelling (VIL) and hydrogen peroxide VIL (HYPER-VIL). Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **62**: 280–289.
- Morales, V.M., Backman, A. & Bagdasarian, M. 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. Gene 97: 39–47.
- Moulis, J.M. & Meyer, J. 1982. Characterization of the seleniumsubstituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Biochemistry 21: 4762–4771.
- Müeller, E.G. 2006. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. Nat. Chem. Biol. 2: 185–194.
- Pfennig, N. & Biebl, H. 1976. Desulfuromonas acetoxidans gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetateoxidizing bacterium. Arch. Microbiol. 110: 3-12.
- Pires, R.H., Venceslau, S.S., Morais, F., Teixeira, M., Xavier, A.V. & Pereira, I.A. 2006. Characterization of the *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 DsrMKJOP complex – a membranebound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway. Biochemistry 45: 249–262.
- Pjevac, P., Kamyshny, A., Jr., Dyksma, S. & Mussmann, M. 2014. Microbial consumption of zero-valence sulfur in marine benthic habitats. Environ. Microbiol. 16: 3416–3430.
- Polyakov, K.M., Boyko, K.M., Tikhonova, T.V. *et al.* 2009. Highresolution structural analysis of a novel octaheme cytochrome *c* nitrite reductase from the haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens.* J. Mol. Biol. **389**: 846–862.
- Rabinowitz, J.C. 1978. Analysis of acid-labile sulfide and sulfhydryl

groups. Methods Enzymol. 53: 275-277.

- Santesmasses, D., Mariotti, M. & Gladyshev, V.N. 2020. Bioinformatics of selenoproteins. Antioxid. Redox Signal. 33: 525-536.
- Schut, G.J., Bridger, S.L. & Adams, M.W.W. 2007. Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: Characterization of a coenzyme A-dependent NAD (P) H sulfur oxidoreductase. J. Bacteriol. 189: 4431-4441.
- Shimamura, M., Nishiyama, T., Shigetomo, H., Toyomoto, T., Kawahara, Y., Furukawa, K. & Fujii, T. 2007. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 1065–1072.
- Shirodkar, S., Reed, S., Romine, M. & Saffarini, D. 2011. The octahaem SirA catalyses dissimilatory sulfite reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. Environ. Microbiol. 13: 108–115.
- Simon, J., Kern, M., Hermann, B., Einsle, O. & Butt, J.N. 2011. Physiological function and catalytic versatility of bacterial multihaem cytochromes *c* involved in nitrogen and sulfur cycling. Biochem. Soc. Trans. **39**: 1864–1870.
- Stockdreher, Y., Venceslau, S.S., Josten, M., Sahl, H.G., Pereira, I.A. & Dahl, C. 2012. Cytoplasmic sulfurtransferases in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC. PLoS One **7**: e40785.
- Teufel, F., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R. *et al.* 2022. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nat. Biotechnol. 40: 1023–1025.
- Vandenbergh, P.A., Bawdon, R.E. & Berk, R.S. 1979. Rapid test for determining the intracellular rhodanese activity of various bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 29: 339–344.

- Wasmund, K., Mussmann, M. & Loy, A. 2017. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. Environ. Microbiol. Rep. 9: 323–344.
- Watanabe, T. & Honda, K. 1982. Measurement of the extinction coefficient of the methyl viologen cation radical and the efficiency of its formation by semiconductor photocatalysis. J. Phys. Chem. 86: 2617–2619.
- Watkinson, J.H. 1966. Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene. Anal. Chem. 38: 92–97.
- Yu, H., Schut, G.J., Haja, D.K., Adams, M.W.W. & Li, H. 2021. Evolution of complex I–like respiratory complexes. J. Biol. Chem. 296: 100740–100740.
- Yu, H., Haja, D.K., Schut, G.J., Wu, C.H., Meng, X., Zhao, G., Li, H. & Adams, M.W.W. 2020. Structure of the respiratory MBS complex reveals iron-sulfur cluster catalyzed sulfane sulfur reduction in ancient life. Nat. Commun. 11: 1–13.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R. *et al.* 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. Bioinformatics **26**: 1608–1615.
- Zander, U., Faust, A., Klink, B.U., de Sanctis, D., Panjikar, S., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Friedrich, C.G. & Scheidig, A.J. 2011. Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD. J. Biol. Chem. 286: 8349-8360.
- Zhang, Y. & Gladyshev, V.N. 2005. An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. Bioinformatics 21: 2580–2589.

腫瘍内複合細菌 AUN を用いるがん診断・治療 都 英次郎

北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 〒923-1292 石川県能美市旭台1-1

Intratumoral bacterial consortium AUN for cancer treatments Eijiro Miyako

Graduate School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa, 923-1292 Japan

Unveiling biomedical functions of tumor-resident microbiota is challenging for developing advanced anticancer medicines. This study demonstrates that isolated intratumoral bacteria, associated with natural purple photosynthetic bacteria, have inherent biocompatibility and strong immunogenic anticancer efficacies. They preferentially grow and proliferate within a targeted tumor milieu, which effectively causes immune cells to infiltrate the tumor and provoke strong anticancer responses in various syngeneic mouse models, including colorectal cancer, sarcoma, metastatic lung cancer, and extensive drug-resistant breast cancer. Furthermore, these functional bacteria-treated mice exhibit excellent anticancerous responses and have significantly prolonged survival rates with effective immunological memory. Light-harvesting nanocomplexes of microbial consortia of intratumoral bacteria and purple photosynthetic bacteria can diagnose tumors using bio-optical-window near-infrared light, making them useful theranostic agents for highly targeted immunological elimination of the tumor and for precisely marking tumor location.

Key words: Cancer, Cancer therapy, Intratumoral bacteria, purple photosynthetic bacteria

緒 言

悪性腫瘍を取り囲む血管の周囲構造は、正常な血管内 皮細胞とは異なり、がん組織や炎症部位の血管内皮細胞 間には200nm 程度の広い隙間が開口している.このた め、10~100nm 程度にサイズが制御されたナノ粒子は、 EPR(Enhanced Permeation and Retention)効果によっ てがん組織に特異的に集積することが可能である (Matsumura & Maeda, 1986).EPR効果は、ドラッグデ リバリーシステム関連の論文で数多く引用され、がん選 択的化学療法の最も大きな支柱となっている.しかし、 EPR効果に関する疑義,批判も数多く存在する(Wilhelm *et al.*, 2016).実際、固形がんに対しては、がん組織で の血流の不均一性、がん中心部での高い組織圧といった EPR効果(腫瘍選択性)を阻害する環境要因がいくつ もあり、EPR効果そのものが有用ではないという致命 的な欠陥が判明している.また,EPR効果を利用した 薬物担持体は,その研究に長い年月と多大な費用を掛け たにも関わらず,上記の環境要因によりヒト臨床で成功 していない.

腫瘍へのターゲット性能を改善するために,がん細胞 特異的な抗体などを薬物担持体に搭載する戦略がとられ ている(Zinn et al., 2023).例えば,セキツマブ®やア バスチン®といった大腸がんを標的とするモノクロナー ル抗体が既に臨床応用されている.しかし,抗体はがん 細胞を取り囲む厚い組織(間質)を透過することが困難 である.また,抗体の標的となるバイオマーカー(抗原) は患者間で完全には同一でないことから,より高い選択 性と薬効を得るためには各がん患者に適した抗体を利用 する必要性があるが,これも現時点では実現していない. さらに抗体の作製そのものに多大な手間とコストが掛か るため、費用対効果も高いとは言えない.

また,早期肺がん,原発性悪性脳腫瘍,食道がん等を 対象とした光を利用する診断・治療の従来法として,病

E-mail: e-miyako@jaist.ac.jp

巣部分にレザフィリン[®]等の光増感剤を集積させ、そこ に光を照射することにより発生する蛍光ならびに活性酸 素でがんを画像診断し、治療にも応用させる、光線力学 的診断・治療法があるが、生体透過性の低い可視光レー ザーを利用するため深部組織のがん細胞の診断、治療は 容易ではない(Rkein & Ozog, 2014).また、光増感剤 自体のがん細胞特異性も十分ではない.しかも、腫瘍内 は酸素濃度が低いため、光増感剤では効果的に活性酸素 を発生させることが出来ないことが問題となっている.

このような経緯の中,近年,低酸素状態の腫瘍内部で 選択的に集積・生育・増殖が可能な嫌気性微生物(細菌) を利用したがん標的治療に注目が集まっている(Zhou et al., 2018).従来のがん細菌療法は,既に米国や欧州 ではヒトへの臨床試験が行われ,第3相試験に進んでい る例もある.しかし,従来のがん細菌療法は,基本的に は抗がん剤の運搬という,いわゆる従来型のドラッグデ リバリーシステムの概念を出ない.また,使用される細 菌は,多くの場合,遺伝子組換えによって弱毒化したサ ルモネラ菌やリステリア菌であり,体内で再び強毒化す るリスクを常に伴っている.

一方, 腫瘍組織内に細菌が存在していることは古くか ら知られており, 近年の研究では, 腫瘍の種類ごとに独 自の細菌叢が保有されていることが分かっている (Nejman *et al.*, 2020). また, このような腫瘍内細菌叢 が抗がん剤の補助あるいは阻害の要因になっていること も明らかになっている.しかし, 腫瘍内から直接細菌を 取り出し, 細菌そのものをがんの治療薬として活用する 研究は皆無であった.

本研究では、マウス生体内の大腸がん由来腫瘍組織か ら主に3種類の細菌の単離・同定に成功し、これらの細 菌にA-gyo (阿形; Proteus mirabilis), UN-gyo (吽形; *Rhodopseudomonas palustris*), そしてAUN (阿吽; A-gyoとUN-gyoから成る複合細菌)とそれぞれ命名し た (Fig.1) (Goto et al., 2023). これらの細菌を, 大腸 がんを皮下移植した担がんモデルマウスの尾静脈に投与 したところ,低酸素状態の腫瘍環境内で高選択的に集積・ 生育・増殖が可能で、かつ高い抗腫瘍効果を示すことを 発見した.とりわけ、AUNは、単回投与にも関わらず、 A-gyoとUN-gyoの協奏作用により細胞障害性の免疫細 胞を効果的に賦活化し、大腸がん、肉腫(サルコーマ)、 転移性肺がん、薬物耐性乳腺がんといった様々ながん種 に対して強力な抗腫瘍活性を示すことが明らかとなっ た.また、AUNは、生体透過性の高い近赤外光によっ て標的とする腫瘍内で近赤外蛍光を発現することが分 かった. さらに、マウスを用いた生体適合性試験(血液 学的検査,組織学的検査,細菌コロニーアッセイなど) を行った結果,いずれの検査からも AUN そのものが生



Fig. 1 Schematic illustration of AUN.

体に与える影響は極めて少ないことが分かった.

本研究成果は、今回発見した細菌を用いたがんの診断・ 治療法の基礎に成り得るだけでなく、細菌学や腫瘍微生 物学などの研究領域への新しい概念の創出として貢献す ることを期待させるものである.

実験方法

細胞培養と細胞毒性評価

マウス大腸がん細胞(Colon26)は、the Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank より入手 した.マウス肉腫(サルコーマ)細胞(Meth-A)なら びにマウスメラノーマ細胞(B16-F10)は、東北大学加 齢医学研究所(医用細胞資源センター・細胞バンク)よ り得た.薬物耐性乳腺がん細胞(EMT6/AR1)は、KAC Co., Ltd.より得た. Colon26, Meth-A, B16-F10の培養 は、10% fetal bovine serum, 2-mM l-glutamine, 1-mM sodium pyruvate, 1% penicillin-streptomycin (100 IU/ mL)を含むRoswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco)を使用した.EMT6/AR1の培 養は、doxorubicin (1 μ g/mL)を溶解したNo.104培地 (KAC Co., Ltd.)を使用した.細胞は37℃,5%のCO₂ 雰囲気下の加湿チャンバー中で培養した.

細菌培養

本研究で使用した細菌は、National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NBRC) より取得した. *Rhodopseudomonas palustris* (NBRC 16661) ならびに腫瘍から採取した*R. palustris* は、543 ATCC medium 中でタングステンランプ(100W) を照射しながら 26-30 \mathbb{C} の温度の下、ガラスバイアル 中に培地を満たすことにより低酸素条件で培養した. 腫 瘍から採取した Proteus mirabilis も Rhodopseudomonas palustris (NBRC 16661) ならびに腫瘍から採取した R. palustris と同様の条件で培養した. 細菌培養に利用した 試 薬 は, FUJIFILM Wako Pure Chemical な ら び に Nacalai Tesque より入手した.

腫瘍内細菌の単離と培養

全ての動物実験は、北陸先端科学技術大学院大学の動 物実験委員会の承認(承認番号:No. 04-007)を得て実 施した. 4週齢のメスの野生型マウス (n=10; average weight = 15g; BALB/cCrSlc)をJapan SLC, Incより購 入し、一週間馴化させた. Colon26細胞分散液(1× 10^{6} cells) (100 µL) \succeq culture medium/matrigel (Corning) から成る混合溶液(v/v,1:1)をマウス右側面腹部皮 下1ヵ所に投与し、大腸がんモデルマウスを作成した. 約2週間後, 固形がん (~400 mm³) を形成させたマウ スの尾静脈内に R. palustris (5×10⁹CFU/mL)を200 µL 投与した.2日後, 腫瘍内のR. palustrisの存在(R. palustris に由来する近赤外蛍光)を VISQUE™ InVivo Smart-LF (Vieworks) を用いて確認の上, 腫瘍を摘出し、 メスで細かく切断後、ペストルを使って4℃の温度下、 PBS 緩衝液中でホモジナイズした.得られた混合物を 20分間, 15℃, 380rpmの速度で振とうした. 上澄を PBS 緩衝液で10 倍希釈し、サンプル(100 µL)を寒天 培地上に播種し、7日間、嫌気培養した.形成した赤色 の細菌コロニーをいくつかループでピックアップし, 543 ATCC medium 中で タングステンランプを照射しな がら26-30℃の温度で嫌気培養した. その後、システ イン(Cvs)を添加した通常の543 ATCC mediumと Cvs 無添加の 543 ATCC medium で培養し、0.1%デオキ シコール酸を添加した 543 ATCC medium から成る寒天 培地あるいは0.1%デオキシコール酸を添加した Cvs 無 添加の 543 ATCC medium から成る寒天培地上でタング ステンランプを照射しながら26-30℃の温度で嫌気培 養した. 543 ATCC medium から成る寒天培地上の白色 コロニーを. Cvs 無添加の 543 ATCC medium から成る 寒天培地上の赤色コロニーをそれぞれニードルで各1個 ずつピックアップし,543 ATCC medium と Cys 無添加 の 543 ATCC medium で引き続き培養した. 単離・精製 した各細菌を遺伝子同定(株式会社ベックス)し、白色 コロニーの細菌はP. mirabilis, 赤色コロニーの細菌はR. Palustris であることが明らかにした.本研究では、これ らの腫瘍から単離・精製した P. mirabilis, R. Palustris, P. mirabilis と R. Palustris から成る複合細菌をそれぞれ A-gyo, UN-gyo, AUNと呼称する. また, 腫瘍から単離・ 精製した P. mirabilis (A-gyo), R. Palustris (UN-gyo)

の同定は、16S rRNAの高度可変領域の一部または全長 に係る微生物シーケンス(株式会社ベックス)により決 定した.なお、本研究では、*R. Palustris*(NBRC16661) をマウスに接種しているが、腫瘍から単離した株が、接 種した株と同じとは限らない、一方、AUNに含まれる 主要な菌は A-gyo と UN-gyo であるが、他の微生物の混 入は否定できない.

In vivo 抗がん実験と毒性評価

4週齢のメスの野生型マウス(n=5; average weight=15g; BALB/cCrSlc)をJapan SLC, Incより購入し,一週間馴化させた. Colon26細胞分散液(1× 10^6 cells)(100μ L)とculture medium/matrigel(Corning) から成る混合溶液(v/v, 1:1)をマウス側面腹部皮下1ヵ 所に投与し,大腸がんモデルマウスを作成した.約2週 間後,固形がん(~ $400\,\text{mm}^3$)を形成させたマウスの尾 静脈内に各種細菌分散液(AUN=5× 10^9 CFU/mL, A-gyo=5× 10^8 CFU/mL)あるいはPBS緩衝液を各 200μ L投与した.マウスの行動や性状,固形がんサイズ 測定,マウス体重の推移は,毎日実施した.なお,固形 がんのサイズは下式により算出した.

$V = L \times W^2/2$

このとき、Vは固形がん体積、Lは固形がんの長さ、 Wは固形がんの幅をそれぞれ示している.

一方、各種細菌の抗腫瘍メカニズム解析は、細菌投 与後の腫瘍塊切片の組織免疫染色により解析した.具 体的には、Colon26を播種した大腸がんモデルマウス (female, 8 weeks: n=5: average weight=19g; average tumor size ~ 400 mm³: BALB/cCrSIc; Japan SLC)の尾 静脈に各種細菌分散液 (AUN=5×10⁹CFU/mL, A-gyo =5×10⁸CFU/mL) あるいは PBS 緩衝液をそれぞれ 200 μ L 投与した.24 時間後に腫瘍を摘出し、パラフィ ン切片を作製後、組織染色し、光学顕微鏡を用いて観察 した.なお、組織染色は、バイオ病理研究所によって行 われた。

また、細菌(A-gyo と AUN)の in vivo 毒性評価は、 マウス血液検査ならびに各種臓器の組織鑑定を実施する ことで調査した.具体的には、各種細菌分散液(5× 10⁶CFU/mL)あるいは PBS 緩衝液を 10 週齢のメスの マウス(n=5; average weight=21g, BALB/cCrSlc, Japan SLC)の尾静脈に各 200 μL 投与し、30 日後、腹 部大動脈より血液採取した.全血球数(complete blood cell count: CBC)ならびに生化学検査は、Japan SLC, Inc. と Oriental Yeast Co., Ltd. により解析された.一方, 各種臓器の組織鑑定は、各種細菌分散液(AUN=5× 10⁹CFU/mL, UN-gyo=5×10⁸CFU/mL)あるいは PBS 緩衝液を固形がん(~400mm³)を形成させた大腸がん モデルマウスの尾静脈に各200µL投与し,30日後,各 種臓器を摘出し,パラフィン切片を作製後,ヘマトキシ リン&エオジン(H&E)組織染色し,光学顕微鏡で観 察した.なお,組織染色は,バイオ病理研究所によって 行われた.

サルコーマモデルマウスは大腸がんモデルマウスと 同様の手法により作製した.およそ10日後,固形がん (~100 mm³)を形成させたマウス (n=5)の尾静脈内 に各種細菌分散液 (AUN=5×10⁹ CFU/mL, A-gyo= 5×10⁸ CFU/mL) あるいはPBS 緩衝液を200 μ L 投与し, 14日に渡って経時的に腫瘍を観察した.

転移性肺がんモデルマウスは以下の方法により作製した.4週齢のメスの野生型マウス(n=3; average weight=15g; C57BL/6NCrSlc)をJapan SLC, Incより購入し,一週間馴化させた.B16-F10細胞分散液(5×10^{6} cells)(200μ L)をマウス尾静脈投与し,その1週間後に各種細菌分散液(AUN= 5×10^{9} CFU/mL, A-gyo= 5×10^{8} CFU/mL)あるいはPBS 緩衝液を転移性肺がんモデルマウスの尾静脈に各 200μ L 投与し,7日後,肺を摘出し,写真撮影ならびに重量を測定した.

薬物耐性乳腺がんモデルマウスは大腸がんモデルマウ スと同様の手法により作製した.およそ10日後,固形 がん(~200mm³)を形成させたマウス(n=5)の尾 静脈内に各種細菌分散液(AUN=5×10⁹CFU/mL, A-gyo=5×10⁸CFU/mL)あるいはPBS緩衝液を200 μ L 投与し,14日に渡って経時的に腫瘍を観察した.

In vivo 蛍光バイオイメージング

近赤外(NIR) 蛍光を用いた細菌の生体内分布を測 定するために Colon26 から成るマウス大腸がんモデルマ ウス(female:8 weeks:n=3:average weight=19g; average tumor size=400 mm³: BALB/cCrSIc; Japan SLC)の尾静脈に AUN(200 μ L, 1×10⁹ CFU)を含む 細菌培養培地あるいは細菌を含まない PBS 緩衝液を投 与した.マウス体全体の近赤外蛍光像を *in vivo* 蛍光バイ オイメージングシステム(VISQUETM InVivo Smart-LF, Vieworks)を用いて観察した.励起波長ならびに蛍光 波長はそれぞれ λ_{ex} =740-790 nm, λ_{em} =810-860 nm で ある.また,画像解析は CleVueTM software (Vieworks) を用いた.

データの統計解析

データ中の±は標準偏差,nは使用したサンプル数を示している.データの統計解析は,Student's t-test を用いた.*, **, ****、****は,それぞれ<0.05, <0.005, <0.001, <0.0001のp値を示している.

結果と考察

担がんモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検証

サルコーマ(Meth-A),大腸がん(colon-26),薬物 耐性乳腺がん細胞(EMT6/AR1)を背面移植した担が んモデルマウスならびにメラノーマ細胞(B16F10)を マウスの尾静脈に投与することで作製した転移性肺がん モデルマウス体内における光合成細菌の性能評価・機能 制御を検証した.

著者のこれまでの研究により,天然の光合成細菌(*R. palustris*)が,マウス体内に移植した大腸がんに有効で あることが判明している(Yang *et al.*, 2021; Reghu & Miyako, 2022).しかし,実際の動物臨床現場で頻繁に 発生し,かつ大腸がんに比較して診断・治療が困難な乳 腺がんへの適用性を調査する必要性がある.また,これ まで*R. palustris*の抗がん活性を引き出すためには,強 力な近赤外レーザーを照射し細菌自体を発熱させる必要 性があった.このため腫瘍のみならず患部周辺の正常な 組織も火傷をする危険性があった.

このような経緯の中,著者は,強力な近赤外レーザー を用いなくても、マウスの尾静脈に単回投与するだけで 高い抗がん活性を示す新たな機能性細菌2種類 [A-gyo, UN-gyo, AUN (A-gyoとUN-gyoの混合物)と命名] を偶然発見した (Fig.2).本研究では、当該細菌を用 いた様々ながん種に対する抗腫瘍効果を検証した (Fig.3-6).この結果、細菌投与後、再現性良く腫瘍が 完治することが判明した.また、当該機能性光合成細菌 (AUN)は、火傷を伴わない温和な強度の近赤外光照射 により薬物耐性乳がんモデルマウス体内で腫瘍特異的に 発光することが分かった (Fig.5D).

また, 当該細菌による抗腫瘍効果が様々な免疫細胞(T 細胞, NK細胞, マクロファージなど)により惹起され ていることが明らかとなった(Data not shown). さらに, マウスを用いた生体適合性試験(血液学的検査,組織学 的検査など)を行った結果,いずれの検査からも光合成 細菌そのものが生体に与える影響は極めて少ないことが わかった(Data not shown).



Fig. 2 Schematic illustration of isolation of extremely effective anticancer bacteria from solid tumors. As the tumor-specific homing of commercially available *Rhodopseudomonas palustris* (ca-RP) is an anaerobic process, ca-RP can grow under anaerobic conditions in the tumor microenvironment (hypoxia). The scheme shows three approaches for the isolation of oncolytic bacteria, called A-gyo, UN-gyo, and AUN, from the colonies of intratumoral bacteria after intravenous administration of ca-RP: (I) isolation process of A-gyo using ATCC543 (+ Cys) liquid medium and ATCC543 (+ SD, + Cys) agar plate by conventional colony picking technique with a disposable needle, (II) isolation process of AUN using ATCC543 (- Cys) liquid medium and ATCC543 (+ SD, - Cys) agar plate by conventional colony picking technique with a disposable needle, and (III) purification process of UN-gyo from the bacterial consortium AUN (the mixture of A-gyo and UN-gyo) using ATCC543 (+ SD, - Cys) medium and ATCC543 (+ SD, - Cys) agar plate by microscopic colony picking technique with a sharp syringe needle.

都 英次郎



Fig. 3 Bacteria-based theranostics for Colon-26-tumor-bearing mice. A) Schematic illustration of in vivo Colon-26 carcinoma antitumor tests using various functional bacteria. B) Images of mice after each treatment. N. A., not available. C) *In vivo* anticancer effect of functional bacteria. The PBS or suspension of bacteria was intravenously injected into Colon-26-bearing mice. Data are represented as mean ± standard errors of the mean (SEM); n=5 biologically independent mice. ****, p<0.0001, by two-way ANOVA test. D) Complete response (CR) rate of Colon-26-tumor-bearing mice (n=10 biologically independent mice) at day 15 after bacteria or PBS injection.



Fig. 4 Antitumor efficacy of functional bacteria against sarcoma model. A) Schematic illustration of *in vivo* sarcoma antitumor tests using functional bacteria. B) Images of mice after each treatment. C) *In vivo* anticancer effect of functional bacteria. The PBS or suspension of bacteria was injected intravenously into Meth-A-bearing mice. Data are represented as mean \pm SEM; n=5 biologically independent mice. ****, *p*<0.0001, by two-way ANOVA test. D) CR rate of sarcoma-bearing mice (n=5 biologically independent mice) after tumor implantation. Statistical significance was calculated in comparison with the PBS group. ****, *p*<0.0001, Log-rank (Mantel-Cox) test. F) Weight of mice after each treatment. Data are represented as means \pm SEM; n=5 independent experiments. ns, not significant, by two-way ANOVA test.



Fig. 5 Antitumor efficacy of functional bacteria against drug-resistant cancer model. A) Schematic illustration of *in vivo* antitumor tests using functional bacteria against drug-resistant cancer model. B) Relative volumes of the tumors on the right flank of mice after i.v. injection of AUN, A-gyo, or PBS. Bacterial concentrations of AUN and A-gyo are 10×10^9 CFU mL⁻¹ and 5×10^8 CFU mL⁻¹, respectively. Data are presented as mean \pm SEM (n=5 biologically independent tests), ****, *p*<0.0001 (Student's two-sided t-test used for analysis in comparison to PBS). C) Kaplan–Meier survival curves of EMT6/AR1-bearing mice (n=5 biologically independent mice) after tumor implantation. Statistical significance was calculated in comparison with the PBS group. ****, *p*<0.0001, Log-rank (Mantel-Cox) test. D) NIR FL images of the mouse before and after i.v. injection of AUN (5×10⁹ CFU mL⁻¹) for 3 days. Solid arrow represents the tumor location from cancer targeting ability of AUN. Dashed arrow indicate background noise derived from AUN stacked in liver and spleen. E) Weight of mice after each treatment. Data are represented as means \pm SEM; n=5 independent experiments. ns, not significant, by Student's *t* two-sided test.



Fig. 6 Antitumor efficacy of functional bacteria against metastatic lung cancer model. A) Schematic illustration of *in vivo* antitumor tests using functional bacteria against metastatic lung cancer model. B) Images of lungs after each treatment. C) Weight of lungs after each treatment. Data are represented as mean ± SEM; n=5 independent experiments. ****, *p*<0.0001, by two-way ANOVA test. D) Average body weight of the mice after bacterial and control treatments during the experimental duration. The black arrow shows the time point of sample injection (Day 7). Data are represented as the mean ± SEM; n=5 biologically independent mice. ns, not significant, by Student's *t* two-sided test.

要 約

本研究では、マウス生体内の大腸がん由来腫瘍組織か ら主に2種類の細菌の単離・同定に成功し、これらの細 菌にA-gyo (阿形; Proteus mirabilis), UN-gyo (吽形; *Rhodopseudomonas palustris*), そしてAUN(阿吽; A-gyoとUN-gyoから成る複合細菌)とそれぞれ命名し た.これらの細菌を、大腸がんを皮下移植した担がんモ デルマウスの尾静脈に投与したところ、低酸素状態の腫 瘍環境内で高選択的に集積・生育・増殖が可能で、かつ 高い抗腫瘍効果を示すことを発見した. とりわけ. AUN は、単回投与にも関わらず、A-gyo と UN-gyo の協 奏作用により細胞障害性の免疫細胞を効果的に賦活化 し、大腸がん、肉腫(サルコーマ)、転移性肺がん、薬 物耐性乳腺がんといった様々ながん種に対して強力な抗 腫瘍活性を示すことが明らかとなった.また、AUNは、 生体透過性の高い近赤外光によって標的とする腫瘍内で 近赤外蛍光を発現することが分かった. さらに、マウス を用いた生体適合性試験(血液学的検査,組織学的検査, 細菌コロニーアッセイなど)を行った結果、いずれの検 査からも AUN そのものが生体に与える影響は極めて少 ないことが分かった.

本助成で得られた研究成果の報告

原著論文

- Goto, Y., Iwata, S., Miyahara, M. & Miyako, E. 2023. Discovery of intratumoral oncolytic bacteria toward targeted anticancer theranostics. Adv. Sci. 10: 23016.
- Reghu, S., Iwata, S., Komatsu, S., Nakajo, T. & Miyako, E. 2023. Cancer immunotheranostics using bioactive nanocoated photosynthetic bacterial complexes. Nano Today 52: 101966.
- Chintalapati, S. S. V. V., Iwata, S., Miyahara, M. & Miyako, E. 2024. Tumor-isolated *Cutibacterium acnes* as an effective tumor suppressive living drug. Biomedicine & Pharmacotherapy 170: 116041.
- Qi, Y., Miyahara, M., Iwata, S. & Miyako, E. 2024. Lightactivatable liquid metal immunostimulants for cancer

nanotheranostics. Adv. Funct. Mater. in press.

5) Wang, T., Qi, Y., Miyako, E., Bianco, A. & Ménard-Moyon, C. 2024. Photocrosslinked co-assembled amino acid nanoparticles for controlled chemo/photothermal combined anticancer therapy. Small in press.

謝 辞

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

文 献

- Goto, Y., Iwata, S., Miyahara, M. & Miyako, E. 2023. Discovery of intratumoral oncolytic bacteria toward targeted anticancer theranostics. Adv. Sci. **10**: 23016.
- Matsumura, Y. & Maeda, H. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Research 46: 6387–6392.
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G. *et al.* 2020. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science **368**: 973–980.
- Reghu, S. & Miyako, E. 2022. Nanoengineered *Bifidobacterium bifidum* with optical activity for photothermal cancer immunotheranostics. Nano Letters 22: 1880–1888.
- Rkein, A.M. & Ozog, D.M. 2014. Photodynamic therapy. Dermatol. Clin. **32**:415–425.
- Wilhelm, S., Taveres, A.J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H.F. & Chan, W. C. 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nature Reviews Materials 1: 16014.
- Yang, X., Komatsu, S., Reghu, S. Miyako, E. 2021. Optically activatable photosynthetic bacteria-based highly tumor specific immunotheranostics. Nano Today 37: 101100.
- Zhou, S., Gravekamp, C., Bermudes, D. & Liu, K. 2018. Tumourtargeting bacteria engineered to fight cancer. Nat. Rev. Cancer 18: 727–743.
- Zinn, S., Vazquez-Lombardi, R., Zimmermann, C. *et al.* 2023. Advances in antibody-based therapy in oncology. Nat. Cancer **4**: 165–180.

2018年度寄付講座助成の研究報告

助成期間:2018年10月~2024年3月

革新的技術による輸送系膜タンパク質機能の解明と 「微生物膜輸送工学」への応用展開

川 崎 寿

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 微生物膜輸送工学寄付講座 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Functional analysis of membrane transport proteins using innovative analytical techniques and their application to "microbial membrane transport engineering" Hisashi Kawasaki

Laboratory of Microbial Membrane Transport Engineering Agro-Biotechnology Research Center Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

Despite the fact that membrane transport proteins are indispensable for biological activities, they are not well understood due to the lack of sufficient research methods. Membrane transport proteins function under the influence of surrounding lipid molecules and membrane potential with large conformational changes. However, due to the above limitations in research methods, the understanding of the interaction of membrane transport proteins with lipid molecules and their operating mechanisms based on their dynamic behavior is not sufficient.

Therefore, although membrane transport is very important in developing microbial cell factories (MCF), there is a lack of understanding especially of exporter proteins, which is one of the bottlenecks in MCF development.

Membrane transport also plays an important role in major energy conversion processes in living organisms, such as respiration and photosynthesis. For example, several ion transport proteins that are expressed on thylakoid membranes and involved in photosynthetic activity have been identified. However, some ion transport proteins remain to be identified, while their existence has been suggested.

We aimed to overcome the limitations of research methods in the study of membrane transport proteins by utilizing innovative analytical techniques developed by our own research group, as are below.

(1) Original membrane transport analysis system that enables patch clamp analysis of microorganisms and organelles

(2) High-precision molecular dynamics simulation of membrane transport proteins using originally developed force field

Using analytical methods described above, we have been tackling the following research agenda in basic research on membrane transport proteins for exporter engineering and other applications towards sustainable society as below. (1) Analysis of mechanosensitive channels and their application to microbial membrane transport engineering, (2) Identification of the 5'-IMP exporter protein gene of *Corynebacterium stationis* and elucidation of the mechanism of improving the exporter protein activity, (3) Elucidation of the dynamic behavior of membrane transport proteins and analysis of their operating mechanisms using high-precision all-atom molecular dynamics simulation, (4) Electrophysiological analysis of thylakoid membrane-localized ion channels and their physiological roles. As a result, we have achieved some unique and valuable results.

E-mail: ukawasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

教員:橋本 賢一(現,東京大学医学部付属病院).

篠田 恵子 (現,統計数理研究所先端データサイエンス 研究系).

浜本 晋(現,東京大学大学院農学生命科学研究科).

寿

第一章 はじめに

環境意識の高まりと資源の偏在などに起因する地政学 的不安定性などを背景として,持続可能性と回復力を高 める社会改革が急務となっている (Nielsen et al., 2022; Han et al., 2023). そのための手段のひとつとして, 再 生可能な資源から価値ある化合物を生産する微生物細胞 工場(MCF)への注目も高まっている.近年の合成生 物学の進歩により、生合成経路設計が可能な範囲が拡大 し、MCF が合成可能な化合物の多様性が拡大すると共 に、非可食資源を利用する技術が進歩している(Lee et al., 2019; Ko et al., 2020; Sokolova et al., 2023). 同時に、 MCF 開発における重要なフロンティアとして、 膜輸送 の領域が再浮上している(Fig.1)(López et al., 2022). 合成された標的化合物の細胞内から細胞外への排出を促 進することは、一般に商業生産に有益である、その理由 は、このプロセスが、標的化合物の生合成の制限を緩和 すること,細胞内に蓄積した標的化合物の分解や毒性の リスクを抑制すること、標的化合物の回収と精製の工程 を合理化すること, などである (Jones et al., 2015; Lv et al., 2022).

標準的な合成培地を用いたバッチ培養では, Escherichia coliの細胞体積は, OD₆₀₀=1の時, 培養液の約1/280に 相当する (Volkmer & Heinemann, 2011). このことは, もし細胞内に蓄積された標的化合物を細胞外に排出でき れば, たとえそれが受動拡散によって標的化合物の細胞 外濃度と細胞内濃度を等しくすることであったとして も, バッチ培養あたりの標的化合物の収量を280倍増加 させることができることを示している. 能動輸送機構を 採用できれば, バッチ培養あたりの標的化合物の生産量 をさらに向上させることができる. しかし, MCFにお ける標的化合物の細胞外への排出, MCFに適した排出 膜輸送タンパク質の探索と選択, および, 設計に関する 「exporter engineering」は, 比較的進んでいない.

膜輸送は、生物のエネルギー変換において主要な呼吸 や光合成でも重要な役割を担っている。光合成では、光 エネルギーが吸収され、葉緑体のチラコイド膜で電子伝 達反応を駆動することによってATPに変換される (Allen, 2002). 光エネルギーを利用する明反応では、光化学系 II (photosystem II: PSII) が光エネルギーによって励 起され、水分子を酸素とH⁺と電子へと分解して酸素分 子を発生させる.一連の電子伝達反応で.水の酸化によ るH⁺のチラコイド内腔への放出,シトクロムb₆f 複合 体によるチラコイド内腔へのH⁺の輸送が起こり、チラ コイド膜を隔てたH⁺駆動力(pmf)が生成する.この H⁺駆動力を利用して ATP 合成酵素が ADP から ATP を 合成する.H⁺は電荷を持つため.H⁺の移動に伴ってH⁺ の濃度勾配(ΔpH)と膜電位(Δψ)の二つの成分が生 じる.この二つの成分の和である bmf が. ミッチェル によって提唱された化学浸透圧説における ATP 合成酵 素を介した ATP 合成を駆動する (Mitchell, 1961). そ ればかりでなく、光合成の調節においても膜輸送は重要 である. 例えば、H⁺をチラコイド内腔に輸送するのと 同時にK⁺をストロマに輸送するK⁺/H⁺対向膜輸送タン パク質 Kea3 は、強光から弱光への変動光環境において、 光合成における光利用効率を促進させることが知られて



Fig. 1 Concept of exporter engineering and the goal of this research.

いる(Armbruster *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). また, 陰イオン 膜輸送タンパク質の bestrophin ファミリーに 属する 膜電位依存性 CI チャネル AtVCCN1 も変動光環 境において光合成の制御に関わっていると考えられてい る(Herdean *et al.*, 2016; Dukic *et al.*, 2019). このように, チラコイド膜に発現して光合成活性に関わるイオン膜輸 送タンパク質が見出されてきた一方で,存在が示唆され ながらもイオン輸送タンパク質本体の同定に至っていな い例もある.光の照射によりチラコイド内腔からストロ マに K⁺ が放出される現象が報告されており(Hind *et al.*, 1974), さらに,シミュレーションによってチラコイド 内腔からストロマへの K⁺ の輸送の必要性が示唆されて いる(Li *et al.*, 2021)が,チラコイド内腔からストロマへ K⁺を輸送する膜輸送タンパク質は同定されていない.

シロイヌナズナと同様に光合成研究のモデル生物であ るラン藻 Synechocystis sp. PCC 6803 を対象とした光合成 に関わるイオン輸送タンパク質の研究も行われている が、シロイヌナズナと比較して報告例は非常に少ない.

上述のように, 膜輸送タンパク質に関する理解は不充 分であるが, これは主として, 複雑で手間のかかる実験 方法, および, 目的によっては適切な実験方法が存在し ないことに起因する (Bali *et al.*, 2018; López *et al.*, 2022).

腹輸送タンパク質は周囲の脂質分子や膜電位などの影響を受けつつ大きな構造変化を伴いながら機能している が,研究手法の制限が原因で, 膜輸送タンパク質の脂質 分子との相互作用や動的挙動に基づく作動機構の理解は 充分ではない.

そこで、本寄付講座では、膜輸送タンパク質研究にお ける研究手法による制限を克服することを目標として、 独自に開発した革新的解析技術を活用すると共に、最新 の解析機器を導入し、膜輸送タンパク質の機能および作 動機構の解明と「微生物膜輸送工学」への応用展開を目 指した.

第二章 研究成果の概要

メカノセンシティブチャネルの解析とその微生物膜輸送工学に向けた応用展開

近年、様々な価値ある化合物を生産する MCF の設計 に向けた合成生物学の進歩は目覚しいが、exporter engineering においては、研究の困難さから未開拓の領 域が数多く残されている.我々は、工業的L-Glu 生産 MCFにおいてL-Glu の排出を担うメカノセンシティブ チャネル(Msc)に注目した、細胞質膜に存在する Msc は、膜張力に応答して活性化され、イオンや低分 子化合物を輸送する.Msc は物理的刺激を化学的刺激 に変換する機能を持ち、細胞は、触覚、音の検出、重力 の感知、浸透圧調節など、様々な生理的機能において Mscを利用している(Hamill & Martinac, 2001; Kung et al., 2010) ことから、Mscの研究には長い歴史がある. 特に、細菌の2種類のMsc、すなわち、MscL (large conductance mechanosensitive channel)とMscS (small conductance mechanosensitive channel)は、広く研究 されている。これらは、細菌が低浸透圧ショックを受け た際、細孔を開いて小さな溶質と水を細胞外に放出し、 細胞破裂から細菌を守る「安全弁」として重要な役割を 果たしている(Levina et al., 1999).

最近の研究で、E. coliのMscSに類似した Corynebacterium glutamicumのMscであるMscCG (NCgl1221)が、グルタミン酸(L-Glu)生産微生物細 胞工場(MCF)でL-Glu排出を担うことが明らかになった (Nakamura et al., 2007; Hahsimoto et al., 2010; Hashimoto et al., 2012; Wang et al., 2018).

デジタルトランスフォーメーションはバイオサイエン スとバイオテクノロジーにも大きな影響を与え. AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) のような注目すべき 成果をもたらした.しかし.脂質分子と相互作用し.大 きな構造変化を伴いながら機能する膜輸送タンパク質に ついて、その動的挙動に基づく改良の成功例は極めて限 られており、デジタルバイオ技術の効果的な活用が期待 されている. Mscの開口メカニズムを理解することは, MCFの発展を加速する Msc をデザインすることに繋が る. MscL (ホモ5量体, E. coli では1 サブユニット136 アミノ酸残基) は MscS (ホモ7 量体. E. coli では1 サ ブユニット286アミノ酸残基)に比べて小さいことから. 計算機の性能がそれほど高くない時代から全原子分子動 力学シミュレーションを用いた開口ダイナミクスについ て研究がなされてきた (Sawada et al., 2012; Sawada & Sokabe, 2015; Gullingsrud & Shulten, 2003). MscLの立 体構造は Chang et al. (1998) によって解明され,実験 による解析も広範に行われてきた (Sukharev et al., 1999; Nomura et al., 2012; Nomura et al., 2015; Yoshimura et al., 1999; Yoshimura et al., 2004; Yoshimura et al., 2008). したがって, MscLをMscのモデルとして実験 と計算の両方を活用して研究することは、原子レベルで の開口挙動とそれを基にした改良・設計を目指した研究 に適したアプローチとなると考えられる.

本研究では、我々が開発したユニークなパッチクラン プシステムを用いて、Msc が様々な低分子化合物を排 出する能力を持つことを実証した.この結果を基に、 MCF において、Msc を exporter として用いることで、 いくつかの価値ある化合物の生産性を向上させることに 成功した.このことは、Msc を活用することで多種類

寿

の有用化合物の生産性の向上が可能であることを示している.

さらに, MDシミュレーションは, Msc のダイナミックな開口挙動を解析し, その改良・設計に有効なツール となり得ることが示唆された.

より具体的に以下に記す.L-Glu 生産 MCFにおいて L-Glu の排出を担う膜輸送タンパク質である MscCG (NCgl1221)が、L-Lys やフェニルアラニン類縁化合物 などの様々な低分子化合物を排出できることを直接的に 示した.このことは、Msc が一連の低分子化合物を排 出できることを示唆しており、Msc が多目的な排出膜 輸送タンパク質として機能する可能性を示している.注 目すべきは、Msc がその輸送機能において、主に排出 される化合物のサイズに基づく非選択性を示したことで ある.

尚, この解析には, 我々が独自に開発した細菌やオル ガネラに特化したパッチクランプシステムを用いた (Kuroda *et al.*, 1998). このシステムでは, 表裏が反転 した膜胞である液胞様構造(Kuroda *et al.*, 1998)を用 いることで, 排出を膜胞内への取り込みとして測定する ことが可能であり,排出活性を測定するのに有利である. 本研究でも, ここでの解析には液胞様構造体を用いた.

Mscは膜張力の上昇に反応して活性化されるため、 通常の培養条件下ではMscは不活性な状態にある(Ou et al., 1998). そこで、Gain-of-function(GOF)変異を 有するMsc遺伝子を用いた.MscCG(NCgl1221)遺伝 子のGOF変異はC.glutamicumにおいてL-Glu生産を誘 導することから(Nakamura et al., 2007)、野生型E. coli にGOF変異を有するMscCG遺伝子を導入したところ、 L-Glu生産を誘導した.このことは、導入した遺伝子が 発現し、MscCGがE. coli内で機能していることが示し ている.GOF変異を有するMscCG遺伝子を導入すると、 L-Gluの生合成経路を強化することなくL-Glu排出が誘 導されることは、細胞内にL-Gluが豊富に存在すること を反映していると考えられる(Bennett et al., 2009).

GOF 変異を有する Msc 遺伝子を MCF に導入するこ とにより, 商業的価値がある化合物である L-Lys, イノ シン5'-ーリン酸(5'-IMP)の細胞当たりの生産速度を 高めることに成功した. L-Lysの細胞当たりの生産速度 は空ベクター保持株の約 2.1 倍, 5'-IMPの細胞当たりの 生産速度は空ベクター保持株の約 2.3 倍に向上した.上 記のパッチクランプ実験からも示唆された, Msc の活 用は排出膜輸送タンパク質が未知である低分子化合物の 発酵生産にも有効であることが培養実験からも示され た.空ベクター保持株による 5'-IMP 蓄積は溶菌による ものであることから(Kinose *et al.*, 2024), Msc の活用 によって 5'-IMP の発酵生産が達成できたと言えよう. また, Msc 野生型遺伝子の導入は生産にほとんど効果 が無かったが,対照的に,GOF変異を有する遺伝子の 導入は大きな効果を示したことから,Msc の活用にお いては GOF の利用が効果的と考えられた.

これらの結果は、以前から示唆されていたように、 MCFの設計における exporter engineering の重要性を示 すものである. Exporter には高い特異性が重要であると いう従来の考えとは対照的に、我々の結果は、選択性の 低いチャネルでも MCF において効果的に exporter とし て機能することを示した. チャネル型膜輸送タンパク質 の輸送速度はトランスポーター型の輸送速度に比べて極 めて速いことから(チャネル:10⁷~10⁸ 個のイオン/秒、 トランスポーター:10²~10⁴ 個のイオン・分子/秒)、 仮に特異性をある程度犠牲にしても Msc を活用するメ リットはあると考えられる.

さらに、全原子分子動力学シミュレーションによって 得られた MscL の動的開口挙動に関する知見から,25 年以上も分からないままだった Msc の G46D 置換が GOFをもたらすメカニズムを解明する糸口を得た. 具 体的には、G46D 置換によって最初の膜貫通へリックス (TM1)のA38でkinkが生じる結果.TM1とTM2間 の相互作用が影響を受け、閉口時のゲートが不安定化す ることでGOFとなっている可能性が考えられた.これ を検証するために, A38のkinkを妨げる A38V/G46Dの 二重置換遺伝子を 5'-IMP 生産 MCF に導入したところ, 細胞当たり5'-IMP生産速度が大幅に減少した. さらに. A38V/G46D 二重置換型 MscLを用いた MD シミュレー ションは、最終点である 200 nsec まで進むことができず、 80nsec付近で停止した. このシミュレーションの 80nsecの間、A38V/G46D MscLは開孔に至る挙動を示 さなかった.これは、上記の5'-IMP生産培養の結果と 整合している. このことは, 分子動力学シミュレーショ ンが、Msc 開口メカニズムの複雑さを理解する上で有 効なこと、機能向上型 Msc を設計するためのツールと して高い可能性をもつことを示すものである.

Corynebacterium stationis の 5'-IMP 排出膜輸送タン パク質遺伝子の同定とその変異解析による排出膜輸 送タンパク質高機能化機構の解明

ヌクレオチドの一種であるイノシン5'-ーリン酸(5'-IMP)は、強いうま味を持ち、食品添加物として広く 販売されている。最も成功した発酵生産の一つであるヌ クレオチドの製造において、*Corynebacterium stationis* はランダム変異によってヌクレオチドの細胞外への排出 能を獲得した。我々は、*C. stationis* ゲノムから、ヌクレ オチドを細胞外に排出する major facilitator superfamily (MFS) 膜輸送タンパク質と、高活性化アミノ酸置換 (G64E)を見出した.G64Eが当該排出膜輸送タンパク 質を高活性化するメカニズムは、全原子分子動力学シ ミュレーションとアミノ酸置換による解析から、以下の 2つ、すなわち、(1)TM1-TM4およびTM1-TM6の相互 作用の強化と5'-IMP結合によるその増強、(2)排出基 質結合 cavity内で5'-IMPと相互作用するQ65残基が E64によって捕捉される結果5'-IMPの遊離が容易にな ることの2つで説明できると考えられた.以下に、より 具体的に説明する.

商業的発酵のためにランダム変異で段階的に育種され た 5'-IMP 生産 C. stationis 株 1 株 (KCCM10610 (Park et al., 2006)), およびランダム変異で段階的に育種され たキサントシン 5'-ーリン酸 (5'-XMP)-生産 C. stationis 株4株(KCCM10340(Kim et al., 2004), KCCM10448 (Kwag et al., 2008), KCCM10530 (Park et al., 2009), および, KCCM10972 (Jinman et al., 2013)) を選択・ 収集した.野生型株と3株を検証のために培養したとこ ろ, 5'-IMP 蓄積量においては, KCCM10610 株は野生型 株よりも高く、5'-XMP 蓄積量においては、KCCM10972 株, KCCM10340株, 野生型株の順で高かった. このこ とから育種による改良が確認された. KCCM10340株は. 最も早く育種された5'-XMP発酵生産株であり、顕著な 5'-XMP 排出能力を有していることが注目される. 我々 は、ヌクレオチド排出の表現型は初期の育種段階で独立 して獲得されたと仮定した.

この表現型の原因遺伝子を明らかにするため、上記の 5株および野生株 C. stationis ATCC 6872 の全ゲノムを解 析して、変異履歴を調べた.その結果、独立に育種され た2つの系統で5つのトランスポーター遺伝子(cs0286, cs0510, cs0916, cs0966,および cs2429)が収束的に 変異しており、これら遺伝子を5'-IMPの生合成が強化 された E. coli で発現させたところ、試験した遺伝子の 中では、cs0286 遺伝子とその5'-IMP生産型変異体 cs0286V2L G64E が有意な効果を示した(Kinose et al., 2024).

cs0286 遺伝子は、549 アミノ酸からなる 14 の膜貫通 ヘリックスを有するタンパク質をコードしていた. Cs0286 は, *E. coli* のホモログとの系統関係から, DHA2 (drug: H⁺ antiporter 2) タイプの MFS に分類された. 従って、この MFS は、H⁺ 駆動力を用いた H⁺ の取り込 みと共役して 5′-IMPを排出している可能性が高く、電 子伝達系が 5′-IMP の排出に重要な役割を果たしている という以前の研究結果(Teshiba & Furuya, 1984)と整 合している.

上記のように5'-IMP生産株由来のcs0286 遺伝子は2 ケ所(V2L, G64E)にアミノ酸置換を伴う変異を有し ていた. どちらの変異に効果があるのか,あるいは,両 方の変異に効果があるのかを明らかにするために、単独 変異遺伝子を発現させ、培地中への5'-IMPの蓄積量を 測定した.その結果、V2L変異遺伝子発現株は野生型遺 伝子発現株と同等の、G64E変異遺伝子発現株は2重変 異遺伝子発現株と同等の培養液中の5'-IMP蓄積量であ ることがわかった.尚、G64E変異はタンパク質の発現 量には影響しなかった.これらの結果から、G64E置換 はCs0286タンパク質の膜輸送タンパク質活性を増強す ることが示唆された.

G64E が膜輸送タンパク質を高活性化するメカニズム を調べる目的で、AlphaFold2(Jumper et al., 2021)を用 いてCs0286タンパク質とその置換型の構造を予測した. 野生型タンパク質と置換型タンパク質の予測された構造 は、実質的な違いを示さなかった(RMSDで5.4Å).こ れらの全体構造は、MFS 膜輸送タンパク質の解かれた構 造(Brawley et al, 2022; Kumar et al, 2021; Wisedchaisriv et al, 2014)と重ね合わせることができた。第一膜貫通 ヘリックス(TM1)の残基 64 は、基質結合 cavity の外 側に面し、基質分子とは相互作用しそうにないと予測さ れたことから、この置換は基質との親和性を直接変化さ せることで高活性化に寄与するのではなく、他のヘリッ クス上のアミノ酸残基と相互作用することで高活性化に 寄与することが示唆された。

次に、予測された構造を初期構造として、5'-IMPを 含む Cs0286 と含まない Cs0286 の全原子 MD シミュレー ションを行った. 膜におけるタンパク質の挙動を正確に シミュレートするために、高精度な FUJI 力場(Fujitani *et al.*, 2009)を用いた. G/E64 と異なるヘリックス上の 他の残基との相互作用エネルギーを計算した. 野生型で は、TM1 の G64 は主に TM4 の R143 と相互作用してい たが、G64E 型では、E64 は TM4 の R143 と Q146、TM6 の N208 と相互作用していた. G64E 型では、5'-IMP 存 在下で R143 と E64 残基間の相互作用が増加した. これ らの結果から、R143、Q146、N208 残基が G64E 型の活性 亢進に寄与していると考えられた.

これらの残基の寄与をよりよく理解するために, MD シミュレーションでTM1とN-bundleの他のヘリックス (すなわちTM2-TM6)との間の相互作用エネルギーを 計算した.野生型では, TM1はTM4, TM5, TM6と 顕著な相互作用が認められた.TM1とTM4の相互作用 は, G64主鎖とR143残基に大きく依存していた.R143 をAlaに置換した遺伝子を発現させた株において, 5' -IMP 蓄積量は空ベクター保持株と同程度まで低下した ことから, このヘリックス-ヘリックス相互作用は排出 活性に必要であると考えられる.G64EがTM1とTM4 の相互作用を大きく増強したことは, TM1-TM4相互作 用とCs0286の活性との関係を示すと考えられる.G64E

寿

型では, E64 と R143 に加えて, Q65 と Q146 がこの TM1 と TM4 の相互作用に寄与していた.

5'-IMP存在下では、E64-R143の相互作用はG64-R143の相互作用に比べて強化され、TM1-TM4相互作用が増加した.TM1とTM6の相互作用は複数のシミュレーション実行で変動したが、5'-IMP存在下では、この相互作用は、E64とN208の相互作用の寄与により、野生型よりもG64E型の方が強かった.したがって、5'-IMPの結合はN-bundleのコンフォメーションを安定化させると考えられる.

野生型 Cs0286 と 5'-IMPを用いたシミュレーションで は、5'-IMPは野生型 Cs0286 のいくつかの残基と相互作 用した. 特に, G/E64の隣に位置するQ65は, 5'-IMP と比較的強い相互作用があることが示唆された. 340 nsec のシミュレーションを 10 回行ったところ、野 生型 Cs0286 を用いたシミュレーションでは、5'-IMP が ペリプラスム側に移動したのは1回だけであった.対照 的に, G64E 置換型 Cs0286 と 5'-IMPを用いたシミュレー ションでは、5'-IMPはより容易に移動した(10回のう ち5回). 5'-IMP が遊離する瞬間, 5'-IMP が遊離したほ とんどのシミュレーションにおいて、E64 残基は 5'-IMP と相互作用していたQ65残基を引き寄せることによって、 5'-IMPの遊離をサポートしているように見えた. この 発見は、コンフォメーション変化のためのTM1-TM4 お よびTM1-TM6相互作用の強化に加えて、5'-IMPと相互 作用する Q65 残基を E64 が捕捉することも、G64E 置換 型 Cs0286の活性亢進に寄与している可能性を示唆して いる.

留意すべきは、今回の結果は推定された構造に基づい ており、シミュレーションで実際のコンフォメーション 変化を観察したわけではないということである.した がって、膜貫通へリックス間の相互作用が強化されたこ とが輸送中のコンフォメーション変化にどのように影響 しているのかについては、まだ不明な点が残っている. これらの疑問を解決するには、より長時間の MD シミュ レーションや、中間状態に焦点を当てた構造解析が必要 である.これらの疑問に答えることで、他の基質を排出 する膜輸送タンパク質の活性を向上させることが可能に なるかもしれない.

我々の成果は, MFS 膜輸送タンパク質が基質との結 合によって,内向きから外向きにコンフォメーションを 変化させ,排出を促進するメカニズムついて新たな知見 を提供するとともに,MCFにおける標的化合物の排出 膜輸送タンパク質を高機能化するための合理的設計に向 けたアプローチに貢献するものである. 高精度全原子分子動力学シミュレーションによる膜 輸送タンパク質の解析

本研究では, 膜輸送タンパク質の解析を目的として, 高精度な力場(Kamiya *et al.*, 2020; Tzanov *et al.*, 2014) を用いた分子動力学(MD)シミュレーションによる, 多剤排出トランスポーター MATEファミリーに属する NorM, バクテリオロドプシン, *E. coli* Na⁺/H⁺ アンチポー ター NhaAの3つの膜輸送タンパク質の解析を行った.

多剤排出トランスポーターは薬物耐性の一つの重要な 要因とされる膜タンパク質で、構造・作用機序の異なる複 数の薬剤(多剤)を認識し排出する. MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) は原核生物から高等真 核生物に至るまで広く保存されている多剤排出輸送体 ファミリーでの一つである. MATE ファミリーは約450 アミノ酸残基。12回の膜貫通へリックスを有し、Na⁺あ るいはH⁺の濃度勾配を利用した対向輸送によりさまざ まな異物を細胞外へと排出することで、細胞の恒常性を 維持しているとされる. MATEによる能動輸送に関し ては、alternating-access mechanism という輸送機構モ デルが提唱されている (Claxton et al., 2021). このモデ ルでは、 膜輸送体が細胞外に開いている状態 (outwardfacing) にプロトンやイオンと基質が結合することで、 閉状態を経て、細胞内側に開いている状態(inwardfacing)へと構造変化を起こす. さらに, inward-facing 時にプロトンやイオンと基質が外れることで、閉状態を 経て outward-facing へと戻る構造変化が起こる.

これまで、MATEファミリーのトランスポーターは、 Na⁺またはプロトンと共役して対向輸送を仲介するとさ れ、その中でNorM サブファミリーは Na⁺のみに依存す ると考えられてきた. しかし, ケンブリッジ大のvan Veen グループは、コレラ菌 (Vibrio cholerae) 由来の NorM-VC では Na⁺と H⁺の両方に共役し薬剤を排出し、 H⁺ 選択性の経路とH⁺およびNa⁺ 選択性の経路の2つが 存在することを見出した (Jin et al., 2014). しかし, な ぜ2つの経路があるのか、その詳細はわかっていない.ま た、結晶構造解析よりD36、E255、D371といった保存 された酸性残基が Na⁺結合に寄与する可能性も示唆され ていた (He et al., 2010; Lu et al., 2013) が詳細は不明であ る. そこで本研究では、MDシミュレーションを用いて 保存された酸性残基の役割やそれらのプロトン化の有無 がNorMタンパク質のダイナミクスとイオン輸送にどの ように関係しているかを明らかにすることを目的とした.

NorM-VC とその Pseudomonas stutzeri におけるホモロ グであり、基質排出が Na⁺に依存しない NorM-PS につ いて、保存された酸性残基(D36, E255, D371)それぞ れをプロトン化したものと全て脱プロトン化したモデル
を, inward-facing, outward-facing 両方の構造において作成し, それぞれ4本ずつ500 nsの MD シミュレーション を行った. その結果, 特に D371 のプロトン化が Na⁺の取り込みに重要であることが示された. この知見は, MATE ファミリーの薬剤排出機構の理解を深めるため の重要な手掛かりとなるものである.

バクテリオロドプシンは微生物ロドプシンの中で最初 に発見された高度好塩菌膜に存在する光駆動型プロトン ポンプである. バクテリオロドプシンに含まれるレチ ナール分子が光を吸収すると、トランス体からシス体へ と異性化が起こり、複数の中間体を経てプロトンを細胞 外へと輸送するサイクルが起こることが知られている (Haupts et al., 1999; Neutze et al., 2002; Wickstrand et al., 2015; Matsui et al., 2002; Borshchevskiy et al., 2011; Borshchevskiy et al., 2014). 南後らのグループは、X線 自由電子レーザーを用いた時間分解連続フェムト秒結晶 構造解析(SFX)より、光活性化後のナノ秒からミリ 秒にわたるバクテリオロドプシンの立体構造変化を13 のタイムポイントで決定することで可視化し、プロトン の輸送にはロドプシン内の鍵となるアミノ酸のみならず 水分子の関与を示した(Nango et al., 2016). 静止状態 である結晶中ではなく、ゆらぐ実際の細胞環境ではバク テリアロドプシンはどのような振る舞いをしているのだ ろうか?本研究は、アーキア膜を脂質分子から膜タンパ ク質系のモデルを構築し、SFX 実験と長時間 MD シミュ レーションを組み合わせることで、より実際の環境に近 い膜タンパク質の原子レベルの動態に関する新たな知見 を得ることを目的とした.

バクテリオロドプシンが存在する高度好塩菌膜では, 他の生物とは異なり,L-glycerol結合を持つ分岐鎖エー テル型脂質が多数を占める.このL型のグリセロ骨格部 分に対応する力場パラメータは既存の力場には存在しな かったため、最初に古細菌膜脂質分子の力場パラメータ セットを開発した.続いて結晶構造で観測された直鎖脂 肪酸を模倣した直鎖エーテル型脂質分子の力場開発も行 い、アーキアモデル膜を構築した.この現実に即した膜 タンパク質系モデルを用いて長時間(2µsec)のMDシ ミュレーションを実施した.

まず,励起後16nsと励起前構造についてレチナール と周りのアミノ酸との相互作用,水の分布を調べた.レ チナールと周りのアミノ酸との相互作用を調べた結果, レチナールはプロトン移動に関与するアミノ酸のうち, Asp212とAsp85との相互作用が大きく,さらにAsp212 との相互作用は光励起後状態の方がレスティング状態よ りも有意に大きいこともわかった.Asp85はシッフ塩基

からプロトンを受け取る主要なプロトン受容体であり、 Asp212は、光励起後に新たな水分子との水素結合を形 成し、プロトンポンピングの過程において構造変化を引 き起こすことが知られる.結晶構造では、レチナールと Asp212 や Asp85 との平均の距離は同程度で、この両残 基の間にW402が、その近傍にW400とW401の水分子 が存在している。一方、MDシミュレーションでは、 W402に相当する水分子はAsp212とAsp85の間ではな く Asp212 寄りに位置しており、Asp85 近傍の水分子が 激しく入れ替わっていた. W402に相当する水分子はほ とんど入れ替わりがなくレチナールとの間で安定に位置 していたことから、この水の安定性がレチナールと Asp212との相互作用を安定に維持し、強さに反映され たと考えられる.水の分布にもその状況が現れており. W402に相当する水は特定の場所に強く束縛されている 様子が観察された。また、結晶構造では、W404の位置 に2つの強く束縛された分布領域があるが、MDシミュ レーションで観察すると、この領域に存在する水は、そ れぞれその場所に水分子が束縛されるわけではなく、絶 えず入れ替わっていた.実際の結晶構造では, alternate form として記録されており、水分子のダイナミクスが 反映されたことが示唆される.

さらに、作成したアーキア膜とMDシミュレーショ ンで一般的に用いられるモデル膜(POPE 膜)の違いが バクテリオロドプシンに及ぼす影響を調べた結果、三量 体であるバクテリオロドプシンとPOPE 膜、アーキア 膜との相互作用は、-2013±82kJ/mol,-1801±80kJ/mol とPOPE 膜の方が大きいことが明らかとなり、バクテ リオロドプシンのモノマー・モノマー界面に位置するア ミノ酸とPOPE 膜は相互作用していたのに対し、アー キア膜では相互作用がほとんどないことがわかった.こ のことは、現実に即したシミュレーションを行うために は、既存のモデル膜ではなく現実に即した脂質から成る 膜モデルを用いることの重要性を示唆している.

細菌の細胞膜の脂質は環境に応答して脂質組成が変化 することが知られている.例えば E. coli では、温度が 低下すると細胞膜の流動性を保つため不飽和脂肪酸の割 合が増加することや(Mansilla et al., 2004),栄養状態 や酸素供給の変動によって細胞膜の機能を最適化するた め脂質構成が変化することも知られている(Zhang & Rock, 2008; Parsons & Rock, 2013).我々の実験グルー プでは E. coli 膜の脂肪酸組成の違いが、E. coli のH⁺/Na⁺ アンチポーターである NhaA の輸送活性の違いに現れる ことを見いだした.具体的には、シクロプロパン脂肪酸 合成酵素遺伝子(cfa)を破壊した株のシクロプロパン脂 肪酸を含まない膜(Δcfa 株膜)では、親株の膜に比べて

NhaAの活性が高いことを見出した.しかし、その脂肪 酸組成の差が具体的に膜輸送タンパク質にどのように影 響を及ぼすのか、そのメカニズムは不明である.本研究 では、シクロプロパン脂肪酸合成酵素遺伝子(cfa)を破 壊した株の細胞膜の脂質組成分析に基づき. Δcfa 株の細 胞膜とその親株の細胞膜について計算モデルを構築し, MD シミュレーションを用いて脂肪酸組成と NhaAの活 性との関係を解析した. MDシミュレーションに先立ち, 分子モデルとして不足している2種のカルジオリピンの モデリングと力場開発を行なった. NhaAの初期座標は、 X線結晶構造 (PDBID: 4AU5) (Lee et al. 2014) から取 得した. MD シミュレーションによって、NhaAと膜と の相互作用エネルギーの差を調べた結果, NhaAと親株 膜の相互作用エネルギーは-3620±120kI/molであるの に対しNhaAと ∆cfa 株膜との相互作用エネルギーは -3820±60kJ/molであり、NhaAは親株膜よりも △cfa 株 膜との相互作用の方が大きいことがわかった. NhaAの 各残基と膜全体との相互作用エネルギーを計算した結果, 差が見られるアミノ酸残基の多くは、膜-溶媒界面に位 置しており,特に活性中心が存在している膜貫通領域の 5番目のヘリックス (TM5) の両端のループに多いこと がわかった. このループ上の残基は脂質分子のヘッドグ ループと相互作用していた. NhaAは、大きなコンフォ メーション変化を伴って、プロトン2個の細胞外から細 胞内への輸送に対して Na⁺1 個を細胞内から細胞外へ輸 送するが、このTM5がその輸送に関わっていることが知 られており、先行研究ではTM5上に存在する活性中心を 中心としてTM5が曲がるようなコンフォーション変化 を起こすと考えられている (Huang et al., 2016). そこで, このTM5の曲がり角度や活性中心を含む cytoplasmic gate (Gadsby, 2009) と呼ばれる水やイオンの細胞側か らの通り道のゲートの慣性半径を計算した. その結果, △cfa 株膜系の方が親株膜系に比べて、TM5の曲がり角 度は大きく, cytoplasmic gate の慣性半径も大きくなっ ていることがわかった. これらのことは, TM5 両端の ループ上の残基と膜との相互作用の差によって、TM5 のコンフォメーションに差が現れたことを示している. 膜の脂肪酸組成の違いがTM5のコンフォメーションの 違いに結びつき, NhaAの活性向上に関与することが示 唆された.

チラコイド膜局在性イオンチャネルの電気生理学的 解析と生理的役割の検討

チラコイド膜に局在して光合成活性の制御に関わる膜 輸送タンパク質研究は、シロイヌナズナの膜輸送タンパ ク質を対象とした研究に限られている.これまでに複数 の光合成活性の制御に関わる膜輸送タンパク質が報告さ 寿

れているが、これらはいずれも光の強度が変動する光環 境ストレス下において光合成活性の調節を担う、例え ば、H⁺をチラコイド内腔に輸送するのと同時にK⁺をス トロマに輸送するK⁺/H⁺対向膜輸送タンパク質Kea3は、 強光から弱光への変動光環境において、Δwを上昇させ ることにより光合成における光利用効率を促進させる. 陰イオン膜輸送タンパク質の bestrophin ファミリーに属 する膜電位依存性 CI⁻チャネル AtVCCN1 は素早く CI⁻を チラコイド内腔に輸送することにより、Δwを低下させ ながらも ΔpHを上昇させて変動光環境において光合成 の制御に関わっていると考えられている.このように、 チラコイド膜に発現して光合成活性に関わるイオン膜輸 送タンパク質が見出されてきた一方で、存在が示唆され ながらもイオン膜輸送タンパク質本体の同定に至ってい ない例もある. 光照射によってチラコイド内腔からスト ロマに K⁺ が放出される現象が報告されており(Hind et al., 1974), さらに、シミュレーションによってチラコ イド内腔からストロマへのK⁺の輸送の必要性が示唆さ れている (Li et al., 2021) が. それを担う膜輸送タンパク 質は同定されていない.シロイヌナズナと同様に光合成 研究のモデル生物であるラン藻 Synechocystis sp. PCC 6803を対象とした光合成に関わるイオン膜輸送タンパ ク質の研究は行われているが、シロイヌナズナと比較し て報告例は非常に少ない.

我々は、Synechocystis PCC 6803のStc1が、チラコイ ド膜に局在すること、イオン輸送活性を示すこと、陰イ オンより陽イオンを優先的に輸送すること、AStc1株の 低濃度 KCl含有培地での生育は親株より低下すること、 その生育の低下は高濃度の KCl添加により回復すること、 AStc1株の光合成活性は親株より著しく低下することを 見いだした.また、シロイヌナズナ VCCN1のチラコイ ド膜での配向を決定した、以下に、より具体的に記す.

Stc1 は多くの生物種に保存されている陰イオン膜輸送タンパク質の bestrophin ファミリーに属すると考えられる. Stc1 の Synechocystis sp. PCC6803 における細胞内局在を明らかにするため、染色体上の Stc1 の 3' 末端に His-tag 配列とカナマイシン耐性遺伝子を挿入した形質転換体を獲得した. 次に、形質転換体由来の膜画分を調製して抗 His-tag 抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったところ、Stc1:His のバンドをチラコイド膜画分のみから検出した. 従って、Stc1 は植物におけるホモログで陰イオン膜輸送タンパク質として知られるVCCN1 と同様にチラコイド膜に局在してイオン輸送を行うことにより pmf の制御に関わっている可能性が推察された.

前述のように Stc1 は、多くの生物種に保存されている 陰イオン膜輸送タンパク質の bestrophin ファミリーに属 するタンパク質と相同性がある. Klebsiella pneumoniae の KpBest1 は bestrophin ファミリーに属しながらも陽 イオンを輸送する (Yang et al., 2014). KpBest1 において イオン選択フィルターを構成すると考えられているアミ ノ酸残基との類似性から、Stc1が陽イオンを輸送する 可能性も考えられた. そこで, K⁺取込み能欠損 E. coli 株を用いた Stc1の機能解析を行った. E. coli 細胞質膜に 存在する4種のK⁺取込み膜輸送タンパク質KdpABC, KUP, TrkG, TrkH (Bossemeyer et al., 1989; Dosch et al., 1991)の全ての遺伝子を破壊した多重欠損株を作成し、 *Stc1*を導入した、このK⁺取込み能欠損株は低K⁺濃度の 培地では生育しなかったが, Stc1 発現株は15mM KCl を添加した培地でK⁺取込み能欠損株の生育を相補した. さらに、K⁺の取込み実験を行ったところ、Stc1発現株は 空ベクターを導入したコントロール株よりも多くのK⁺ の取込みを示した. これらのことから, Stc1 は E. coliの 細胞質膜に機能的に発現して K⁺ を輸送することが明ら かとなった.

電気生理学的解析手法の一つであるパッチクランプ法 は、イオン膜輸送タンパク質のイオン選択性や膜電位依 存性の解析などが可能であり、生育相補実験や取込み実 験などでは困難なイオン膜輸送タンパク質の詳細な機能 解析が可能である(Neher & Sakmann, 1976).しかし, *E. coli*はパッチクランプ測定に用いるパッチ電極(パッチ ピペット)よりも細胞サイズが小さい上に細胞膜外に細 胞壁が存在し、さらに膜が脆弱であることから従来の パッチクランプ法の適用が困難であった.そのため、本 寄付講座が独自に改良した装置と微生物細胞の培養法を 合わせた独自のパッチクランプシステムを用いて巨大化 *E. coli*に機能的に発現させることに成功した Stc1の電 気生理学的機能解析を行った.その結果、Stc1はイオ ン輸送活性を示すこと、陽イオンを陰イオンより優先的 に輸送することを明らかにした.

Stc1の Synechocystis sp. PCC6803 における生理的役割 を明らかにするため、染色体上の Stc1にクロラムフェ ニコール遺伝子を挿入した遺伝子破壊株を作成して表現 型の観察を行った. 低濃度の KCIを含有する培地で培 養したところ、WTは正常な生育が見られたが、AStc1 の生育はWTと比較して非常に遅くなった. 高濃度の KCIを含有する培地で培養したところ AStc1の生育は WTと同等に回復した. このことから、Stc1が細胞外か らのK⁺もしくは CI⁻の取り込み、または細胞質内の K⁺ もしくは CI⁻のチラコイド内への輸送を担っていること が推察された. これまでに Synechocystis sp. PCC6803の 細胞膜に発現して K⁺ の取込みに関わる膜輸送タンパク 質として Kdp と Ktr が報告されており (Buurman et al., 1995; Durell et al., 2000)、これらの膜輸送タンパク質が 既に細胞膜に発現して K*の取込みを行っていることか ら、Stc1 が細胞外からの K*の取込みに関わっている可 能性は低く、Stc1 がチラコイド膜において K* もしくは Cl⁻の輸送に係ることが推察された.

Stc1はチラコイド膜に局在し、陽イオンを優先的に 輸送することから、Stc1の光合成活性への関与とその K*による影響について検討した.KCIを含有しない培 地に懸濁したWTとAStc1株それぞれの光合成活性を酸 素電極を使用して測定した.KCIを含有しない培地では、 AStc1の純光合成活性とETRがWTと比較して極めて 低い値を示した.ところが高濃度のKCIを含有する培地 ではAStc1の純光合成活性とETRがWTと同等にまで 回復した.一方で、PSIIの活性はWTとAStc1ともに KClの有無に関わらずほぼ同じ値を示した.このことか ら、Stc1はチラコイド膜に発現して光合成活性に大き く関わっていることが示された.さらに、AStc1では PSIIの活性に大きな影響は見られなかったことから、 Stc1はPSII以降の電子伝達系の活性に関わっているこ と示唆された.

植物・ラン藻の光合成研究においてこれ程までに光合 成活性に重要な役割を担うイオン膜輸送タンパク質は H^{*}輸送を担うシトクロムb₆fとATP合成酵素以外には報 告されていない.長い光合成研究の中で,光合成反応に 登場するタンパク質分子はほぼ明らかになったように思 われていたが,Stc1は新たな分子として加わることが 示された.

シロイヌナズナのチラコイド膜に局在するAtVCCN1 は、膜電位依存性の陰イオンチャネルであり、弱光から 強光への変動時に Δψの上昇を抑えることにより, PSII への光阻害を防ぐことが報告されている. AtVCCN1 は 哺乳類に広く保存されている陰イオンチャネルである Bestrophin ファミリーに属しているが相同性は低く,哺 乳類 Bestrophin には存在しない N 末端領域が確認され ている.AtVCCN1は、人工脂質膜を用いた機能解析例 のみであり、またその配向性が明らかになっていなかっ たため、チラコイド膜のどちらの方向に Cl を輸送するの か不明であった.本研究では,AtVCCN1:mGFP 遺伝子の 植物細胞の葉緑体への一過的発現と protease protection assay を組み合わせることにより、チラコイド膜におけ るAtVCCN1の配向性の決定を目指した. その結果. AtVCCN1のC末端はストロマ側に露出していることが 示された (Hagino et al., 2022). この結果と構造解析の 結果と合わせ、AtVCCN1のN末端領域とC末端領域は ストロマ側に位置することが明らかとなった(Hagino et al., 2022).

第三章 おわりに

上述のように, 膜輸送タンパク質は生命活動に欠かす ことができないにもかかわらず, 研究手法が充分でない ことに起因して, 理解が進んでいない. そのため, MCF 開発においても膜輸送は非常に重要であるが, 特 に排出膜輸送タンパク質についての理解は不足してお り, MCF 開発のボトルネックのひとつとなっている.

膜輸送タンパク質は周囲の脂質分子や膜電位などの影響を受けつつ大きな構造変化を伴いながら機能している が、上記のような研究手法の制限が原因で、膜輸送タン パク質の脂質分子との相互作用や動的挙動に基づく作動 機構の理解は充分ではない.

そこで、本寄付講座では、膜輸送タンパク質研究にお ける研究手法による制限を克服することを目標として、 独自に開発した革新的解析技術を活用すると共に、最新 の解析機器を導入し、膜輸送タンパク質の機能の解明と 「微生物膜輸送工学」への応用展開を目指した.

これらの解析手法を駆使して、MCFにおける exporter engineering, 並びに, 応用展開を志向した膜輸送タン パク質の基盤研究において独自性の高い複数の成果を挙 げてきた. この中には, exporter には高い特異性が重要 であるという従来の考えとは対照的に、選択性の低い チャネルでも MCF において効果的に exporter として機 能することを示したこと,多剤排出膜輸送タンパク質と して知られている膜輸送タンパク質が予想外に有用化合 物を排出すること、 ヘリックス間相互作用の強化は膜輸 送タンパク質の輸送活性向上のための普遍的ストラテ ジーのひとつになると考えられること、全原子分子動力 学シミュレーションが膜輸送タンパク質の動的挙動の理 解と合理的設計に効果的であること、光合成活性に必須 のチラコイド膜に存在する陽イオン膜輸送タンパク質の 発見など、今後の exporter engineering を含めた膜輸送 工学.及び, 膜輸送研究への大きな貢献が期待される成 果も含まれる.

さらに,知的財産権の都合で記すことが叶わなかった が,排出膜輸送タンパク質の探索と高機能化により,こ れまで抽出法で工業生産が行われてきた有用化合物の初 めての発酵生産に成功した.

本寄付講座は、多くの研究者と共同研究を実施してきた.それらの中には、膜輸送タンパク質に係る研究を進めている研究者が研究手法上のボトルネックを解決するために、本寄付講座との連携で進めてきたものも多い.その結果、本報告書に記載するに至っていない成果も含めて、多くの成果が創出された.このことは、本寄付講座設立段階での認識が正しかったことを示すと共に、本寄付講座が膜輸送タンパク質研究と膜輸送工学の発展に

いくらかは貢献できたことを示すものとして, 嬉しく感 じている.

今後、本寄付講座が開発してきた技術をさらに高度化 すると共に、多くの研究者にとってより使いやすい技術 となるように改良を重ね、 膜輸送タンパク質研究と膜輸 送工学の発展に貢献していきたいと考えている.

もちろん,本寄付講座が有する技術で解決できる領域 は限られている.今後,多種多様な革新的膜輸送タンパ ク質解析技術が誕生すること,従来の膜輸送タンパク質 解析技術の高度化と普及,並びに,多くの研究者の連携 の緊密化によって,膜輸送タンパク質研究と膜輸送工学 が大きく発展することを期待している.

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所の平成30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. 講座特任研究員 (矢部 勇博士), 寄付講座技術補佐員 (小西 智之さん, 毛利 さおりさん), 寄付講座事務補佐員 (伊藤 みどりさん,松田 英子さん)の協力のもとに実施 しました、東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグ ロバイオテクノロジー研究センター細胞機能工学研究室 教授 西山 真 博士からの多大なご支援と的確なご助言を 賜りましたことに深く感謝申し上げます. また. 本研究 成果は、名古屋大学未来社会創造機構 准教授 澤田 康 之 博士. 名古屋大学大学院医学系研究科 教授(当時) 曽我部 正博博士, Victor Chang Cardiac Research Institute (当時) 中山 義敬 博士, Victor Chang Cardiac Research Institute 教授 Boris Martinac 博士, 東京大学 大学院農学生命科学研究科 黄瀬 啓太 さん,東京大 学大学院総合文化研究科 助教(当時)神保 春彦 博士, 東京工業大学 科学技術創成研究院 教授 田中 宽博士, 東京工業大学 科学技術創成研究院 助教 前田 海成博士. 東京大学大学院農学生命科学科 教授 田野井 慶太朗 博 士, 杉本 雅一 博士, 夏目 亮 博士のご支援とご協力, 並びに. 微生物膜輸送工学寄付講座に在籍した大学院生 の皆さんの協力の賜物です.あわせて感謝申し上げます.

JSPS 科研費 基盤研究 (C) (橋本 賢一 19K05785), JSPS 科研費 新学術領域 (篠田 恵子 20H0453), 自然 科学研究機構 岡崎共通研究施設 計算科学研究セン ター (篠田 恵子 22-IMS-C089, 23-IMS-C077), 文部科 学省「富岳」成果創出加速プログラム「細胞内分子動態」 (篠田 恵子), JSPS 科研費基盤研究 (C) (浜本 晋 22K05425) の支援にも感謝いたします.

文 献

- Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP— Electrons, Proton Pumps, Rotors, and Poise. Cell 110: 273–276.
- Armbruster, U., Carrillo, L. R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtmann, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J. A., Kramer, D. M. & Jonikas, M. C. 2014. Ion antiporter acclerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. Nat. Commun. 5: 5439.
- Bali, A., Genee, H.J. & Sommer, M.O.A. 2018. Direct evolution of membrane transport using synthetic selections. ACS Synth. Biol. 7: 789–793.
- Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J. & Rabinowitz J.D. 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. Nat. Chem. Biol. 5: 593–599.
- Borshchevskiy, V. I., Round, E. S., Popov, A. N., Büldt, G. & Gordeliy, V. I. 2011. X-ray-radiation-induced changes in bacteriorhodopsin structure. J. Mol. Biol. 409: 813–825.
- Borshchevskiy, V., Round, E., Erofeev, I., Weik, M., Ishchenko, A., Gushchin, I., Misin, A., Willbold, D., Büldt, G. & Gordeliy, V. 2014. Low-dose X-ray radiation induces structural alterations in proteins. Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. 70: 2675–2685.
- Bossemeyer, D., Schlosser, A. & Bakker, E. P. 1989. Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. J. Bacteriol. 171: 2219–2221.
- Brawley, D.N., Sauer, D.B., Li. J. et al. 2022. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from Staphylococcus aureus. Nat. Chem. Biol. 18: 706–712.
- Buurman, E. T., Kim, K. T. & Epstein, W. 1995. Genetic evidence for two sequentially occupied K⁺ binding sites in the Kdp transport ATPase. J. Biol. Chem. 270: 6678–6685.
- Chang, G. Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T. & Rees, D.C. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. Science 282: 2220–2226.
- Claxton, D.P., Jagessar, K.L. & Mchaourab, H.S. 2021. Principles of alternating access in multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. J. Mol. Biol. 433: Article 166959.
- Dosch, D. C., Helmer, G. L., Sutton, S. H., Salvacion, F. F. & Epstein, W. 1991. Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: evidence for three constitutive systems mediating uptake potassium. J. Bacteriol. **173**: 687–696.
- Dukic, E., Herdean, A., Cheregi, O., Sharma, A., Nziengui, H., Dmitruk, D., Solymosi, K., Pribil, M. and Spetea, C. 2019. K⁺ and Cl⁻ channels/transporters independently fine-tune photosynthesis in plants. Sci. Rep. **9**: 8639.
- Durell, S. R., Bakker, E. P. & Guy, H. R. 2000. Does the KdpA Subunit from the high affinity K⁺-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K⁺ channels? Biophys. J. 78: 188–199.
- Fujitani, H., Matsuura, A., Sakai, S., Sato, H., & Tanida, Y. 2009. High-level ab initio calculations to improve protein backbone dihedral parameters. J. Chem. Theory Comput. 5: 1155–1165.
- Gadsby, D. 2009. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **10**: 344–352.
- Gullingsrud, J. & Shulten, K. 2003. Gating of MscL studied by steered molecular dynamics. Biophys. J. 85: 2087–2099.

- Hagino, T., Kato, T., Kasuya, G. *et al.* Cryo-EM structures of thylakoid-located voltage-dependent chloride channel VCCN1. 2022. Nat. Commun. 13: 2505
- Hamill, O.P. & Martinac, B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. Physiol. Rev. 81: 685–740.
- Han, T., Nazarbekov, A., Zou, X. & Lee, S.Y. 2023. Recent advances in systems metabolic engineering. Curr. Opin. Biotechnol. 84: 103004.
- Hashimoto, K., Murata, J., Konishi, T., Yabe, I., Nakamatsu, T. & Kawasaki, H. 2012. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**: 1422-1424.
- Hashimoto, K., Nakamura, K., Kuroda, T., Yabe, I., Nakamatsu, T. & Kawasaki, H. 2010. The protein encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel. Biosci. Biotechnol. Biochem. **74**: 2546–2549.
- Haupts, U., Tittor, J. & Oesterhelt, D. 1999. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding archaea's photosynthetic apparatus. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28: 367–399.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W. X., Zhang, Q. & Chang, G. 2010. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. Nature 467: 991–994.
- Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A. *et al.* 2016. A voltagedependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. Nat. Commun. 7: 11654.
- Hind, G., Nakatani, H. Y. and Izawa, S. 1974. Light dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71: 1484–1488.
- Huang, Y., Chen, W., Dotson, D.L., Beckstein, O. & Shen, J. 2016. Mechanism of pH-dependent activation of the sodiumproton antiporter NhaA. Nat. Commun. 7: 12940.
- Jin, Y., Nair, A. & van Veen, H.W. 2014. Multidrug transport protein NorM from *Vibrio cholerae* simultaneously couples to sodium- and proton-motive force. J. Biol. Chem. 289: 14624– 14632.
- Jinman, C., Kim, H., Oh, Y. & Park, J. 2013. U.S. Patent No. 8,530,200. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Jones, C.M., Lozada, N.J.H. & Pfleger, B.F. 2015. Efflux system in bacteria and their metabolic engineering applications. Appl Microbial. Biotechnol. 99: 9381–9393.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T. *et al.* 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596: 583–589.
- Kamiya, N., Kawamura M., Fujitani, H. & Shinoda, K. 2020. A new lipid force field (FUJI). J. Chem. Theory Comput. 16: 3664–3676.
- Kim, J., Kwag, Y., Park, J., Koh, E., Oh, Y., Chang, J., Lee, K., Sim, J., Han, J. & Park, Y. 2004. U.S. Patent No. 6,821,768. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kinose, K., Shinoda, K., Konishi, T., & Kawasaki, H. 2024. Mutational analysis in *Corynebacterium stationis* MFS transporters for improving nucleotide bioproduction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 108: 251.
- Ko, Y., Kim, j.W., Lee, j.A.; Han, T., Kim, G.B., Park, J.E. & Lee, S.Y. 2020. Tools and strategies of systems metabolic engineering

寿

for the development of microbial cell factories for chemical production. Chem. Soc. Rev. **49**, 4615–4636.

- Kumar, S., Athreya, A., Gulati, A., Nair, R.M., Mahendran, I., Ranjan, R. & Penmatsa, A. 2021. Structural basis of inhibition of transporter rom *Staphylococcus aureus*, NorC, through a single-domain camelid antibody. Commun. Biol. 4:836.
- Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. 2010. Mechanosensitive channels in microbes. Annu. Rev. Microbiol. 64: 313–329.
- Kuroda, T., Okuda, N., Saito, N., Hiyama, T., Terasaki, Y., Anazawa, H., Hirata A., Mogi, T., Kusaka, I., Tsuchiya, T. & Yabe, I. 1998. Patch clamp studies on ion pumps of cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **273**: 16897– 16904.
- Kwag, Y., Oh, K., Kim, J., Oh, Y., Sim, J., Park, Y. & Chang, J. 2008. U.S. Patent No. 7,456,010. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lee, C., Yashiro, S., Dotson, D., Uzdavinys, P., Iwata, S., Sansom M. S. P., von Ballmoos, C., Beckstein, O., Drew, D. & Cameron, A. D. 2014. Crystal structure of the sodium-proton antiporter NhaA dimer and new mechanistic insights. J. Gen. Physiol. 144: 529–544.
- Lee, S.Y., Kim, H.U., Chae, T.U., Cho, J.S., Kim, J.W., Shin, J.H., Kim, D.I., Ko, Y., Jang W.D. & Jang, Y. 2019. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. Nat. Catal. 2: 18–33.
- Levina, N., Tötemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A. & Booth, I.R. 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: Identification of genes required for MscS activity. EMBO J. 18: 1730–1737.
- Li, M., Svoboda, V., Davis, G., Kramer, D., Kunz, H. H. and Kirchhoff, H. 2021. Impact of ion fluxes across thylakoid membranes on photosynthetic electron transport and photoprotection. Nat. Plants 7: 979–988.
- López, J.M., Duran, L. & Avalos, J.L. 2022. Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering. Nat. Microbiol. 20: 35–48.
- Lu, M., Symersky, J., Radchenko, M., Koide, A. & Guo, Y. 2013. Structural insights into H⁺-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. Nat. Struct. Mol. Biol. 20: 1310–1317.
- Lv, X., Xue, H., Qin, L. & Li, C. 2022. Transporter engineering in microbial cell factory boosts biomanufacturing capacity. Biodes. Res. 2022: 9871087.
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. J. Bacteriol. 186: 6681–6688.
- Matsui, Y., Sakai, K., Murakami, M., Shiro, Y., Adach, S., Okumura, H. & Kouyama, T. 2002. Specific Damage Induced by X-ray Radiation and Structural Changes in the Primary Photoreaction of Bacteriorhodopsin. J. Mol. Biol. 324: 469–481.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature **191**: 144-148.
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. & Wachi, M. 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 4491–4498.

Nango, E., Royant, A., Kubo, M. et al., A three-dimensional

movie of structural changes in bacteriorhodopsin. Science. **354**: 1552–1557.

- Neher, E. & Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260: 799–802.
- Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J. & Landau, E. M. 2002. Bacteriorhodopsin: A high-resolution structural view of the archaeal photoreceptor. Biochim. Biophys. Acta 1565: 144–167.
- Nielsen, J., Tillegreen, C.B. & Petranovic, D. 2022. Innovation trends in industrial biotechnology. Trends Biotechnol. 40: 1160–1172.
- Nomura, T., Cox, C.D., Bavi, N., Sokabe, M. & Martinac, B. 2015. Unidirectional incorporation of a bacterial mechanosensitive channel into liposomal membranes. FASEB J. 29: 4334–4345.
- Nomura, T., Cranfield, C.G., Deplazes, E., Owen, D.M., Macmillan, A., Battle, A.R., Constantine, M., Sokabe, M, & Martinac, B. 2012. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 8770–8775.
- Ou, X., Blount, P., Hoffman, R.J. & Kung, C. 1998. One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11471–11475.
- Park, Y., Chang, J., Lee, J., Oh, K., Kim, J., Oh, Y. & Sim, J. 2009. U.S. Patent No. 7,608,435. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office (2009)
- Park, Y., Kim, H., Chohi, H., Lee, J., Hwang, S., Sim, J., Kang, T. & Lee, W. 2006. Korean Patent No. 100,588,577. Seoul: Korean Intellectual Property Office.
- Parsons, J. B. & Rock, C. O. 2013. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. Prog. Lipid Res. 52: 249–276.
- Sawada, Y., Murase, M. & Sokabe, M. 2012. The gating mechanism of the bacterial mechanosensitive channel MscL revealed by molecular dynamics simulations: From tension sensing to channel opening. Channels 6:317–331.
- Sawada, Y. & Sokabe, M. 2015. Molecular dynamics study on protein-water interplay in the mechanogating of the bacterial mechanosensitive channel MscL. Eur. Biophys. J. 44: 531–543.
- Sokolova, N., Peng, B. & Haslinger, K. 2023. Design and engineering of artificial biosynthetic pathways – where do we stand and where do we go?. FEBS Lett. 597: 2897–2907.
- Sukharev, S.I., Sigurdson, W.J., Kung, C. & Sachs, F. 1999. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. J. Gen. Physiol. 113: 525–540.
- Teshiba, S. & Furuya, A. 1984. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. excretion mechanisms of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 48: 1311-1317.
- Tzanov, A. T., Cuendet, M. A., & Tuckerman M. E. 2014. How accurately do current force fields predict experimental peptide conformations? An adiabatic free energy dynamics study. J. Phys. Chem. B 118: 6539–6552.
- Volkmer, B. & Heinemann, M. 2011. Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. PLoS One 6: e23126.
- Wang, Y., Cao, G., Xu, D., Fun, L., Wu, X., Ni, X., Zhao, S., Zheng P., Sun, J. & Ma, Y. 2018. A novel *Corynebacterium*

glutamicum L-glutamate exporter. Appl. Environ. Microbiol. **84**: e02691-17.

- Wang, C., Yamamoto, H., Narumiya, F., Munekage, Y. N., Finazzi, G., Szabo, I. and Shikanai, T. 2017. Fine-tuned regulation of the K⁺/H⁺ antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction. Plant J. 89: 540–553.
- Wickstrand, C., Dods, R., Royant, A. & Neutze, R. 2015. Bacteriorhodopsin: Structural insights from X-ray and electron crystallography. Biochim. Biophys. Acta. 1850: 536–553.
- Wisedchaisri, G., Park, M.S., Iadanza, M.G., Zheng, H. & Gonen, T. 2014. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. Nat. Commun. 5: 4521.
- Yang, T., Liu, Q., Kloss, B., Bruni, R., Kalathur, R. C., Guo, Y., Kloppmann, E., Rost, B., Colecraft, H. M. & Hendrickson, W.

A. 2014. Structure and selectivity in bestrophin ion channels. Science **346**: 355–359.

- Yoshimura, K., Batiza, A., Schroeder, M., Blount, P. & Kung, C. 1999. Hydrophilicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity. Biophys. J. **77**: 1960–1972.
- Yoshimura, K., Nomura, T. & Sokabe, M. 2004. Loss-of-function mutations at the rim of the funnel of mechanosensitive channel MscL. Biophys. J. 86: 2113–2120.
- Yoshimura, K., Usukura, J. & Sokabe, M. 2008. Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel MscL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 4033–4038.
- Zhang, Y.M. & Rock, C.O. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 6: 222–233.

メカノセンシティブ チャネルの解析と その微生物膜輸送工学に向けた応用展開

橋本 賢一, 川崎 寿

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 微生物膜輸送工学寄付講座 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Analysis of mechanosensitive channels and their application to microbial membrane transport engineering

Ken-ichi Hashimoto, Hisashi Kawasaki

Laboratory of Microbial Membrane Transport Engineering Agro-Biotechnology Research Center Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

Although synthetic biology has made remarkable progress in recent years toward the design of microbial cell factories (MCFs) that produce a variety of valuable channels, many unexplored areas in the field of exporter engineering still remain due to the difficulty of research. We focused on mechanosensitive channels (Msc), which are responsible for L-Glu export in industrial L-Glu-producing MCF. In this study, we characterized the properties of Msc and explored its potential as a versatile exporter. The introduction of Msc genes carrying a gain-of-function (GOF) mutation into MCFs successfully increased the production rate of valuable chemicals such as L-Lys, and inosine 5′-monophosphate (5′-IMP). In contrast to the conventional view that high specificity is required for an exporter, our results demonstrated that even a channel with low selectivity can function effectively as an exporter in MCF.

Furthermore, our findings on the dynamic gating behavior of mechanosensitive channel of large conductance (MscL) obtained by all-atom molecular dynamics simulations provide clues to understanding the mechanism by which G46D substitution of MscL leads to GOF. Specifically, the G46D substitution causes a kink at A38 of the first transmembrane helix (TM1), which may affect the interaction between TM1 and TM2 and destabilize the gate in closure state, resulting in a GOF. To verify this, we introduced a double substitution gene with A38V and G46D, which interferes with A38 kink, into 5'-IMP-producing MCF, and the effect of G46D on 5'-IMP production rate per cell was abolished. These demonstrate that molecular dynamics simulation is effective in understanding the complex mechanism of the Msc gating and has great potential as a tool for designing functionally improved Msc.

Key words: exporter engineering, microbial cell factory, mechanosensitive channel, patch-clamp technique, molecular dynamics simulation

E-mail: ukawasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

		_	
共同研究者:	小西	智之	(東京大学大学院農学生命科学研究科).
	澤田	康之	(名古屋大学未来社会創造機構).
	曽我剖	了正博	(名古屋大学大学院医学系研究科).
	中山	義敬	(Victor Chang Cardiac Research
			Institute).
	Boris Martinac (Victor Chang Cardiac Research		
Institute).			

緒 言

環境意識の高まりと化石資源の偏在に起因する地政学 的不安定性などを背景として,持続可能性と回復力を高 める社会改革が急務となっている(Nielsen *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2023).再生可能な資源から価値ある化合物 を生産する微生物細胞工場(MCF)への注目も高まっ





Figure 1 Concept of exporter engineering and the goal of this research.

ている.最近の合成生物学の進歩により,生合成経路設計が可能な範囲が拡大し,MCFによって製造される化合物の多様性が拡大すると共に,非可食資源を利用する技術が進歩している(Lee et al., 2019; Ko et al., 2020; Sokolova et al., 2023).同時に, 膜輸送の領域が,MCF開発における重要なフロンティアとして再浮上している(Fig.1)(López et al., 2022).合成された標的化合物の細胞内から細胞外への排出を促進することは,一般に商業生産に有益である.その理由は,このプロセスが,標的化合物の生合成の制限を緩和し,細胞内に蓄積した標的化合物の分解や毒性のリスクを抑制すると共に,標的化合物の回収と精製の工程を合理化することである(Jones et al., 2015; Lv et al., 2022).

標準的な合成培地を用いたバッチ培養では、E. coliの 細胞体積は、OD₆₀₀=1の時、培養液の約1/280に相当 する (Volkmer & Heinemann, 2011). このことは、も し細胞内に蓄積された標的化合物を細胞外に排出できれ ば、たとえそれが受動拡散によって標的化合物の細胞外 濃度と細胞内濃度を等しくすることであったとしても, バッチ培養あたりの標的化合物の収量を280倍増加させ ることができることを示している. さらに、能動輸送機 構を採用できれば、バッチ培養あたりの標的化合物の生 産量を大幅に向上させることができる.しかし、MCF における標的化合物の細胞外への排出, MCF に適した 排出膜輸送タンパク質の探索と選択,設計に関連する exporter engineering は、比較的進んでいない. この分 野での研究が限られているのは、複雑で手間のかかる実 験方法に起因する排出膜輸送タンパク質に関する理解が 不充分な結果である. さらに, 目的によっては適切な実 験手法がないため、この領域の知識がさらに制約されて

いる (Bali et al., 2018; López et al., 2022).

原核生物と真核生物の細胞質膜に存在するメカノセン シティブ チャネル (Msc)は、膜張力に応答して活性化 され、イオンを輸送する. Supplementary Fig.1は. 膜張 力の感知からチャネルゲートの開口までのプロセスを描 いた模式図である. Msc は物理的刺激を化学的刺激に変 換する機能を持つため,外部からの刺激伝達に関わる生 理学的メカニズムを理解する上で重要なタンパク質であ ることから、古くから研究が進められてきた、細胞は、触 覚, 音の検出, 重力の感知, 浸透圧調節など, 様々な生理 的機能において Msc を利用している (Hamill & Martinac. 2001; Kung et al., 2010). 特に, 広く研究されている細 菌の2種類の Msc. すなわち, MscL (mechanosensitive channel of large conductance) & MscS (mechanosensitive channel of small conductance) は, 低浸透圧ショック時 の細胞破裂から細菌を守る上で重要な役割を果たしてい る. これらのチャネルは、細孔を開いて小さな溶質と水 を放出し、効果的に「安全弁」として機能することによっ て、これを実現している(Levina et al., 1999).

最近の研究で, E. coli の MscS に類似した Corynebacterium glutamicum のメカノセンシティブチャネルである MscCG (NCgl1221)が、グルタミン酸 (L-Glu)を生産する MCF でL-Glu 排出を担うことが明らかになった (Nakamura et al., 2007; Hahsimoto et al., 2010; Hashimoto et al., 2012; Wang et al., 2018). MscCG による L-Glu 排出において、 膜電位および ATP 等のエネルギーが不要であることは、 細菌の全細胞および全液胞様構造体を用いた解析を可能 にする、我々のユニークな微生物細胞用のパッチクラン プシステムを用いることで初めて達成された (Hashimoto et al., 2010; Hashimoto et al., 2012). パッチクランプ法は、 ガラス微小電極を用いて生体膜を通過するイオンの移動 を電流として測定する方法で,膜を通過するイオン輸送 の測定法として多くの利点がある.その利点には,高い 時間分解能と定量性,並びに,膜の張力を操作・調節で きることなどがある.しかし,主として以下の理由で電 極ピペットの細胞質膜へのアクセスが制限されるため, 微生物へのパッチクランプ法の適用は極めて限定的で あった.①微生物細胞はサイズが小さく,パッチクラ ンプ法で使用する電極ピペットの直径とほぼ同等であ る.②微生物細胞では細胞膜の外側に細胞壁が存在す る.我々は,独自のアプローチによってこれらの課題を 克服し,微生物やオルガネラに特化したパッチクランプ システムを開発した(Kuroda *et al.*, 1998).

デジタルトランスフォーメーションはバイオテクノロ ジーにも大きな影響を与え、AlphaFold2(Jumper et al., 2021)のような注目すべき成果をもたらした.しかし, 脂質分子と相互作用し、大きな構造変化を伴いながら機 能する膜輸送タンパク質について分子動力学(MD)シ ミュレーションなどによる動的挙動解析に基づく改良の 成功例は限られている。一方,酵素については、酵素と 基質の相互作用など、タンパク質の局所領域のシミュ レーションに基づく改良の成功例が多数存在する. Msc の開口メカニズムを理解することは、MCFの発展を加 速する Msc をデザインすることに繋がる. Msc の立体 構造は Chang et al. (1998) によって解明され, 特にパッ チクランプ法を用いた広範な生理学的実験が行われてき た (Sukharev et al., 1999; Nomura et al., 2012; Nomura et al., 2015; Yoshimura et al., 1999; Yoshimura et al., 2004; Yoshimura et al., 2008). さらに, 先行研究では MscLの 開口ダイナミクスについて MD シミュレーションが行わ れている (Sawada et al., 2012; Sawada & Sokabe, 2015; Gullingsrud & Shulten, 2003). したがって, MscLを実 験と計算の両方に用いることは、原子レベルでの開口挙 動の変化を理解する上で有効なアプローチとなると考え られる.

本研究では、我々が開発したユニークなパッチクラン プシステムを用いて、Mscが様々な低分子化合物を排 出する能力を持つことを実証した.この結果を基に、 MCFにおいて、Mscを exporter として用いることで、 いくつかの価値ある化合物の生産性を向上させることに 成功した.このことは、Mscを活用することで多種類 の有用化合物の生産性の向上が可能であることを示して いる.

さらに, MD シミュレーションは, Msc のダイナミッ クな開口挙動を解析し, その改良・設計に有効なツール となり得ることが示唆された.

実験方法

微生物細胞用パッチクランプシステムによるメカノセン シティブ チャネル(Msc)の解析

パッチクランプ解析は既述の方法で行った(Kuroda et al., 1998; Hashimoto et al., 2010; Hashimoto et al., 2012).以下に簡潔に説明する.キシロース誘導プロモー ターで制御下されるようにした野生型 MscCG 遺伝子 を,全てのメカノセンシティブチャネル遺伝子を破壊 した枯草菌 M168株の染色体の amyE 領域に挿入した. リゾチームを用いて細胞壁を分解し、スフェロプラスト を得た.このスフェロプラストを,細胞壁合成阻害剤を 含む適切な浸透圧の培地で培養し、巨大スフェロプラス トを生成させた.この巨大スフェロプラスト内で生成し た液胞様構造体(直径:5-20µm)を,既知の方法(Kuroda et al., 1998; Hashimoto et al., 2010)を用いて抽出した.

液胞様構造体全体の記録は、以前に記載された方法 で行った (Kuroda et al., 1998; Hashimoto et al., 2010). 要約すると、液胞様構造体を、bath buffer (50.0mM HEPES, $600 \text{ mM} \vee \nu \vee \vdash \vdash - \nu$, $10.0 \text{ mM} \text{ MgCl}_2$, 29.2mM KOH. pH 7.00) で満たされたチャンバー内に 静置した. パッチピペットは、プラーマシン (Model PC 10; Narishige, Tokyo, Japan)を用いて、キャピラリー (Drummond Scientific, Broomall, USA) を約12.5-25MQ となるよう引っ張り作製した.次に, bath buffer で満た されたピペットを. 穏やかな吸引を加えながら. 液胞様 構造体にそっと接触させた. Zap パルスを加えることに より、膜に小さな穴をあけ、ガラス微小電極の内部と液 胞様構造体の内部を連結した.正の電流は、正の電荷が 細胞質から巨大液胞様構造体内部に移動することを表 す. 電圧は0mVに維持した. 記録はすべて室温 (20-25℃)で行った. 巨大液胞様構造体の膜張力は, ピペットから陽圧をかけることで徐々に高めた. イオン 電流はパッチクランプアンプ (CEZ-2400;日本光電,東 京)を用いて記録した.

メカノセンシティブ チャネルの発酵生産での活用

野生型 E. coli として E. coli K-12 W3110 を用いた. L-Lys 生産 E. coli として, 既報の菌株を用いた(Nakanishi et al., 2010). この菌株は, E. coli JM109 を, フィード バック阻害解除型アスパラギン酸キナーゼをコードする 遺伝子をプラスミドで増強した株である. 5'-IMP 生産 E. coli 株として, 既報の菌株を用いた(Kakehi et al., 2007). この株は, E. coli W3110 を親株として purF, purA, deoD, purR, add, edd, pgi, yicP, xapAの9遺 伝子を破壊したイノシン生産株(Shimaoka et al., 2007) の5'- スクレオチド分解活性を低下させるために, ushA と *aphA*の2つの遺伝子を破壊した株を宿主として, フィードバック阻害解除型 PRPP アミドトランスフェ ラーゼをコードする遺伝子をプラスミドを用いて増幅し た株である.5'-IMP 生産 *E. coli* 株として, 既報の別の 菌株も用いた (Kinose *et al.*, 2024). この株は, 上記の 5'-IMP 生産株の MscL 遺伝子を破壊した株である.

機能獲得(gain-of-function (GOF))変異(A111Vま たはW15CSLW)を有するMscCG(NCgl1221)遺伝 子(Nakamura et al., 2007)は、対応するゲノム変異を 有する C. glutamicum のゲノム DNAを鋳型として、PCR を用いて取得した.取得した遺伝子の塩基配列は、意図 した変異を含み、それ以外の変異がないことを確認した. GOF 変異を導入した MscCG 遺伝子を、lacPO system の制御下で中程度のコピー数のプラスミドベクターを用 いて、各 E. coli に導入した.

*E. coli*の野生型 MscL 遺伝子, GOF 変異(G30E また はG46D)を有する MscL 遺伝子(Ou *et al.*, 1998), お よびA38VとG46Dの二重変異を有する MscL 遺伝子は, フナコシ(日本, 東京)により化学的に合成された. そ の後,これらの遺伝子を, *lacPO* systemの制御下で中 程度のコピー数のプラスミドベクターを用いて, 染色体 上のMscL 遺伝子を欠失させた 5′-IMP 生産 *E. coli* に導 入した.

培養方法は以前に報告されたものと同様である (Kakehi et al., 2007; Nakanishi et al., 2010). 抗生物質や 必要な添加物は各株に適切な濃度となるよう添加した. 培 地組成は、20g/Lグルコース、16g/L(NH₄)₂SO₄、1g/L KH₂PO₄、0.01g/LFeSO₄·7H₂O、0.01g/LMnSO₄·5H₂O、 1g/LMgSO₄·7H₂O、30g/LCaCO₃、100µMIPTG(pH 7.1)である. 5′-IMP生産 E. coli を培養する場合、8g/L の酵母エキスを培地に添加した.

MscCG導入によるL-Glu 生産への効果を確認する実 験において,野生型 MscCG遺伝子,または,GOF 変 異を有する MscCG遺伝子を発現する *E. coli*の培養は, 生物学的に独立して5回実施し,培養開始後3,6,9,12, 15,18,21,24時間目にサンプリングを行った.細胞当た り生産速度は,L-Gluを活発に生産している培養12時間 目と培養9時間目のL-Glu濃度の差を,この間の時間(h) と培養12時間目のOD で除して計算した.

MscCG 導入による L-Lys 生産への効果を確認する実 験において,野生型 MscCG 遺伝子,または,GOF 変 異を有する MscCG 遺伝子を発現する L-Lys 生産 *E. coli* の培養は,生物学的に独立して5回実施し,6,12,18, 36,48,60,72 時間目にサンプリングを行った.細胞当た り生産速度は,L-Lys を活発に生産している培養18 時間 目と培養6時間目の L-Lys 濃度の差を,この間の時間(h) と培養18 時間目の OD で除して計算した. MscCG導入による5'-IMP生産への効果を確認する実 験において,野生型MscCG遺伝子,または,GOF変 異を有するMscCG遺伝子を発現する5'-IMP生産*E.coli* の培養は,生物学的に独立して4回実施し,サンプリン グは24,48,72時間目に行った.サンプリング時間は詳 細な予備実験に基づいて決定した.細胞当たり生産速度 は、5'-IMPを活発に生産している培養48時間目と培養 24時間目のL-Glu濃度の差を,この間の時間(h)と培養 48時間目のODで除して計算した.

MscL導入による5'-IMP生産への効果を確認する実験において,野生型MscL遺伝子,または,GOF変異を有するMscL遺伝子を発現する5'-IMP生産*E. coli*の培養は,生物学的に独立して4回実施し,21,24,47時間目にサンプリングを行った.サンプリング時間は詳細な予備実験に基づいて決定した.細胞当たり生産速度は, 5'-IMPを活発に生産している培養47時間目と培養24時間目の5'-IMP濃度の差を,この間の時間(h)と培養47時間目のODで除して計算した.

G46DとA38Vの二重変異を有するMscL遺伝子を発 現する5'-IMP生産*E. coli*の培養は、生物学的に独立し て4回実施し、21,24,47時間目にサンプリングを行った. サンプリング時間は詳細な予備実験に基づいて決定し た.細胞当たり生産速度は、5'-IMPを活発に生産して いる培養47時間目と培養24時間目の5'-IMP濃度の差 を、この間の時間(h)と培養47時間目のODで除して 計算した.

Fig.3には、これらの独立した実験から得られた平均 値と標準誤差を示した.

L-Gluの定量は、株式会社ヤマサ(千葉県,日本)の グルタミン酸オキシダーゼ(Kusakabe *et al.*, 1983)を 利用したキットを用いた.L-Lysの定量は、島津製作所(京 都、日本)のアミノ酸分析装置を用いた、ヌクレオシド、 ヌクレオチドおよび核酸塩基は、既報のように、GS-220 HQカラム(島津GLC,東京,日本)を用いたHPLC で分析した(Kakehi *et al.*, 2007).

全原子分子動力学シミュレーションによるメカノセンシ ティブ チャネルの開口挙動解析

シミュレーションのためのシステムセットアップ

本研究では、E. coli 由来のMscLの構造として Protein Data Bank (PDB) に 2OAR で登録された構造を 用いた. MscLの構造は閉じた状態のもので,以前の研 究でS1 ヘリックス部位については細胞内側の脂質膜に 平行するように構造改変が施されている.モデリングの ソフトとして VMD を用い,MscL構造モデルは十分に 水和化された POPC 脂質膜に埋め込んだ.さらに,細 胞膜内外に TIP3P 水分子モデルを配置することで,溶 媒和状態にした(Grubmüller, 1996). 最後に, タンパ ク質構造の骨格を座標固定した状態で10,000 ステップ のエネルギー極小化計算を施した後, それを解除した状 態で200 nsec のエネルギー平衡化計算を施した. 分子サ イズは, 全体として約 156,000 原子, 脂質分子が約 323 分子, 水分子は約 35,000 分子であった.

アミノ酸置換型 MscLのモデリング

G30EならびにG46D置換型MscLは、VMDの Mutate Residue ユーティリティーを用いて野生型(以下, 野生型)をもとにしてモデル化した(Humphrey et al., 1996). 手順としては、置換するアミノ酸残基の箇所に 対して, Glu (G30E の場合) ならびに Asp (G46D) に 置換するよう、対象アミノ酸残基の番号ならびに置換後 のアミノ酸残基の3文字表記を入力する. それにより. 構造情報ファイルも含めてプログラムにより自動生成さ れる. モデル作成後は、10,000ステップのエネルギー極 小化計算を行うことで、自動生成の変異による空間的な 障壁を回避する. その後. 脂質膜を引っ張らない状態で のエネルギー平衡化計算を 200 nsec 実施した. 平衡化計 算時は. 脂質膜内には先行研究によると resting tension が発生していることが報告されている. それを示す脂質 膜内の圧力分布図においては、細胞外側ならびに細胞内 側の脂質分子グリセロール骨格付近にそれぞれ陰圧の鋭 いピーク状の値を示すことが知られている(Cantor, 1997).

計算に関する詳細

すべての MD 計算は NAMD Ver 2.14 を用いて実行し. 力場パラメータには CHARMM27 ならびに CHARMM36 を用いた (Kalé et al., 1999; MacKerell et al., 1998; Reiling et al., 1996; Darden et al., 1993). エネルギー平衡化計算 ならびに膜張力増大のシミュレーションは、いずれも 1気圧,310Kの条件下でNPTアンサンブルを用いて実 行した. 長距離静電相互作用の見積もりには particlemesh Ewald 法を用い,近距離静電相互作用の計算や van der Waals 力計算は 12Åの距離でカットオフした. モデルサイズは120×120×100Åで、周期境界条件を用 いて計算を実行した. 可視化や分子モデル改変, 解析な どは全て VMD に搭載されている Tcl スクリプト言語に よるプログラムを活用して実行した. 膜張力を増大させ る全てのシミュレーションでは、脂質膜内のみの圧力を 平面方向へ下げることで張力を再現し、その大きさが 75 dyn/cmになるようにした.同時に,膜面に垂直な方 向(z方向)については、通常の1気圧が維持されるよ うに設定した. この方法の詳細は, 澤田らの論文で詳細 が記載されている (Sawada et al., 2012). 本研究で再現 したチャネルの構造変化に要するシミュレーション時間 については、実際の実験で起きる時間(~10µs)よりも 明らかに短いが、本研究で用いた手法においてチャネル 開口に関する重要な要素は損なわれていないことが、こ れまでの先行研究から明らかになっている.

解析

シミュレーションの結果から得られる相互作用エネル ギーの解析については、VMD内にあるNAMDENERGY プラグインを用いてシミュレーションのトラジェクト リーから計算した. MscLポアの最小半径は、球体状の プローブを想定して計測するHOLEプログラムにより 達成した (Smart *et al.*, 1996). ポア半径は、Leu19の ある箇所がポア内で最も空間的に狭い領域であることか ら、そこでの半径を最小半径とした. 膜貫通へリックス 内で発生した kink については、アミノ酸残基の Ramachandran プロットを描くために phi ならびに psi 角を計算することで評価した.

結 果

微生物膜輸送タンパク質活性解析システムを活用したメ カノセンシティブ チャネルの解析

微生物細胞にパッチクランプ法を適用するため、実験 方法で記したようにSI法を用いて巨大スフェロプラス トを調製した(Kuroda et al., 1998)(Supplementary Fig.2A, B). 巨大スフェロプラスト内には、膜小胞が内 側に張り出した液胞様構造体がしばしば生じる (Supplementary Fig.2C).液胞様構造は、表裏が反転 した膜胞であるため(Kuroda et al., 1998),排出を膜胞 内への取り込みとして測定することが可能であり、排出 活性を測定するのに有利である(Supplementary Fig.2D). そこで、ここでの解析には液胞様構造体を用 いた.これらの液胞様構造体は、呼吸鎖 NADH デヒド ロゲナーゼによる NADH 依存的 H⁺輸送を検出すること により、表裏が反転したの膜胞であることを確認した (Supplementary Fig.2E, F).

Fig.2に示すように、MscCGは既に報告されている L-GluとL-Asp (Hashimoto *et al.*, 2010)に加えて、L-Lys やフェニルプロピオン酸(L-Phe 類縁化合物)を排出す ることが明らかとなった.このことは、Mscが一連の 小分子化合物を排出できることを示唆しており、Msc が多目的な排出膜輸送タンパク質として機能する可能性 を示している.注目すべきは、Mscがその輸送機能に おいて、主に排出される化合物のサイズに基づく非選択 性を示したことである.



Figure 2 Direct verification of exporter activity using a unique microbial patch-clamp system. The upper panel shows the electric current measured using our microbial patch-clamp system, and the middle panel shows the pressure applied to vacuole-like structure to activate Msc. The lower panel is schematic representation of the experimental results, showing the target chemical was transported across the membrane through Msc. The buffer without the target chemical (A), or with 15mM glutamate (B), 15mM aspartate (C), 15mM phenylpropionate (PPA, a phenylalanine analogue, (D)), or 15mM lysine (E) were used. The experiments were conducted in duplicates. Representative results are shown.

メカノセンシティブ チャネルの発酵生産での活用

Msc が MCF において多用途型排出膜輸送タンパク質 として活用できるかを確認するために,遺伝子工学的手 法により生合成経路が強化された L-Lys 生産 E. coli,お よび,5'-IMP 生産 E. coli に MscCG 遺伝子を導入した. L-Lys は L-Glu に次いで生産量の多いアミノ酸であり, 飼料などに利用されている.5'-IMP はうま味調味料な どに利用されている.

Msc は 膜張力の上昇に 反応して活性化されるため, 通常の培養条件下では Msc は不活性な状態である (Ou *et al.*, 1998). そこで, GOF 変異を有する Msc 遺伝子を 用いた. また, MscCG の構造は *E. coli* の MscS と大き く異なるため, 内在性 Msc との相互干渉は無視できる と考えられることから, 宿主 *E. coli* の染色体上の Msc 遺伝子は破壊せずに宿主として用いた. MscCG 遺伝子の GOF 変異は C. glutamicum において L-Glu 生産を誘導することから(Nakamura et al., 2007), 野生型 E. coli に GOF 変異を有する MscCG 遺伝子を導 入し, L-Glu 生産を誘導するか確認した. 細胞当たりの 生産速度は, L-Glu を活発に生産している9時間と12時 間のデータを用いて計算した. Fig.3Aに示すように, GOF 変異を有する MscCG の遺伝子を導入すると, 細 胞当たりの L-Glu 生産速度が向上したことから, 導入 した遺伝子が発現し, MscCG が E. coli 内で機能して いることが示された. MscCG 導入による生育への影 響は, 培養15時間まではほとんど認められなかった (Supplementary Fig.3). GOF 変異を有する MscCG 遺 伝子を導入すると, L-Glu の生合成経路を強化すること なく L-Glu 排出が誘導されることは, 細胞内に L-Glu が 豊富に存在することを反映していると考えられる



Figure 3 Exporter engineering in microbial cell factories using Msc.

Production rates of target chemicals per optical density at 660 nm are shown. (A) L-Glu production rates per OD₆₀₀ by wild-type *E. coli* expressing wild-type MscCG gene or MscCG gene with GOF mutation (n=5). (B) L-Lys production rates per OD₆₀₀ by L-Lys-producing *E. coli* expressing wild-type MscCG or MscCG gene with GOF mutation (n=5). (C) 5'-IMP production rates per OD₆₀₀ by 5'-IMP-producing *E. coli* expressing wild-type MscCG gene or MscCG gene with GOF mutation (n=4). (D) 5'-IMP production rates per OD₆₀₀ by 5'-IMP-producing *E. coli* expressing wild-type MscCG gene with GOF mutation (n=4). (D) 5'-IMP production rates per OD₆₀₀ by 5'-IMP-producing *E. coli* expressing wild-type MscL gene, MscL gene with GOF mutation, or another MscL gene derivative (n=4). EV represents values of a control strain harboring empty vector.

Values are presented as mean values and standard errors. The *t*-test was performed and *p*-values are also shown.

(Bennett *et al.*, 2009).

L-Lys 生産 E. coli に 111 番目の Ala を Val に置換した GOF 変異を持つ MscCG 遺伝子を導入すると, Fig.3B に示すように, L-Lys 生産速度が期待通りに向上した. 細胞当たりの生産速度は, L-Lys を活発に生産している 6時間と 18時間のデータを用いて計算した. この菌株 の生育は, 空ベクターを導入した対照菌株の生育よりも やや悪かったが (Supplementary Fig.4), これは L-Lys 生産を反映していると考えられる.一方, 15番目の Trp を CSLW に置換した GOF 変異を持つ MscCG 遺伝子を L-Lys 生産 *E. coli* に導入しても、L-Lys 生産速度の改善は 見られなかった. この予期せぬ食い違いの背後にある理 由はまだ分かっていない. L-Lys の正電荷と置換されたア ミノ酸残基との相互作用が影響しているのかもしれない.

 次に、5'-IMP生産 E. coli へGOF変異を持つ MscCG 遺伝子を導入し、その効果を確認した。MscCGは MscSファミリーに属するので、その孔径はMscSの孔
 径(推定孔径:約1.8nm (Sukharev, 2002)と同様と仮 定すると、5'-IMPを排出するのに十分である。しかし、
 予想に反して、GOF変異を有する MscCG 遺伝子を5' -IMP生産 E. coli に導入しても, Fig.3Cに示すように, 細胞当たりの生産速度の大幅な改善は認められなかっ た.細胞当たりの生産速度は,5'-IMPを活発に生産し ている24時間と48時間のデータを用いて計算した.一 方,GOF 変異を有する MscCG 遺伝子を導入した株の 生育は,空ベクターを持つ対照株とほぼ同様であった (Supplementary Fig.5).これは,5'-IMPを少量しか排 出できなかったことを反映していると考えられた.

MscCGは5'-IMPを排出するのに十分な孔径を持たな いという推定に基づき,MscSよりも大きな孔径(推定 細孔径:約3.0nm(Cruickshank et al., 1997))を有す るMscLの遺伝子を5'-IMP生産E. coliに導入した. MscLはホモ5量体として機能するため,内在性MscL との相互干渉を避けるため,染色体のMscL遺伝子を欠 失させた株を宿主として用いた.GOFの性質をもつ G46D置換型(Ou et al., 1998)のMscL遺伝子を導入す ると,細胞当たりの5'-IMP生産速度は大幅に向上した (Fig.3D).生産速度は5'-IMP生産が活発な24時間と 47時間のデータを用いて計算した.このG46D置換型 MscL遺伝子導入株の生育は対照株より低かった (Supplementary Fig.6).このことは、5'-IMP生産速度 の大幅な向上を反映していると考えられる. 全原子分子動力学シミュレーションによるメカノセンシ ティブ チャネルの開口挙動解析

E. coli MscLの野生型とGOFの性質をもつG30E, G46D 置換型(Ou et al., 1998)との開口挙動の差異を 解析するために、最初に POPC 脂質二重膜に埋め込ん だモデルを作成し、その後、野生型ならびに各置換型 MscL について, 平衡化計算を実行した (Fig. 4A, 4B). この平衡化シミュレーションの過程では、完全に開口す ることはなかった.これは、G30EとG46Dがいずれも 膜張力を増大させない状態では閉状態を維持できていた ことを示唆している. さらに、野生型ならびに各置換型 モデルに対して、水分子をポア内に浸潤させた. これに より、ゲートと呼ばれるポアの最も空間的に狭い部分で 水分子が存在していないことを確認した. ゲート領域は Lei19-Val23間で主に疎水性アミノ酸残基で構成されて いる. 特に, 最も狭い Leu19 については, ポアの内側を 向いて配置されている. これらの結果は, G30E, G46D 両置換型は膜内張力を増大させない状態では閉じた状態 を維持し、野生型と比較しても差異のない状態であるこ とを示している.

さらに各 MscLモデルに対して 200 nsec の平衡化計算 後,200 nsec の膜張力増大のシミュレーションを実施し



Figure 4 The structure of MscL modeled in this study. Side (A) and top (B) views of the structural model of *E. coli* MscL (Sawada and Sokabe, 2015). The red arrows depict the direction of increased membrane tension occurring solely within the membrane. (C-E) Snapshots of the top view in WT (C), G30E (D), and G46D (E) MscL after 200ns of the opening simulation. The value defined as an average pore radius at the most constricted part of the pore formed by amino acids Leu19 to Val23 is described in each figure.

た.実験方法のセクションに記した通り、本研究では脂 質膜内にのみ膜面に平行な方向へ圧力を下げることに よって引っ張る力を作った.この条件下での MscL の構 造変化において、全てのモデルで類似の傾向がみられた. すなわち, Fig.4C-Eに示すように, 野生型, G30E, G46D それぞれで開口する様子が確認できた.この時, 平均ポア半径は、野生型で1.02Å、G30Eで2.08Å、 G46D で 2.37 Å であり、G30E、G46D はいずれも野生型 と比べて開口速度が速かった.この結果は、これら GOFの生細胞での表現型(Ou et al., 1998)と整合して いることから、本シミュレーションは妥当と判断し、解 析を継続した. Fig.5で示すように、ポアを形成する内 側にある膜貫通αヘリックスについては、ポアのゲート 領域が広がるにつれて、徐々に傾斜する様子が見られた. これは、同チャネルの開口挙動に関する先行研究で判明 している挙動と同じであった.

G30EならびにG46D置換型がなぜ野生型より速く開 口するのかを理解するために、構造解析ならびに動的解 釈を詳細に行った.本研究では、5'-IMP生産において 効果を確認した G46D 置換型について特に注目し、詳細 を解析した.はじめに、内側TM1 膜貫通へリックスが ヘリックス構造を維持しているかどうかを評価した. そ の際, TM1 ヘリックスにおけるそれぞれのアミノ酸残 基に対して, Ramachandran プロットを計算した. Fig.6 は、Ala38のアミノ酸残基に対して、そこでの二面角 phi, psiを計算することで得られるプロットを示してい る. その結果,野生型においては, Ala38 でのプロット はαヘリックス構造に相当することを示すエリアにプ ロットがある. しかしながら, G46D 置換型については, その領域にプロットが無い. この違いは, G46D 置換型 はA38においてヘリックス構造が維持できなくなって いることを示している. さらに. G46D 置換型の Ala38 付近で確認されたヘリックスが維持できていない箇所に おいて, kink が発生していた. したがって. このヘリッ クス構造が維持できなくなっていることやA38でのkink が、開きやすい主たる要因である可能性が考えられた.



Figure 5 Snapshots of side view of transmembrane (TM1) helix of MscL. WT (A-C), G30E (D-F) and G46D (G-I) views at the opening simulation time of 0 ns (A, D and G), 100 ns (B, E and H) and 200 ns (C, F and I). Gly46 in WT is depicted in orange and Glu30 and Asp46 in G30E and G46D are depicted in red VDW representation, respectively. The white arrows depict the position of the kink occurred during the opening simulation.

橋本 賢一, 川崎 寿



Figure 6 (A and D) Snapshots of the configuration focusing on the conformation at Ala38 in WT (A) and G46D (D) at the 200 ns of the opening simulation. In both snapshots, one TM1 helix is shown in blue except for the region between Ala38 and the amino acid 46 (Gly46 in WT and Asp46 in G46D), which is shown as a yellow-colored ribbon; Ala38 and the amino acid residue 46 are depicted in gray and brown colored VDW representation, respectively. (B and E) The Ramachandran plot of Ala38 in five TM1 helix at the 200 ns of the opening simulation with yellow dots showing the plot of each Ala38 in WT (B) and G46D (E). (C and F) Schematic representation showing TM1 helix with the positions of Ala38 and the amino acid residue 46 (Gly46 in WT and Asp46 in G46D) with yellow, red, and green circles in WT and G46D, respectively. The periplasmic loop is represented as the motion direction with blue arrow.

MDシミュレーションで示されたTM1のA38での kinkの影響を評価するために,A38V/G46Dの二重置換 を持つMscL変異遺伝子を化学合成し,5'-IMP生産*E.* coliに導入した.細胞当たりの生産速度は,5'-IMPを活 発に生産している培養24時間と47時間のデータを用い て計算した.予想通り,G46Dに加えてA38Vを導入し たMscL遺伝子を有する5'-IMP生産*E.* coliの細胞当た り5'-IMP生産速度は,G46Dを導入したMscL遺伝子の みを有する5'-IMP生産*E.* coliの細胞当たり5'-IMP生産 速度に比べて著しく低下し,野生型遺伝子を導入した株 とほぼ同程度であった(Fig.3D).これらの結果は, G46D以外にA38Vを持つMscLは、少なくとも通常の 培養条件下では野生型と同程度の頻度でしか開口できな いことを示唆している.

さらに、MD シミュレーションによる解析も実施した G46D MscLのモデルをもとにA38V/G46D 二重置換型 MscLをモデル化し、他のMscLモデルの開孔条件と同 じ条件で開孔を試みた.その結果、A38V/G46D 二重変異 体モデルを用いたシミュレーションは、最終点である 200nsまで進むことができず、80ns付近で停止した.ま た、シミュレーションの80nsの間、A38V/G46D MscL は開孔に至る挙動を示さなかった.このことは、上記の 5'-IMP生産培養の結果と整合している.

考 察

我々は、独自開発のユニークな微生物パッチクランプ システムを用いて、Msc が様々な化学構造の低分子化 合物を細胞内から細胞外へと排出することを実証した. また、通常の培養条件下で開孔可能な GOF 変異を導入 した Msc を exporter として MCF に導入することで、 L-Lys や 5'-IMP など、構造の異なるいくつかの重要な標 的化合物の生産速度を向上させることに成功した. MCF の生産率を向上させることに成功したことは、パッ チクランプ解析から示唆されたように、Msc の基質認 識が寛容であることを示している.

MscCG が L-Glu 以外の L-Lys などの低分子化合物を排 出するという結果は、以前の報告、すなわち野生型細胞 に低浸透圧ストレスを与えると、おそらくメカノセンシ ティブ チャネルを介して細胞内の L-Lys が約 25%減少 するという報告(Ruffert *et al.*, 1997)を反映したもの であろう. 本研究で利用した GOF 置換を持つ Msc は,低浸透圧 ストレス条件下でなくても機能していたと考えられる. したがって,GOF 置換は MCF の作製に有用である.す なわち,代謝工学的手法により各標的化合物の生合成が 強化された細胞内に蓄積された各標的化合物は,低浸透 圧ストレス条件下でない通常の培養条件下でも,GOF 置換を導入した Msc を介して排出されると考えられる.

本研究の結果は, exporter engineering が MCF を設計 する上で重要かつ有用なツールであることを示してい る. さらに, これまで, 高い特異性が exporter に必要 であるという考えが一般的であったが, このパラダイム が覆された. すなわち, 選択性の低いチャネルが MCF において効果的に exporter として機能することが示さ れた.

G46D 置換型が GOFとなるメカニズムは、25年以上 も分からないままだった.本研究では、MDシミュレー ションを用いた開口挙動解析によって、メカニズム解明 の糸口を掴んだ.すなわち、MscLのTM1における Ala38 での kink が GOFの挙動にとって重要であると考 えられた.さらに、Fig.6の結果から、野生型における Gly46 はその場所での柔軟性があるために、細胞外ルー プを介して Ala38 へ伝わる応力集中を緩和する役割があ る可能性がある.しかしながら、G46D 置換型において は Asp46 での柔軟性が失われた結果として、エネルギー 的に緩和する箇所としての機能を果たすことができない (Fig.6C, 6F).そのため、応力集中が kink として表れ ている可能性がある.ホモ5量体で機能する MscL にお いて、それぞれのサブユニットはお互いに以下の3 か所 でコンタクトを維持している;

- (1)あるサブユニットのGly22-Gly26と近接サブユニットのVal16-Leu19-Ala20
- (2) あるサブユニットにある Lys31 と近接サブユニットの Asp84 の間で発生する salt bridge
- (3) あるサブユニットにある Ile32-Leu36-Ile40 と近接 サブユニットにある Phe78 間にある疎水性相互作用

G46D 置換型の場合, Ala38 付近で発生する kink は TM1と近接 TM2 の間で形成しているコンタクトに影響 を及ぼす可能性があることから,開口時の TM1 の構造 変化に差異が生じると推定される. その結果, Leu19-Val23 間のアミノ酸残基で形成されるゲートが閉 口時に安定して閉じるためのパッキングを維持できず, 野生型よりも開きやすくなった可能性が考えられる.

「結果」のセクションで,開口時の挙動の違いを議論 してきた.G46Dは野生型より開きやすいGOFの挙動 を見せたが,A38VとG46Dの二重置換型においては, Ala38でのkinkが妨げられ,その結果,開口しにくくなっ ている可能性がある.この仮定が正しければ,Ala38付 近での kink が, G46D によって引き起こされる GOF の 挙動にプラスに貢献することが強く示唆される.すなわ ち, Ala38 での kink は MscL の開口過程を制御に関与し ていると考えられる. Ala38 での kink については,内側 膜貫通へリックスの傾斜に影響を与え,そのことがゲー トの開口速度に影響を与えると思われる.この仮説を立 証するためには,その kink が張力伝達の通り道も含め た機械的特性をどう変えるかについて明らかにする必要 がある.

我々の研究結果は, MD シミュレーションはメカノセ ンシティブ チャネルの開口機構の詳細を解明するのに 有効な手段であり, チャネルの機能向上のための設計指 針を示すためのツールとしての高いポテンシャルを有し ていることを示している.

要 約

近年,様々な価値ある化合物を生産する微生物細胞工 場(MCF)の設計に向けた合成生物学の進歩は目覚し いが, exporter engineering においては, 研究の困難さ から未開拓の領域が数多く残されている。我々は、工業 的L-Glu 生産 MCF において L-Glu の排出を担うメカノ センシティブ チャネル (Msc) に注目した. 本研究で は Msc の特性を明らかにすると共に、その解明された 特性を活用して, Msc の多用途 exporter としての可能 性を探った.L-Glu 生産 MCF において L-Glu の排出を担 う膜輸送タンパク質である MscCG (NCgl1221) が, L-Lvs やフェニルアラニン類縁化合物などの様々な低分 子化合物を排出できることを直接的に示した. Gain-offunction (GOF) 変異を有する Msc 遺伝子を MCF に導 入することにより、工業的価値がある化合物である L-Lys, イノシン 5'-ーリン酸 (5'-IMP) の細胞当たりの 生産速度を高めることに成功した. これらの結果は、以 前から示唆されていたように, MCFの設計における exporter engineeringの重要性を示すものである. Exporter には高い特異性が重要であるという従来の考 えとは対照的に、我々の結果は、選択性の低いチャネル でも MCF において効果的に exporter として機能するこ とを示した.

さらに、全原子分子動力学シミュレーションによって 得られた MscL の動的開口挙動に関する知見から、Msc の G46D 置換が GOF をもたらすメカニズムを理解する 糸口を得た.具体的には、G46D 置換によって最初の膜 貫通へリックス(TM1)のA38でkinkが生じる結果、 TM1とTM2間の相互作用が影響を受け、閉口時のゲー トが不安定化することで GOFとなっている可能性が考 えられた.これを検証するために、A38のkinkを妨げる A38V/G46D の二重置換遺伝子を 5'-IMP 生産 MCF に導入したところ、細胞当たり 5'-IMP 生産速度が大幅に減少した.このことは、分子動力学シミュレーションが、Msc 開口メカニズムの複雑さを理解する上で有効なこと、機能向上型 Msc を設計するためのツールとして高い可能性をもつことを示すものである.

Supplementary Figure は https://doi.org/10.6084/m9. figshare.27184695 に格納してある.

Supplementary Figure 1 The gating mechanism of Msc Schematic representation showing a motion of opening of the gate of the channel upon membrane stretch. Red, yellow, orange, and green arrows symbolize the directional sequence: the channel's movement in response to increased membrane tension, the force direction as it is sensed, the transmission of this force to the gate, and finally, the opening direction of the gate, respectively. The channel's opening progresses in the sequence of the red, orange, yellow, and green arrows.

Supplementary Figure 2 Our unique microbial patch-clamp system. (A) Preparation of giant spheroplasts using spheroplast incubation (SI) method. (B) Giant spheroplasts generated using SI method. (C) Vacuole-like structure with inside-out membrane generated in the giant spheroplast. (D) Advantage of vacuole-like structure for investigating exporter activity. (E) Conceptual drawing to demonstrate inside-out membrane orientation of vacuole-like structure by NADH dehydrogenase activity that uses NADH as a substrate, which is not permeable. (F) Measurement of current generated via NADH-dependent proton transport into the inside of vacuole-like structure by NADH dehydrogenase to verify the inside-out orientation of the membrane of vacuole-like structure.

Supplementary Figure 3 Growth of wild-type *E. coli* expressing wild-type MscCG gene or MscCG gene with GOF mutation.

Culture conditions were as described in materials and methods. Values are presented as mean values and standard errors five of independent experiments.

●, empty vector; ■, wild-type MscCG; ◆, MscCG with A111V; ▲, MscCG with W15CSLW.

Supplementary Figure 4 Growth of L-Lys-producing *E. coli* expressing wild-type MscCG gene or MscCG gene with GOF mutation.

Culture conditions were as described in materials and methods. Values are presented as mean values and standard errors five of independent experiments.

●, empty vector; ■, wild-type MscCG; ◆, MscCG with A111V; ▲, MscCG with W15CSLW.

Supplementary Figure 5 Growth of 5'-IMP-producing *E. coli* expressing wild-type MscCG gene or MscCG gene with GOF mutation.

Culture conditions were as described in materials and methods. Values are presented as mean values and standard errors five of independent experiments.

●, empty vector; ■, wild-type MscCG; ◆, MscCG with A111V; ▲, MscCG with W15CSLW.

Sampling times were determined based on detailed preliminary experiments.

Supplementary Figure 6 Growth of 5'-IMP-producing *E. coli* expressing wild-type MscL gene, MscL gene with GOF mutation, or another MscL gene derivative.

Culture conditions were as described in materials and methods. Values are presented as mean values and standard errors five of independent experiments.

●, empty vector; ■, wild-type MscL; ◆, MscL with G46D; ▲, MscL with A38V and G46D.

Sampling times were determined based on detailed preliminary experiments.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- Sawada, Y., Hashimoto, K., Kawasaki, H. & Sokabe M. 2019. Computational study focusing on the response to change of membrane environment in gating of the bacterial mechanosensitive channel MscL. 第57回日本生物物理学会 年会 (9月24-26日, 宮崎)
- Nakayama, Y., Hashimoto, K., Kawasaki, H., & Martinac B. 2019. Corynebacterial "Force-From-Lipids" mechanosensation for glutamate production. 第57回日本生物物理学会年会(9 月24-26日, 宮崎)
- 3) Nakayama, Y., Hashimoto, K., Kawasaki, H. & Martinac B. 2020. Corynebacterial "Force-From-Lipids" mechanosensation for MSG production. 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (February 15–19, San Diego, CA, USA)
- 4) Nakayama, Y., Rohde, P.R., Konishi, T., Kawasaki, H. & Martinac, B. 2022. Liposome reconstitution and electrophysiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channel MscCG. 第60回日 本生物物理学会年会 (9月28-30日, 函館)
- 5) Kawasaki, H., Konishi, T., Sawada, Y., Hashimoto, K., Sokabe, M. & Yabe, I. 2022. Creation of a novel gain-of-function MscL for better inosine 5'-mononucleotide productivity in microbial cell factory. 4th International Symposium on Mechanobilogy (November 6-9, Sydney, Australia)

原著論文 投稿中

その他 (総説・書籍・特許など)

- Nakayama, Y., Hashimoto, K., Sawada, Y., Sokabe, M., Kawasaki, H. & Martinac, B. 2018. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channels: towards unpuzzling "glutamate efflux" for amino acid production. Biophys. Rev. 10: 1359–1369.
- Nakayama. Y., Hashimoto, K., Kawasaki, H. & Martinac, B. 2019. "Force-From-Lipids" mechanosensation in *Corynebacterium glutamicum*. Biophys. Rev. 11: 327–333.
- 3) Kawasaki, H. & Martinac, B. 2020. Mechanosensitive channels

of *Corynebacterium glutamicum* functioning as a exporters of L-glutamate and other valuable metabolites. Curr. Opin. Chem. Biol. **59**: 77–83.

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微生物膜輸送工学寄付 講座の学生ならびに構成員諸氏に感謝の意を表します. また,JSPS 科研費 基盤研究(C)(橋本 賢一 19K05785) の支援にも感謝いたします.

文 献

- Bali, A., Genee, H.J. & Sommer, M.O.A. 2018. Direct evolution of membrane transport using synthetic selections. ACS Synth. Biol. 7: 789–793.
- Bennet, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J. & Rabinowitz J.D. 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. Nat. Chem. Biol. 5: 593–599.
- Cantor, R.S. 1997. The lateral pressure profile in membranes: A physical mechanism of general anesthesia. Biochemistry **36**: 2339–2344.
- Chang, G. Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T. & Rees, D.C. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. Science 282: 2220–2226.
- Cruickshank, C.C., Minchin, R.F., Le Dain, A.C. & Martinac, B. 1997. Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli*. Biophys. J. 4: 1925–1931.
- Darden, T., York, D. & Pedersen, L. 1993. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. **98**: 10089–10092.
- Grubmüller H. 1996. SOLVATE v. 1.0. Theoretical Biophysics Group, Institute for Medical Optics, Ludwig-Maximilians University, Munich
- Gullingsrud, J. & Shulten, K. 2003. Gating of MscL studied by steered molecular dynamics. Biophys. J. 85: 2087–2099.
- Hamill, O.P. & Martinac, B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. Physiol. Rev. 81: 685–740.
- Han, T., Nazarbekov, A., Zou, X. & Lee, S.Y. 2023. Recent advances in systems metabolic engineering. Curr. Opin. Biotechnol. 84: 103004.
- Hashimoto, K., Murata, J., Konishi, T., Yabe, I., Nakamatsu, T. & Kawasaki, H. 2012. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion. Biosci. Biotechnol. Biochem. **76**: 1422–1424.
- Hashimoto, K., Nakamura, K., Kuroda, T., Yabe, I., Nakamatsu, T. & Kawasaki, H. 2010. The protein encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel. Biosci. Biotechnol. Biochem. **74**: 2546–2549.

- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. 1996. Vmd: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. 14: 33–38.
- Jones, C.M., Lozada, N.J.H. & Pfleger, B.F. 2015. Efflux system in bacteria and their metabolic engineering applications. Appl Microbial. Biotechnol. 99: 9381–9393.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T. *et al.* 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596: 583–589.
- Kakehi, M., Usuda, Y., Tabira, Y. & Sugimoto, S. 2007. Complete deficiency of 5'-nucleotidase activity in *Escherichia coli* leads to loss of growth on purine nucleotides but not of their excretion. J. Microbiol. Biotechnol. 13: 96–104.
- Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., *et al.* 1999. NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. J. Comput. Phys. **151**: 283–312.
- Kinose, K., Shinoda, K., Konishi, T., & Kawasaki, H. 2024. Mutational analysis in *Corynebacterium stationis* MFS transporters for improving nucleotide bioproduction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 108:251
- Ko, Y., Kim, j.W., Lee, j.A.; Han, T., Kim, G.B., Park, J.E. & Lee, S.Y. 2020. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production. Chem. Soc. Rev. 49, 4615–4636.
- Kung, C., Martinac, B. & Sukharev, S. 2010. Mechanosensitive channels in microbes. Annu. Rev. Microbiol. 64: 313–329.
- Kuroda, T., Okuda, N., Saito, N., Hiyama, T., Terasaki, Y., Anazawa, H., Hirata A., Mogi, T., Kusaka, I., Tsuchiya, T. & Yabe, I. 1998. Patch clamp studies on ion pumps of cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **273**: 16897–16904.
- Kusakabe, H., Midorikawa, Y., Fujishima, T., Kuninaka, A. & Yoshino, H. 1983. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate Oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. Agric. Biol. Chem. 47:1323–1328.
- Lee, S.Y., Kim, H.U., Chae, T.U., Cho, J.S., Kim, J.W., Shin, J.H., Kim, D.I., Ko, Y., Jang W.D. & Jang, Y. 2019. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. Nat. Catal. 2: 18–33.
- Levina, N., Tötemeyer, S., Stokes, N.R., Louis, P., Jones, M.A. & Booth, I.R. 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: Identification of genes required for MscS activity. EMBO J. 18: 1730–1737.
- López, J.M., Duran, L. & Avalos, J.L. 2022. Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering. Nat. Microbiol. 20: 35–48.
- Lv, X., Xue, H., Qin, L. & Li, C. 2022. Transporter engineering in microbial cell factory boosts biomanufacturing capacity. Biodes. Res. 2022: 9871087.
- MacKerell, A.D., Brooks, B., Brooks, C.L., Nilsson, L., Roux, B. & Won, Y. 1998. Charmm: The energy function and its parameterization. Chichester, UK: John Wiley and Sons, Ltd. 1998.
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. & Wachi, M. 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 4491–4498.
- Nakanishi, K., Kikuchi, Y., Kojima, J., Suzuki, T., Nishimura, Y. & Kojima, H. 2010. Method for producing L-lysine. United

States Patent Application US 2010/0173368.

- Nielsen, J., Tillegreen, C.B. & Petranovic, D. 2022. Innovation trends in industrial biotechnology. Trends Biotechnol. 40: 1160–1172.
- Nomura, T., Cox, C.D., Bavi, N., Sokabe, M. & Martinac, B. 2015. Unidirectional incorporation of a bacterial mechanosensitive channel into liposomal membranes. FASEB J. 29: 4334–4345.
- Nomura, T., Cranfield, C.G., Deplazes, E., Owen, D.M., Macmillan, A., Battle, A.R., Constantine, M., Sokabe, M, & Martinac, B. 2012. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 8770–8775.
- Ou, X., Blount, P., Hoffman, R.J. & Kung, C. 1998. One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11471–11475.
- Reiling, S., Schlenkrich, M. & Brickmann, J. 1996. Force field parameters for carbohydrates. J. Comp. Chem. 17: 450–468.
- Ruffert, S., Lambert, C., Peter, H., Wendisch, V.F., & Krämer, R., 1997. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. Eur. J. Biochem. 247: 572–580.
- Sawada, Y., Murase, M. & Sokabe, M. 2012. The gating mechanism of the bacterial mechanosensitive channel MscL revealed by molecular dynamics simulations: From tension sensing to channel opening. Channels **6**:317–331.
- Sawada, Y. & Sokabe, M. 2015. Molecular dynamics study on protein-water interplay in the mechanogating of the bacterial mechanosensitive channel MscL. Eur. Biophys. J. 44: 531–543.
- Shimaoka, M., Takenaka, Y., Kurahashi, O., Kawasaki, H. & Matsui, H. 2007. Effect of amplification of desensitized *purF* and *prs* on inosine accumulation in *Escherichia coli*. J. Biosci. Bioeng. **103**: 255–261.

- Smart, O.S., Neduvelil, J.G., Wang, X., Wallace, B.A. & Sansom, M.S.P. 1996. Hole: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. J. Mol. Graph. 14: 354–360.
- Sokolova, N., Peng, B. & Haslinger, K. 2023. Design and engineering of artificial biosynthetic pathways –where do we stand and where do we go?. FEBS Lett. **597**: 2897–2907.
- Sukharev, S. 2002. Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. Biophys. J. 83: 290–298.
- Sukharev, S.I., Sigurdson, W.J., Kung, C. & Sachs, F. 1999. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. J. Gen. Physiol. 113: 525–540.
- Volkmer, B. & Heinemann, M. 2011. Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. PLoS One 6: e23126.
- Yoshimura, K., Batiza, A., Schroeder, M., Blount, P. & Kung, C. 1999. Hydrophilicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity. Biophys. J. 77: 1960–1972.
- Yoshimura, K., Nomura, T. & Sokabe, M. 2004. Loss-of-function mutations at the rim of the funnel of mechanosensitive channel MscL. Biophys. J. 86: 2113–2120.
- Yoshimura, K., Usukura, J. & Sokabe, M. 2008. Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel MscL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 4033–4038.
- Wang, Y., Cao, G., Xu, D., Fun, L., Wu, X., Ni, X., Zhao, S., Zheng P., Sun, J. & Ma, Y. 2018. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. Appl. Environ. Microbiol. 84: e02691-17.

Corynebacterium stationisの5'-IMP 排出膜輸送タンパク質遺伝子の同定と その変異解析による排出膜輸送タンパク質高機能化機構の解明

篠田 恵子, 川崎 寿

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 微生物膜輸送工学寄付講座 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Identification of the 5'-IMP exporter gene of *Corynebacterium stationis* and analysis of its mutation to elucidate the mechanism of its improved activity in industrial strains. Keiko Shinoda, Hisashi Kawasaki

Laboratory of Microbial Membrane Transport Engineering Agro-Biotechnology Research Center Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

Product secretion from an engineered cell can be advantageous for microbial cell factories. Extensive work on nucleotide manufacturing, one of the most successful microbial fermentation processes, has enabled *Corynebacterium stationis* to transport nucleotides outside the cell by random mutagenesis; however, the underlying mechanism has not been elucidated, hindering its applications in transporter engineering. Herein, we report the nucleotide-exporting major facilitator superfamily (MFS) transporter from the *C. stationis* genome and its hyperactive mutation at the G64 residue. Structural estimation and molecular dynamics simulations suggested that the activity of this transporter improved via two mechanisms: (1) enhancing interactions between transmembrane helices through the conserved "RxxQG" motif along with substrate binding and (2) trapping substrate-interacting residue for easier release from the cavity. Our results provide novel insights into how MFS transporters change their conformation from inward- to outward-facing states upon substrate binding to facilitate export and can contribute of rational design strategies for improvement of exporters in microbial cell factories.

Key words: exporter engineering, microbial cell factory, MFS transporter, nucleotide transport, *Corynebacterium* stationis

緒 言

微生物細胞工場(MCF)による有用物質生産は価値 ある化合物の持続可能な製造において重要性を増してお り、合成生物学と代謝工学の進歩は、その要求に応える ことに貢献している(Nielsen *et al.*, 2022).しかし、微 生物細胞の代謝経路を最適化しても、標的化合物生産に は不十分な場合がある. 蓄積された標的化合物によって, 上流の酵素が阻害され合成速度を低下させたり,反応平 衡に到達したり,標的化合物が細胞内酵素によって分解 されて収量が制限されたり,細胞毒性を引き起こして力 価を低下させたりする可能性がある.したがって,標的 化合物産物の効率的な排出を確保することは,その生産 にとって重要である (van der Hoek & Borodina, 2016; López *et al.*, 2022; Lv *et al.*, 2022).

このような背景から, exporter engineering は注目を 集めている.特異的膜輸送タンパク質 (Hu *et al.*, 2018; Steiger *et al.*, 2019) に加え,幅広い基質特異性を持つメ カノセンシティブ チャネル (Kawasaki & Martinac, 2020)

E-mail: ukawasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

共同研究者:小西 智之(東京大学大学院農学生命科学研究科). 黄瀬 啓太(東京大学大学院農学生命科学研究科).

や多剤排出トランスポーター(Wang et al., 2013)による 排出効率のさらなる向上が望まれている. Corynebacterium glutamicumでは、メカノセンシティブチャネルをコー ドする MscCG 遺伝子の変異がグルタミン酸の恒常的な 分泌生産を引き起こす(Nakamura et al., 2007). しかし ながら、我々の知る限り、それ以外の場合に実生産レベ ルで活性を増強する変異は今のところ見つかっていない.

強いうま味を持ち、食品添加物として広く販売されて いるイノシン5'-ーリン酸(5'-IMP)は、Corynebacterium stationis(旧名 Corynebacterium ammoniagenes)を用い た発酵プロセスによっても生産されている。ランダム変 異導入により、5'-IMP分泌生産が可能になった(Teshiba & Furuya, 1982; Park et al., 2006).育種された C. stationis 株の5'-IMPを排出する能力は電子伝達系阻害剤によっ て阻害される(Teshiba & Furuya, 1984)ことから、「エ ネルギー生成システム」に依存していると考えられてい る.このことは、5'-IMP 排出にATP またはプロトン駆 動力(PMF)依存性膜輸送タンパク質が関与している 可能性を示唆している.しかし、この表現型に対応する 変異を調べる試みはなされていない.これを調べること は、排出促進による発酵生産向上のための新たな手がか りとなるであろう.

我々は、C. stationisの核酸排出膜輸送タンパク質遺伝 子を探索し、その機能改善をもたらす変異を同定するこ ととした. そこで、商業的発酵のために段階的に育種さ れた 5'-IMP-またはキサントシン 5'- 一リン酸 (5'-XMP)-生産 C. stationis 株を収集し (Park et al., 2006; Kim et al., 2004; Kwag et al., 2008; Park et al., 2009; Jinman et al., 2013), そのゲノムを解析し, 変異履歴を調べた. その 結果.独立に育種された2つの系統で5つのトランス ポーター遺伝子が収束的に変異しており、これら遺伝子 を 5'-IMP の生合成が強化された E. coli で発現させると, 変異遺伝子の1つが5'-IMP生産を顕著に増強する能力 を持つことがわかった. この遺伝子は major facilitator superfamily (MFS) に属する膜輸送タンパク質をコード しており、商業生産菌に見出された2つの変異のうち、 G64E 置換はその活性亢進と相関していた. 分子動力学 シミュレーションの結果, E64 は薬物-H⁺ 輸送体間で保 存されているモチーフBとの相互作用が大きいことが示 唆された.

本成果は、細菌間で保存されている多剤排出膜輸送タ ンパク質のメカニズムに関する知見を提供するととも に、MCFにおける標的化合物の排出能力改善のための 合理的な変異導入の手がかりとなるものである.

実験方法

菌株

C. stationis ATCC6872 は American Type Culture Collection (ATCC) から, KCCM10340 (Kim et al., 2004), KCCM10448 (Kwag et al., 2008), KCCM10530 (Park et al., 2009), KCCM10972 (Jinman et al., 2013), KCCM10610 (Park et al., 2006) は, Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) から購入した. こ れらの菌株をゲノム解析および5'-IMP/5'-XMP生産解 析に用いた (Supplementary Fig.1). プラスミド構築 のための宿主として E. coli K-12 JM109を用いた. E. coli K-12 株 W3110を野生型 (WT) 株として用いた. E. coli I-9ushAaphA/pMWKQ (Kakehi et al. 2007) は味の素 株式会社より分譲して頂いた. Fig.2, 3, 5, および Supplementary Fig.2, 4 に示す解析では、非誘導条件下 で安定な生育を促すために、空のpET-16ベクターを共 形質転換してlaclの発現を高めた.

Supplementary Fig.4に示す実験では、6×Hisタグ融 合ベクターを用いた.このベクターは、合成した6× His-tag フラグメントと、PCR で直鎖化した非タグベク ターを連結した SLiCE 反応で作製した.

mscL 遺伝子の破壊

I-9ushAaphAmscL株は、pMAN997の温度感受性複 製起点を利用した既報の方法で作製した(Matsui *et al.*, 2001). *E. coli* I-9ushAaphAを許容温度である30℃にて pMAN-ΔmscLで形質転換した.相同組換えでプラスミ ドがゲノムに組み込まれた株を、アンピシリン存在下、 非許容温度である42℃培養で選択した.ゲノム上の *mscL*遺伝子座にpMAN-ΔmscLカセットが正しく挿入 された形質転換体を、プライマーセット番号22/23およ び24/25を用いたPCRでスクリーニングした.ヒット 株を再度30℃で培養し、シングルコロニーのクローン がアンピシリン感受性を示すかどうかを試験した.アン ピシリン感受性の株では、二回目の相同組換えが生じた と考えられ、*mscL*遺伝子座が正しく破壊されたかどう かを確認するために、番号22/25のプライマーセットに よるPCRを行い、次いでサンガー法で配列決定を行った.

C. stationis による 5'-IMP/5'-XMP 生産

CM2B プレート (10g/L ポリペプトン, 10g/L 酵母 エキス, 5g/L NaCl, 10µg/L ビオチン, 100mg/L アデ ニン, 100mg/L グアニン) 上で増殖した株を, 20mL の seed 培地 (50g/L グルコース, 5g/L ポリペプトン, 10g/L 酵母エキス, 2.5g/L NaCl, 100mg/L アデニン, 100 mg/L グアニン)に接種した. 31.5 \mathbb{C} で24 時間培養 後, seed 培養液 3 mL を本培養培地 (80 g/L グルコース, 1 g/L グルタミン酸ナトリウム, 10 g/L NH₄Cl, 25 g/L MgSO₄-7H₂O, 0.1 g/L CaCl₂, 37 mg/L FeSO₄·7H₂O, 32 mg/L MnSO₄·7H₂O, 36 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 8 mg/L CuSO₄·5H₂O, 23 mg/LL・システイン, 24 mg/L アラニン, 8 mg/L ニコチン酸, 45 µg/L ビオチン, 5 mg/L チアミ ン塩酸塩, 30 mg/L アデニン, 19 mL/L リン酸 [85%]) 27 mL に接種した. 培養は 31.5 \mathbb{C} で行い, 経時的にサン プリングした.

E. coliによる 5'-IMP 生産

LB プレートで増殖した細胞を、40g/L グルコース、 1g/L MgSO₄·7H₂O、16g/L (NH₄)₂SO₄、1g/L KH₂PO₄、 0.01g/L FeSO₄·7H₂O、0.01g/L MnSO₄·7H₂O、8g/L 酵 母エキス、30g/L CaCO₃を添加した培地で、特に断り のない限り、37℃(Fig.1)または30℃(Fig.2,3,5, Supplementary Fig.2,4)で培養し、経時的にサンプリ ングした、生育は、OD₆₀₀で評価した、すべての実験は 3 回以上の生物学的複製で行った、

プリンヌクレオチド類およびタンパク質の定量

プリンヌクレオチド類は、GS-220HQカラム(Shodex、 東京、日本)を用いて $0.2 \text{ M} \text{ NaH}_2 \text{PO}_4$ (pH 4.0) を移動 相とする HPLC で分離し、254 nm での吸光度によって 検出・定量した.タンパク質の定量は、Bio-Rad Protein Assay Kitを用い、製造元のプロトコールに従って Bradford 法で行った (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

代謝動態の計算

細胞内ヌクレオチドおよび細胞外ヌクレオチドの測定 のために、サンプリングした培養液を凍結融解し、遠心 分離前に断続的にボルテックスしながら85℃で5分間 加熱した.熱抽出後、細胞内ヌクレオチドおよび細胞外 ヌクレオチドを含む抽出物を、上述のように測定した. 細胞増殖が停止し、5′-IMP、イノシン(Ino)、ヒポキ サンチン(Hyp)含量が直線的に増加した16時間と24 時間のデータを用いて、速度論パラメータv₁、v₂、およ び、v₃を以下のように計算した.

$v_1 = \Delta([IMP]_{in+out} + [Ino]_{in+out} + [Hyp]_{in+out}) / \Delta t / average$ (OD₆₀₀)

- $v_2 = \Delta [IMP]_{out} / \Delta t / average (OD_{600})$
- $v_3 = \Delta([Ino]_{in+out} + [Hyp]_{in+out}) / \Delta t / average (OD_{600})$
- タンパク質抽出とウェスタンブロッティング

上記のように24時間培養した菌体を回収し、OD600が

10 になるようにバッファー (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 3mM MgSO₄, 10% w/v glycerol, pH 8) に再懸濁 した. タンパク質を超音波破砕で抽出し、Pierce[™] BCA Protein Assav Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて濃度を測定した. 10µgのlysateを, 還元剤(ナカライテスク,京都,日本)を含むサンプ ル buffer を 用 い て, SuperSep[™]Ace 10-20% gradient polvacrylamide gels (富士フィルム和光純薬,大阪,日本) にロードした. SDS-PAGE後, iBlot®2 PVDF kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて、メーカーのプロトコール に従ってタンパク質をメンブレンに転写した. メンブレ ンをブロッキング液(ナカライテスク)に4℃で一晩浸 し,洗浄した後,His-tag抗体 (Cat# MAB050, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を1:1000 希釈で添加 し、室温で3時間インキュベートした.洗浄後,HRP 融合二次抗体 (Cat# 8738, CellSignaling technology, Danvers, MA, USA)と室温で3時間反応させた.洗浄後, バンドをImmobilon® Forte western HRP substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) で可視化した.

全ゲノム配列決定

C. stationis ATCC6872, KCCM10340, KCCM10448, KCCM10530, KCCM10972, KCCM10610 株のゲノム DNA を Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)を用いて単離した. ATCC6872 (野 生型)のゲノム配列解析は Macrogen Co., Ltd. (ソウル, 韓国)において, PacBio プラットフォーム (Menlo Park, CA, USA)を用いた SMRT シーケンスおよび Illumina シーケンス (San Diego, CA, USA)を用いて行った. PacBio リードは HGAP (v3.0)を用いてアセンブルし, ドラフトアセンブルのエラーは Pilon (v1.21)を用いて イルミナリード (1000×depth 以上, 150 bpペアエンド) で修正した. 遺伝子アノテーションは Prokka パイプラ イン (v1.12b)を用いて行った.

KCCM10340, KCCM10448, KCCM10530, KCCM10972, および KCCM10610 のゲノム DNAを用い, 150bpペア エンドリードでイルミナプラットフォーム上でライブラ リー調製を行った. 1000 倍を超えるリード depth を取 得し, ATCC6872 ゲノムをリファレンスとして一塩基多 型(SNP)をコールした. SNPのマッピング, バリアン トコール, アノテーションには, それぞれ BWA(v0.7.17), SAMTools, SnpEff (v4.3t)を用いた. SNPのうち, 非同義変異はフィルタリングされ, 各株の SNPの包含 関係は Rパッケージ Venn Diagram (v1.7.3)を用いて カウントされた. 分子動力学(MD)シミュレーション

 $MD \rightarrow \exists \perp \nu - \neg \exists \nu d$, GROMACS ($\neg i - \neg i \exists \nu$ 2020.6)を用いて行った (Abraham et al., 2015). タンパ ク質, 脂質分子, およびイオンの力場には全原子 Fuii 力 場 (Kamiya et al., 2020; Fujitani et al., 2009) を,水の力 場にはTIP3Pモデルを用いた(Jorgensen et al., 1986). IMPの部分電荷は RESP 法で求め、その他の力場パラ メータはFuji力場のものを使用した. すべてのシステ ムは150 mM NaCl水溶液で溶媒和した.温度はNosé-Hoover 法(Nosé, 1984; Hoover, 1985)(結合定数1.0) を用いて 298 Kに、 圧力は Berendsen 法 (Berendsen et al., 1984) または Parrinello-Rahman 法(Parrinello & Rahman, 1981)を用いて1気圧に制御した(結合定数2.0 ps). 静電相互作用は, Particle Mesh Ewald (PME)法 (Darden et al., 1993) を用いて計算した. 実空間のカッ トオフ距離は1.0 nm に設定した. Lennard-Jones 相互作 用には Lennard-Jones Particle Mesh Ewald (LJ-PME) 法 (Wennberg et al., 2015)を用い、逆空間でのコンビネー ション・ルールに geometric approximations を適用した. Neighbor list には Verlet カットオフスキームを使用した. すべての結合長は LINCS 法 (lincs order 6) (Hess, 2008) によって拘束され、水素原子から結合角の自由度を取り 除くために virtual site モデルを適用した. Cs0286 および その置換型の初期座標は、AlphaFold2 (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022) を使用して作成し、LAMBADAプ ログラム (Schmidt & Kandt, 2012) を用いて E. coli モ デル膜に埋め込んだ. この E. coli モデル膜は, 6種類の 脂質分子 (PMPE[1-palmitoyl-2-cis-9,10-methylenehexadecanoic-acid-sn-glycero-3-phosphoethanolamine]: 652 分子, PMPG [1-palmitoyl-2-cis-9,10-methylenehexadecanoic-acid-sn-glycero-3-phosphoglycerol]:181 分子, PVPE[1-palmitoyl-2-vacenoyl-sn-glycero-3phosphatidylethanolamine]:40分子, HYPE[1palmitoleoyl-2-cis-11,12-methylene-hexadecanoic-acid-snglycero-3-phosphoethanolamine]: 68分子, PMHP[1palmitoyl-2-cis-11,12-methylene-hexadecanoic-acid-snglycero-3-phosphoethanolamine]:101 分子,および,カ ルジオリピン[1-(1-palmitoyl-2-cis-9,10-methylenehexadecanoic-acid-sn-3-phosphatidyl)-3-(1-palmitoyl-2oleoyl-sn-3-phosphatidyl)-sn-glycerol]:41分子)から構 成された. タンパク質から 0.12 nm 以内に存在する脂質 は取り除いた. IMPを含む系では、IMPの初期位置は Discovery Studio 2020の CDOCKER モジュールを使用 してタンパク質内の最大の空洞に配置した. 設定された 位置は、MdfAとクロラムフェニコール(Cm)(PDB: 4ZOW, Heng et al., 2015)の共結晶構造のCmの位置に 類似していた. 系のエネルギーは、最急降下法と共役勾

配法を交互に使用して最小化され、その後、タンパク質 の重原子にのみ位置制約をかけた状態で、半等方的な Berendsen 圧力制御法を用いて等温等圧アンサンブルの MD シミュレーションが 30 ns. タイムステップ 2 fs で 行われた. その後、制約のないシミュレーションがタイ ムステップ2 fs で 20 ns, その後タイムステップ4 fs で 10 ns 行った. その最終構造を初期構造として. タイム ステップ4 fs で半等方的な Parrinello-Rahman 圧力制御 法を用いて、298 Kで Maxwell-Boltzmann 分布に従った 異なる初期速度を持つ独立な MD シミュレーションを 行った. IMPを含まない系に対しては3本の100 nsの MDシミュレーションが、IMPを含む系に対しては10 本の340 nsのMDシミュレーションを行った.相互作 用エネルギーは、GROMACSのgmx エネルギーツール を使用して、 トラジェクトリの最後の 20 ns 分 (IMP な し)または100 ns分(IMPあり)を用いて計算した.

統計解析

統計解析はR(v4.2.0) とそのパッケージ multcomp
(v1.4)を用いて行った. Fig.1cのデータについては、
Dunnettの検定を行った. VCを対照とした. Fig.2a, 3d,
6c および Supplementary Fig.2 に示したデータについて、
Tukeyの有意差検定を行った. データは Microsoft Excelを用いて可視化した.

結 果

C. stationisの核酸排出膜輸送タンパク質の探索

まず,核酸生産 C. stationis のゲノムから, ランダム 変異導入で導入された変異により核酸排出に寄与する 膜輸送タンパク質を探索した.5'-IMP生産株1株 (KCCM10610),および段階的に育種された5'-XMP生 産株4株(KCCM10340, KCCM10448, KCCM10530, および, KCCM10972)を選択し, 変異履歴を追跡で きるようにした (Supplementary Fig. 1a). 野生型株と 3株を検証のために培養したところ, 5'-IMP 蓄積量に おいては、KCCM10610株は野生型株よりも高く (Supplementary Fig. 1b), 5'-XMP 蓄積量においては, KCCM10972株, KCCM10340株, 野生型株の順で高かっ た (Supplementary Fig.1c). このことから育種による 改良が示された. KCCM10340株は, 最も早く育種され た5'-XMP発酵生産株であり、顕著な5'-XMP排出能力 を有していることが注目される. 我々は、 ヌクレオチド 排出の表現型は初期の育種段階で独立して獲得されたと 仮定した.

この表現型の原因遺伝子を明らかにするため,野生型 株のゲノム解析と生産株の変異点解析を行った.新たに 決定した野生型株 C. stationis ATCC6872のゲノム配列 は、Liu et al. (2016)が最近報告した同株のゲノムと高 い類似性を示した(Supplementary Table 1). 5'-IMP生 産株と5'-XMP生産株のゲノム中のSNPを,新たにアセ ンブルしたゲノムを用いてコールした(Supplementary Table 2).非同義変異に注目し、どの系統がSNPを共有 しているかに基づいて、変異イベントが発生した育種段 階を推定した(Fig. 1a). 5'-XMP生産株で非同義変異が 共有された 219遺伝子のうち、60遺伝子は5'-IMP生産 株KCCM10610でも変異していた.これらの遺伝子のう ち5つは膜輸送タンパク質をコードしていた(Fig. 1b, Supplementary Table3). これらの膜輸送タンパク質の変 異は、5'-IMP 排出を改善する可能性がある. そこで,野生 型 *C. stationis* ATCC6872, 5'-IMP 産生菌 KCCM10610, および 5'-XMP 産生菌 KCCM10340 から, *cs0286*, *cs0510*, *cs0916*, *cs0966*, および *cs2429* 膜輸送タンパ ク質遺伝子を取得した.

E. coli I-9ushAaphA/pMWKQ株は, 11 遺伝子欠失変 異株(E. coli I-9ushAaphA株: ΔpurF, ΔpurA, ΔdeoD, ΔpurR, Δadd, Δedd, ΔyicP. Δpgi, ΔxapA, ΔushA, ΔaphA) を宿主として, フィードバック阻害を受ける鍵酵素 PurF の脱感作変異体(K326Q)を発現するプラスミドを保



- Figure 1
 Identification of nucleotide transporters and their mutation for functional improvement from the *C. stationis* genome
 (a) Mutational history of analyzed strains. Tree topology was constructed manually based on the patent information.

 The numbers on each branch indicate the number of nonsynonymous-mutational events on the genome in each breeding step.
 - (b) Venn diagram of the designated gene sets: 219 genes with shared nonsynonymous mutations among 5'-XMP producers (KCCM10340, 10448, 10530, and 10972) and 520 genes with nonsynonymous mutations in the 5'-IMP producer KCCM10610.
 - (c) 5'-IMP production assay of transporter-overexpressing strains. The results for the wild-type (WT), IMP-producing strain-type mutants, and XMP-producing strain-type mutants are shown in this order, with the captions indicating the harbored mutations. The means of three replicates are shown as bars. Error bars represent the standard error of the mean. Circles represent the values of each replicate. *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vector control as analyzed using Dunnett's test.

有する.本株は高い5'-IMP合成能力を持つが、十分な 5'-IMP 排出能力がない (Matsui et al., 2001; Shimaoka et al., 2005; Shimaoka et al., 2006; Shimaoka et al., 2007; Kakehi et al., 2007). したがって、細胞外 5'-IMP レベ ルは、膜を介した5'-IMPの排出を示すと考えられる. 5'-IMPの漏出を最小限に抑えるため、5'-IMPを排出す るのに十分な孔径を持つL型メカノセンシティブ チャ ンネルをコードする遺伝子である mscLを破壊した I-9ushAaphAmscL株を作製した. 候補となる膜輸送タ ンパク質遺伝子を E. coli I-9ushAaphAmscL/pMWKQ で 発現させ、5'-IMPを排出できるかどうかを調べた (Fig. 1c). 対照となる空ベクター保持株と比較して, 野生型 cs0286 を保有するプラスミドの存在下では,48 時間後の培地中の5'-IMP 蓄積量が有意に高く(p<0.05), 排出活性が示唆された.5'-IMP生産株のcs0286, cs0916, cs0966, および, 5'-XMP 生産株の cs0966 の変 異型は、これらの遺伝子の野生型よりも高い5'-IMP 蓄 積を示した. これらの結果は、5'-IMP 排出は複数の膜 輸送タンパク質遺伝子の変異によって媒介されることを 示唆している. 試験した遺伝子の中では, cs0286 とその 5'-IMP 生産菌変異型 cs0286 V2L G64E が有意な効果を示 した. このことは、安定した生育を確保するために、培 養を30℃で行うと共に、非誘導条件下での発現漏れを抑 えるために lacl を過剰発現させた条件下での実験によっ て、より正確に確認された(Supplementary Fig. 2). 我々 は、C. stationis 株 KCCM10610 における 5'-IMP 生産に 特に重要な寄与をしていると思われる cs0286 とその変 異型の影響について、より詳細な解析を行った。

Cs0286 は 5'-IMP を排出する MFS に属する膜輸送タン パク質である

cs0286 遺伝子は、549 アミノ酸からなる 14 の膜貫 通へリックスを有するタンパク質をコードしている (Supplementary Fig. 3a). Cs0286 は, *E. coli* のホモロ グとの系統関係から、DHA2 (drug: H⁺ antiporter 2) タイプの MFS に分類された (Supplementary Fig. 3c). この MFS は、PMF を用いた H⁺ の取り込みと共役して 5'-IMP を排出している可能性が高く、電子伝達系が 5' -IMP の排出に重要な役割を果たしているという以前の 研究結果と整合している (Teshiba & Furuya, 1984).

5'-IMP生産株由来のcs0286遺伝子は2ケ所(V2L, G64E)にアミノ酸置換を伴う変異を有していた. どち らの変異に効果があるのか,あるいは,両方の変異に効 果があるのかを明らかにするために,単独変異遺伝子を 発現させ,培地中への5'-IMPの蓄積量を測定した. そ の結果,V2L変異遺伝子発現株は野生型遺伝子発現株と 同等の,G64E変異遺伝子発現株は2重変異遺伝子発現 株と同等の培地中の5'-IMP 蓄積量であることがわかっ た (Fig. 2a). 尚, G64E 変異はタンパク質の発現量に は影響しなかった (Supplementary Fig. 4). これらの 結果から、G64E 置換はCs0286 タンパク質の膜輸送タ ンパク質活性を増強することが示唆された. 我々は, 時系列サンプルの細胞内および細胞外の5'-IMPとその 分解物レベルを測定した (Supplementary Fig. 5b-d). 細胞内 5'-IMP は速やかにイノシン(Ino)に分解され、 次いでヒポキサンチン(Hvp) に分解される. また. InoとHypの両者とも膜を容易に透過する.従って、 ペリプラズムの5-ヌクレオチダーゼ活性を持たない I-9ushAaphA/pMWKQ株(Kakehi et al., 2007)において、 5'-IMPの細胞外蓄積速度は排出速度(v₂)に等しい. Supplementary Fig.5a に示すこのモデルから、全プリン 合成速度 (v_1) と5'-IMP分解速度 (v_3) を計算した. その 結果、cs0286の発現はヌクレオチド生合成速度を変化 させないが、5'-IMPの排出を促進し、そのG64E 置換は その効果を増強することがわかった(Supplementary Fig. 5e). 膜輸送タンパク質非発現株における細胞外5′ -IMPの存在は、溶菌によって説明できると考えられる. 膜輸送タンパク質非発現の対照株では、細胞外5'-IMP レベルは培養上清へのタンパク質の蓄積とともに増加し たことから、これは定常期における溶菌に起因すると考 えられた.野生型 cs0286 やその変異体を発現させると, 培養液中にタンパク質が蓄積することなく、5'-IMP産 生が促進された (Fig. 2b-d). これは、おそらく膜輸送 タンパク質が過剰に生産された5'-IMPを排出して溶菌 を防ぎ、生産の増加につながることを示唆している.

G64E 置換は未知のメカニズムによって Cs0286 を介し た 5'-IMP 排出を促進する

G64E 置換が膜輸送タンパク質を高活性化するメカニ ズムを調べる目的で, AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022) を用いてCs0286 タンパク質とその 置換型の構造を予測した (Fig. 3a).

野生型タンパク質と変異型タンパク質の予測された構 造は、実質的な違いを示さなかった(RMSDで5.4Å). こ れらの全体構造は、MFS 膜輸送タンパク質の解かれた構 造(Brawley *et al*, 2022; Kumar *et al*, 2021; Wisedchaisriv *et al*, 2014; Supplementary Fig. 6)と重ね合わせること ができた. 第一膜貫通へリックス(TM1)の残基 64 は、 基質結合 cavity の外側に面し、どの基質分子とも相互作 用しそうにないと予測された(Fig. 3b)ことから、こ の置換は基質との親和性を直接変化させず、他のヘリッ クス上のアミノ酸残基と相互作用することで高活性化に 関与することが示唆された.

次に、予測された構造を初期構造として、5'-IMPを



Figure 2 G64E mutation is responsible for enhanced inosine monophosphate (IMP) secretion from the transporter

- (a) 5'-IMP production assay of the strains overexpressing *cs0286* and its mutants. Bars show the mean of three independent experiments, and individual data are shown as circles. Error bars represent the standard error of the mean. Different letters indicate statistically significant differences as analyzed using Tukey's honest significant difference test (p < 0.01).
- (b-d) Chronological changes in IMP-producing cultures. The 5'-IMP concentration in the media (b), bacterial cell growth (c), and protein enrichment in the culture (d) are shown. Each line indicates the result of three independent experiments, and the means \pm standard errors are shown in bars.



- Figure 3 Glutamate at position 64 strengthens the interaction of TM1 with TM4 and TM6, affecting Cs0286 activity
 - (a) AlphaFold2-estimated structure of the Cs0286 V2L G64E mutant.
 - (b) Magnified image of the E64 residue. The model is colored using the predicted local distance difference test (pLDDT) value, showing the confidence level of the conformation.
 - (c) 5'-IMP production assay of strains overexpressing *cs0286* wild type (WT) and its mutants. VC represents the vector control. The bars represent the means \pm standard errors of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant differences as analyzed using Tukey's honest significant difference test (p<0.01).
 - (d) Interaction energies of G64 or E64 with residues in other helices. The calculated interaction energies between G64 or E64 and residues on other helices within a 0.8nm distance of G64 or E64 were averaged over 3 (without inosine monophosphate (5'-IMP)) or 10 (with 5'-IMP) independent trajectories for the last 20 or 100 ns. The average values are indicated by bars. Error bars represent standard error of means. The circles represent the average values for each trajectory. Different letters in each group indicate statistically significant differences as analyzed using Tukey's honest significant difference test (p < 0.01). N.S.; not significant.
 - (e) The calculated interaction energies between TM1 and other helices in the N lobe of Cs0286 were averaged over 3 (without 5'-IMP) or 10 (with 5'-IMP) independent trajectories for the last 20 or 100 ns. The average values are indicated by bars with the standard errors. The circles represent the average values for each trajectory. Different letters in each group indicate statistically significant differences as analyzed using Tukey's honest significant difference test (p<0.01). N.S.; not significant.

含む Cs0286 と含まない Cs0286 の全原子 MD シミュレー ションを行った. 膜におけるタンパク質の挙動を正確に シミュレートするために,高精度な FUJI 力場 (Fujitani *et al.*, 2009)を用いた. G/E64 と異なるヘリックス上の 他の残基との相互作用エネルギーを計算した (Fig. 3d). 野生型 Cs0286 では,TM1 の G64 は主に TM4 の R143 と相互作用していたが,G64E 型 Cs0286 では,E64 は TM4 の R143 と Q146,TM6 の N208 と相互作用していた. G64E 型では,5'-IMP 存在下で R143 と E64 残基間の相 互作用が増加した.これらの結果から,R143,Q146, N208 残基が Cs0286 G64E 置換型の活性亢進に寄与して いると考えられた.

R143 残基と Q146 残基は、いくつかの MFS 膜輸送タ ンパク質の間で「RxxQG | モチーフ (モチーフB) と して保存されている (Supplementary Fig. 3b). E. coli MdfAのような MFS 薬物:H⁺アンチポーターの構造か ら、モチーフBは膜輸送タンパク質のPMF依存的活性 に関与していると考えられている(Heng et al., 2015; Zhang et al., 2015). 塩基性アルギニンを含むモチーフ Bの正の静電場は、近傍の酸性アミノ酸残基の脱プロト ン化を促進し、内側に開いたコンフォメーションへの移 行に寄与すると推測されている (Heng et al., 2015). し かし、Cs0286は、MdfAなどの他のPMF依存性膜輸送 タンパク質と異なり、モチーフB近傍に酸性アミノ酸残 基を欠いているため、この説明をCs0286に適用すること はできない. Cs0286 活性に対するこれらの残基の寄与を 調べるために, R143A, Q146A, N208A に置換した置換 型を構築した(Fig. 3c). すべての置換型が野生型タン パク質と同レベルの発現を示したが(Supplementary Fig. 4), 5'-IMPの蓄積量は減少した(Fig. 3c). このこ とは、近傍の酸性アミノ酸残基の有無にかかわらず、こ れらの残基がCs0286の活性に必要であることを示唆し ている.

ヘリックス-ヘリックス相互作用は Cs0286 活性に重要で ある

これらの残基の寄与をよりよく理解するために、シ ミュレーションでTM1とN-bundleの他のヘリックス (すなわちTM2-TM6)との間の相互作用エネルギーを 計算した.野生型では、TM1はTM4、TM5、TM6と 顕著な相互作用が認められた(Fig. 3e).TM1とTM4 の相互作用は、G64主鎖とR143残基に大きく依存して いた(Supplementary Fig. 7a).R143残基をAlaに置換 した遺伝子を発現させた株において、5'-IMP 蓄積量は 空ベクター保持株と同程度まで低下したことから、この ヘリックス-ヘリックス相互作用は排出活性に必要であ ると考えられる.G64E 置換はTM1とTM4の相互作用 を大きく増強した(Fig. 3e) ことは, TM1-TM4 相互作 用とCs0286の活性との関係を示すと考えられる. G64E 型では, E64と R143 に加えて, Q65と Q146 がこの TM1とTM4の相互作用に寄与していた(Supplementary Fig. 7b). G64E 置換により, Q146A 置換型では5'-IMP 生産の減少が回復したが, R143A 置換型や N208A 置換 型では回復しなかったことから(Fig. 3c), これらの残 基とのヘリックス相互作用が, 置換型および野生型 Cs0286の剛性において支配的な役割を果たしていると 考えられる.

5'-IMP 存在下では、E64-R143の相互作用は G64-R143 の相互作用に比べて強化され、TM1-TM4 相互作用が増 加した(Fig. 3d, e). TM1とTM6の相互作用は複数の シミュレーション実行で変動したが、5'-IMP 存在下で は、この相互作用は、E64と N208の相互作用の寄与に より、野生型よりも G64E 置換型の方が強かった(Fig. 3d, e). したがって、5'-IMP の結合は N-bundle のコンフォ メーションを安定化させると考えられる.

5'-IMP 相互作用残基に対する G64E の影響

野生型 Cs0286 と 5'-IMP を用いたシミュレーション では、5'-IMPは野生型 Cs0286 のいくつかの残基と相 互作用した. 特に, G/E64の隣に位置するQ65は、5′ -IMPと比較的強い相互作用があることが示唆された (Supplementary Fig. 8). 340 nsec のシミュレーション を10回行ったところ、5'-IMPが野生型Cs0286の部位 からペリプラスムに移動したのは1回だけであった.対 照的に、G64E 置換型 Cs0286 と 5'-IMP を用いたシミュ レーションでは、5'-IMP はより容易に移動した (Fig. 4a, b. Supplementary Fig. 9). 5'-IMP が遊離する瞬間, 5' -IMP が遊離したほとんどのシミュレーションにおいて、 E64 残基は 5'-IMPと相互作用していた Q65 残基を引き 寄せることによって、5'-IMPの遊離をサポートしてい るように見えた (Fig. 4c). この発見は、コンフォメー ション変化のためのTM1-TM4 およびTM1-TM6 相互作 用の強化に加えて、5'-IMPと相互作用するQ65残基を E64 が捕捉することも, G64E 置換型 Cs0286 の活性亢 進に寄与している可能性を示唆している.

E. coli による 5'-IMP 生産に対する Q65 残基の寄与を 調べた. Q65A 置換および G64E/Q65A 置換は, Cs0286 の発現に影響しなかった (Supplementary Fig. 4).
Q65A 置換および G64E/Q65A 二重置換遺伝子を発現す る株の 5'-IMP 生産量において, Q65A による有意な違い は見られなかった (Fig. 5a). G64E 置換型を発現する E. coli は, 野生型 Cs0286 発現株および Q65A 置換型発現 株よりも生育が悪かったため (Fig. 5b), Q65 残基の置 換が細胞あたりの 5'-IMP 生産速度に影響するかを評価



- Figure 4 Inosine 5'-monophosphate (5'-IMP) easily moves in the extracellular direction as shown by the molecular dynamic simulation of the Cs0286 mutant
 - (a,b) Time evolution of the root mean square deviations (RMSDs) of IMP during the simulation, showing the distance migrated from their initial positions of IMP for the wild type (WT; a) and mutant (b). The RMSDs were calculated from trajectories fitted to the backbone of protein structure at t=0.
 - (c) Snapshots of the Q65-5'-IMP interacting state (left) and non-interacting state (right). See Movie S1.





Inosine 5'-monophosphate (5'-IMP) production assay of overexpressing strains of *cs0286* wild type (WT) and its mutants. 5'-IMP titer (a), bacterial growth measured at OD_{600} (b), and productivity per cell (c) are shown. VC represents vector control. The bars represent the means \pm standard errors of four independent experiments. Different letters in each panel indicate statistically significant differences as analyzed using Tukey's honest significant difference test (p < 0.01). N.S.; not significant.

した. G64E 置換型の発現による 5'-IMP 生産速度の増加 は、Q65 残基のアラニン置換によって部分的に抑制され た(Fig. 5c). これらの結果は、Cs0286 の G64E 置換に よる活性化亢進のメカニズムにQ65 残基が関与してい るという仮説を支持するものである.

考 察

本研究では、C. stationis の 5'-IMP 排出膜輸送タンパ ク質遺伝子として、ゲノム中に MFS 膜輸送タンパク 質をコードする cs0286 を同定した.5'-IMP 生産株 KCCM10610 は、Cs0286 の高活性置換 G64E を有してい る.G64E 置換が Cs0286 の活性に及ぼす影響は、5'-IMP の結合とともに TM1-TM4 および TM1-TM6 の相互作用 が強化されることと、5'-IMP の放出を容易にするため に Q65 残基が捕捉されることの2つで説明できると考 えられる.

MFS 膜輸送タンパク質は、構造的に類似した2つの bundle (N-bundle と C-bundle)を持ち、基質分子を輸 送する際、これら2つの硬い bundle は、中央の基質結 合部位を中心に、内向きコンフォメーションから外向き コンフォメーションへ、あるいはその逆へと対称的に再 配列すると考えられている(Quistgaard *et al.*, 2016; Drew *et al.*, 2021).各bundleの残基間の相互作用が、 bundle (束)としての各へリックスの動きを支えている と考えられる.G64E変異によってこれらの相互作用が 増強された結果、bundle として動きやすくなり、5' -IMPの排出量が増加したと考察している(Fig.6).

我々が用いた予測構造は、おそらく、輸送過程のコン フォメーション変化において膜の両側とも閉じた状態で ある occluded コンフォメーションであろう.糖の取り 込みに関与するH⁺シンポーターであるMFS 膜輸送タ ンパク質への糖の結合は、occluded コンフォメーショ ンを安定化させることが提唱されている.したがって、 糖の結合と解離が膜輸送タンパク質のコンフォメーショ ン変化の根底にある駆動力と考えられている(Madej et al., 2014).コンフォメーション変化のシミュレーショ ンはできなかったが、G64E 置換型への5⁻IMP 結合に より、N-bundle のヘリックス間の相互作用も強くなっ た.基質結合による中間状態の安定化も、この置換型の 活性上昇に寄与している可能性がある.

留意すべきは、今回の結果は推定された構造に基づい ており、シミュレーションで実際のコンフォメーション 変化を観察したわけではないということである.した がって、膜貫通へリックス間の相互作用が強化されたこ とが、輸送中の立体構造変化にどのように影響している のか、またモチーフB以外のどの残基が関与している のかについては、まだ不明な点が残っている.これらの 疑問を解決するには、より長時間のMDシミュレーショ ンや、中間状態に焦点を当てた構造解析が必要である. これらの疑問に答えることで、微生物細胞工場の他の基 質の膜輸送タンパク質を改変し、目的産物の排出を促進 することが可能になるかもしれない.

さらに,我々はC. stationis におけるこの膜輸送タン パク質の生理的役割については理解が及んでいない. Kwon et al. (2021)は最近, C. stationis CJI0323株にお いて,この膜輸送タンパク質(文献ではImpE2と命名) をノックアウトすると,5'-IMP 蓄積量が減少すること を報告した.さらに,Cs0286のV2残基とG64残基の 変異は,上流の転写因子Cs0287(文献ではImpE1と命名)



Figure 6 Proposed mechanism of 5'-IMP release from Cs0286 and its hyperactive mutant Periplasmic views of the wild-type (a) and mutant (b) Cs0286 transporters are shown. Dark red lines indicate the interacting residues. The dotted line in panel b indicates that the interaction between 5'-IMP and Q65 is weaker than that in panel A due to the interaction with the E64 residue in the mutant.

の変異とともに、この5'-IMP生産株における5'-IMP排 出に必要であると報告している. V2残基が膜輸送タン パク質機能に何らかの役割を果たす可能性が低いとすれ ば、転写開始部位と上流転写因子周辺の変異は、cs0286 の発現制御を失わせる可能性がある. C. stationis は環境 変化に応じて遺伝子発現を制御している可能性がある.

本研究では5'-IMP生産を指標としたが、Cs0286の本 来の基質は未知のままである. C. stationisは、尿素から のアンモニア産生を指標に乳幼児の腸管から分離された (Cooke & Keith, 1927). 動物の腸内細菌の増殖は、腸 内細菌叢の他のメンバーからのビタミンや酵素の補因子 に依存している (Das et al., 2019; Sharma et al., 2019; Soto-Martin et al., 2020). 宿主動物もまた、この相互給 餌に依存している (LeBlanc et al., 2013). Cs0286 は、 腸内環境において類似のヌクレオチドやビタミンの交換 を促進する可能性が考えられる. C. stationis における Cs0286の基質特異性と発現制御を解明することは、マ イクロバイオームと宿主の代謝的協力関係に光を当てる こと、このような腸内環境の変化によって不足する栄養 素の微生物細胞工場による生産を可能にすることに繋が るかもしれない.

要 約

標的化合物の排出は、微生物細胞工場にとって有利で ある. 最も成功した発酵生産法の一つであるヌクレオチ ド製造において, Corynebacterium stationis はランダム 変異によってヌクレオチドの細胞外への排出が可能に なった. 今回, 我々は, C. stationis ゲノムから, ヌクレ オチドを細胞外に排出する主要ファシリテータースー パーファミリー (MFS) 膜輸送タンパク質と、その G64 残基の高活性置換を見出した.構造推定と分子動力 学シミュレーションにより、この膜輸送タンパク質の 活性は2つのメカニズムで向上することが示唆された: (1) 膜貫通ヘリックス間の相互作用の強化,及び,その 効果が基質結合で増強されること, (2) 基質と相互作用 する残基を捕捉して基質結合 cavity からの基質の遊離を 促進すること. この結果は、MFS 膜輸送タンパク質が 基質との結合により、どのようにして内向きから外向き にコンフォメーションを変化させ、排出を促進するのか について新たな知見を提供するとともに、微生物細胞工 場における排出改善のための合理的な設計ストラテジー の開発に貢献するものである.

Supplementary Figure は https://doi.org/10.6084/m9. figshare.27184695 に格納してある.

Supplementary Figure 1 Nucleotide secretion phenotype was acquired in the early stages of breeding.

- (a) Selection history of nucleotide-fermenting *C. stationis*. Accession numbers of mutants and their selection criteria are shown. Boxed strains were used for genome analyses. The colored strains were assayed for nucleotide production to confirm their phenotypes.
- (b) Inosine 5'-mononucleotide (5'-IMP)-producing phenotypes of commercially mutated strains. Representative data from five independent analyses are shown.
- (c) Xanthosine 5'-monophosphate (5'-XMP)-producing phenotypes of commercially mutated strains. Representative data from three independent analyses are shown.

Supplementary Figure 2 Inosine 5'-mononucleotide (5' -IMP) production assay of overexpressed strains of *cs0286* and its mutants.

VC represents the vector control. The bars represent the means \pm standard errors of three independent experiments. Different letters indicate statistically significant differences determined using Tukey's honest significant difference test (p<0.01).

Supplementary Figure 3 CS0286 is a major facilitator superfamily (MFS) transporter

- (a) Protein structure of Cs0286. Transmembrane regions are colored gray.
- (b) Alignment of sequences around Motif B in various MFS transporters.
- (c) Maximum-likelihood tree of the Cs0286 transporter and its *E. coli* homologs. The tree was built using IQ-TREE, and the confidence levels with Shimohira-hasegawa approximate likelihood ratio test (SH-aLRT) are represented by the size of the circles on the nodes.

Supplementary Figure 4 Protein expression levels of cs0286 mutants.

His-tag fused cs0286 and its mutants were expressed and detected by Western blotting. One representative result of the three independent experiments is shown. M, marker; VC, vector control.

Supplementary Figure 5 The kinetics of 5'-IMP production.

- (a) Metabolic pathway of 5'-IMP production in I-9*ushAaphA*/ pMWKQ strain. Ino, Inosine; Hyp, Hypoxanthine.
- (b-d) Extracellular (ex) and extracellular-intracellular total (in+ex) purine nucleotide levels of 5'-IMP-producing cultures with vector control (b), wild-type *cs0286* expressing strain (c). and *cs0286*^{G64E} expressing strain (d). The extracellular 5'-IMP data (dotted blue, [IMP]ex) are reprinted in the main Fig. 2b. Means of three independent experiments are shown and the bars represent standard errors.
- (e) Rates of *de novo* purine nucleotide synthesis (v₁), 5'-IMP secretion (v₂), and 5'-IMP degradation (v₃) were calculated using 16 and 24h data in panels b to d. Bars represent standard errors.

Supplementary Figure 6 Structure comparison with other MFS transporters.

Upper row: Cs0286 estimated structure and *Staphylococcus aureus* NorC (PDB: 7D5P, green), *S. aureus* NorA (PDB: 7L07, yellow), *Escherichia coli* MdfA (PDB: 4ZOW, orange), and *E. coli* XylE (PDB: 4QIQ, blue). Cs0286 estimated structures aligned with each determined structure are shown in the lower row.

Supplementary Figure 7 Contribution of each residue in TM1-TM4 interactions.

Heatmap showing the interaction energies between each residue of TM1 and TM4 in the Cs0286 WT (a) and mutant (b). The cumulative interaction energies are represented by bar charts. The average values of three independent simulations are shown.

Supplementary Figure 8 Inosine 5'-mononucleotide (5'-IMP)-interacting sites of Cs0286

- (a, b) Representative image of the 5'-IMP-bound state of Cs0286 mutant. The viewpoint of Figure 5a, b and Movie 1 is shown in panel b.
- (c) The interaction energies between 5'-IMP and the surrounding residues within 0.8 nm of 5'-IMP in the Cs0286 wild type. Each circle represents the average value over the last 100 ns of 10 independent simulations. The blue bars represent the average of 10 simulations. Error bars indicate standard error. Highlighted residues are shown in panel b.

Supplementary Figure 9 Final structures of Cs0286 and its mutants in ten 340-ns independent molecular dynamics simulations in the presence of inosine 5'-mononucleotide (5'-IMP).

5′-IMPs are shown in the sphere model, and the positions of the G or E64 residues are colored in magenta.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

 (1) 黄瀬 啓太,小西 智之, 篠田 恵子, 川崎 寿. Corynebacterium stationisの変異型MFSトランスポーターによるIMPの分泌 型発酵生産.日本農芸化学会2023年度大会(3月14-17日,オ ンライン)

原著論文

 Kinose, K., Shinoda, K., Konishi, T., & Kawasaki, H. 2024. Mutational analysis in *Corynebacterium stationis* MFS transporters for improving nucleotide bioproduction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 108:251

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,杉本 雅一博士,夏 目 亮博士,ならびに,微生物膜輸送工学寄付講座の学 生・構成員諸氏に感謝の意を表します.また,JSPS 科 研費 新学術領域(篠田 恵子 20H0453),自然科学研究 機構 岡崎共通研究施設 計算科学研究センター(篠田 恵子 22-IMS-C089, 23-IMS-C077), 文部科学省「富岳」 成果創出加速プログラム「細胞内分子動態」(篠田 恵子) の支援にも感謝いたします.

文 献

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B. & Lindahl E. 2015. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 1-2: 19-25.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A, & Haak, J.R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys. 81: 3684–3690.
- Brawley, D.N., Sauer, D.B., Li. J. et al. 2022. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus* aureus. Nat. Chem. Biol. 18: 706–712.
- Cooke, J.V. & Keith, H.R. 1927. A type of urea-splitting bacterium found in the human intestinal tract. J Bacteriol **13**: 315–319.
- Darden, T., York, D. & Pedersen, L. 1993. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. **98**:.10089-10092.
- Das, P., Babaei, P. & Nielsen, J. 2019. Metagenomic analysis of microbe-mediated vitamin metabolism in the human gut microbiome. BMC Genomics 20: 208.
- Drew, D., North, R.A., Nagarathinam, K. & Tanabe, M. 2021. Structures and general transport mechanisms by the major facilitator superfamily (MFS). Chem. Rev. 121: 5289–5335.
- Fujitani, H., Matsuura, A., Sakai, S., Sato, H., & Tanida, Y. 2009. High-level ab initio calculations to improve protein backbone dihedral parameters. J. Chem. Theory Comput. 5: 1155–1165.
- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., Zhao, Y. & Zhang, X.C. 2015. Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. Cell Res. 25: 1060– 1073.
- Hess, B. 2008. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. J. Chem. Theory Comuput. 4: 116–122.
- Hoover, W.G. 1985. Canonical dynamics: equilibrium phasespace distributions. Phys. Rev. A **31**: 1695–1697.
- Hu, Y., Zu, Z., Nielsen, J. & Siewers, V. 2018 Heterologous transporter expression for improved fatty alcohol secretion in yeast. Metab. Eng. **45**: 51–58.
- Jinman, C., Kim, H., Oh, Y. & Park, J. 2013. U.S. Patent No. 8,530,200. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Buckner, J.K. & Madura, J.D. 1986. Computer simulations of organic reactions in solution. Ann. N.Y. Acad. Sci. 482: 198–209.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596: 583–589.
- Kakehi, M., Usuda, Y., Tabira, Y. & Sugimoto, S. 2007. Complete deficiency of 5'-nucleotidase activity in *Escherichia coli* leads to loss of growth on purine nucleotides but not of their excretion. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **13**: 96–104.
- Kamiya N, Kayanuma M, Fujitani H, Shinoda K (2020) A new lipid force field (FUJI). J Chem Theory Comput 16(6):3664– 3676. doi: 10.1021/acs.jctc.9b01195

- Kawasaki, H. & Martinac, B. 2020. Mechanosensitive channels of *Corynebacterium glutamicum* functioning as exporters of L-glutamate and other valuable metabolites. Curr. Opin. Chem. Biol. **59**: 77–83.
- Kim, J., Kwag, Y., Park, J., Koh, E., Oh, Y., Chang, J., Lee, K., Sim, J., Han, J. & Park, Y. 2004. U.S. Patent No. 6,821,768. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kumar, S., Athreya, A., Gulati, A., Nair, R.M., Mahendran, I., Ranjan, R. & Penmatsa, A. 2021. Structural basis of inhibition of a transporter from *Staphylococcus aureus*, NorC, through a single-domain camelid antibody. Commun. Biol. 4:836.
- Kwag, Y., Oh, K., Kim, J., Oh, Y., Sim, J., Park, Y. & Chang, J. 2008. U.S. Patent No. 7,456,010. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kwon, J., Baek, M., Lee, J., Kwon, N., Kim, J., Rho, J. & Cho, J. 2021. U.S. Patent No. 11,180,754. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D. & Ventura, M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. Curr. Opin. Biotechnol. 24: 160–168.
- Liu, Y., Yang, J., Jiang, Y. & Yang, S. 2016. Complete genome sequence of nucleoside producing strain *Corynebacterium stationis* ATCC 6872. J. Biotechnol. 225:57-58.
- López, J.M., Duran, L. & Avalos, J.L. 2022. Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering. Nat. Rev. Microbiol. 20: 35–48.
- Lv, X., Xue, H., Qin, L. & Li, C. 2022. Transporter engineering in microbial cell factory boosts biomanufacturing capacity. Biodes. Res. 2022:9871087.
- Madej, M.G., Sun, L., Yan, N. & Kaback, H.R. 2014. Functional architecture of MFS D-glucose transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111: E719–E727.
- Matsui, H., Kawasaki, H., Shimaoka, M. & Kurahashi, O. 2001. Investigation of various genotype characteristics for inosine accumulation in *Escherichia coli* W3110. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 570–578.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo. L., Ovchinnikov, S. & Steinegger, M. 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. Nat. Methods 19: 679–682.
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H. & Wachi, M. 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl. Environ. Microbiol. 73: 4491–4498.
- Nielsen, J., Tillegreen, C.B. & Petranovic, D. 2022. Innovation trends in industrial biotechnology. Trends Biotechnol. 40: 1160–1172.
- Nosé, S. 1984. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. Mol. Phys. **52**: 255–268.
- Park, Y., Chang, J., Lee, J., Oh, K., Kim, J., Oh, Y. & Sim, J. 2009. U.S. Patent No. 7,608,435. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Park, Y., Kim, H., Chohi, H., Lee, J., Hwang, S., Sim, J., Kang, T. & Lee, W. 2006. Korean Patent No. 100,588,577. Seoul: Korean Intellectual Property Office.
- Parrinello, M, & Rahman, A, 1981. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. J. Appl. Phys. 52: 7182–7190.

- Quistgaard, E.M., Löw, C., Guettou, F. & Nordlund, P. 2016 Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17: 123-132.
- Schmidt, T.H. & Kandt, C. 2012. LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. J. Chem. Inf. Model 52: 2657–2669.
- Sharma, V., Rodionov, D.A., Leyn, S.A., Tran, D., Iablokov, S.N., Ding, H., Peterson, D.A., Osterman, A.L. & Peterson, S.N. 2019. B-Vitamin sharing promotes stability of gut microbial communities. Front. Microbiol. 10: 1485.
- Shimaoka, M., Kawasaki, H., Takenaka, Y., Kurahashi, O. & Matsui, H. 2005. Effects of *edd* and *pgi* disruptions on inosine accumulation in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 1248–1255.
- Shimaoka, M., Takenaka, Y., Kurahashi, O., Kawasaki, H. & Matsui, H. 2007. Effect of amplification of desensitized *purF* and *prs* on inosine accumulation in *Escherichia coli*. J. Biosci. Bioeng, **103**:255–261.
- Shimaoka, M., Takenaka, Y., Mihara, Y., Kurahashi, O., Kawasaki, H. & Matsui, H. 2006. Effects of *xapA* and *guaA* disruption on inosine accumulation in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**: 3069–3072.
- Soto-Martin, E.C., Warnke, I., Farquharson, F.M., Christodoulou, M., Horgan, G., Derrien, M., Faurie, J.M., Flint, H.J., Duncan, S.H. & Louis, P. 2020. Vitamin biosynthesis by human gut butyrate-producing bacteria and cross-feeding in synthetic microbial communities *mBio* 11: e00886-20.
- Steiger, M.G., Rassinger, A., Mattanovich, D. & Sauer, M. 2019. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. Metab. Eng. 52: 224–231.
- Teshiba, S. & Furuya, A. 1982. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium* ammoniagenes. I. genetical improvement of 5'-IMP productivity of a permeability mutant of *B. ammoniagenes*. Agric. Biol. Chem. 46: 2257-2563.
- Teshiba, S. & Furuya, A. 1984. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. excretion mechanisms of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 48: 1311-1317.
- van der Hoek, S.A. & Borodina, I. 2020. Transporter engineering in microbial cell factories: the ins, the outs, and the in-betweens. Curr. Opin. Biotechnol. 66: 186–194.
- Wang, J., Xiong, Z., Li, S. & Wang, Y. 2013. Enhancing isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 8057–8067.
- Wennberg, C.L., Murtola, T., Páll, S., Abraham, M.J., Hess, B. & Lindahl, E. 2015. Direct-space corrections enable fast and accurate Lorentz-Berthelot combination rule Lennard-Jones lattice summation. J. Chem. Theory Comput. 11: 5737–5746.
- Wisedchaisri, G., Park, M.S., Iadanza, M.G., Zheng, H. & Gonen, T. 2014. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. Nat. Commun. 5: 4521.
- Zhang, X.C., Zhao, Y., Heng, J. & Jiang, D. 2015. Energy coupling mechanisms of MFS transporters. Protein Sci. 24: 1560–1579.

高精度全原子分子動力学シミュレーションによる膜輸送タンパク質の機能解析 篠田 恵子,川崎 寿

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 微生物膜輸送工学寄付講座 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Functional analysis of membrane transport proteins by high-precision all-atom molecular dynamics simulations Keiko Shinoda, Hisashi Kawasaki

Laboratory of Microbial Membrane Transport Engineering Agro-Biotechnology Research Center Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

This study focuses on analyzing the function of membrane transport proteins using high-precision all-atom molecular dynamics (MD) simulations, examining three key proteins: the sodium/proton antiporter A (NhaA), the light-driven proton pump bacteriorhodopsin, and the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter. For NhaA, it was found that the membrane of the cyclopropane fatty acid synthase gene disruptant showed tighter lipid packing and stronger interactions with NhaA compared to wild-type membranes, resulting in significant conformational changes in transmembrane helix 5 and enhanced Na transport activity. In the study of bacteriorhodopsin, new lipid force fields for archaeal membranes were developed, revealing that light activation strengthens interactions between retinal and key amino acids (Asp212 and Asp85) and highlighting the role of water molecule dynamics in proton transport. Differences in interactions between bacteriorhodopsin and archaeal membranes versus phosphatidylethanolamine (PE) membranes were also explored, showing significant structural impacts due to lipid composition. In the study of the MATE transporter, systems with varying protonation states of conserved acidic residues (Asp36, Glu255, Asp371) were examined, revealing that these residues play crucial roles in ion binding and transport. In particular, it was suggested that the protonation of Asp371 facilitates sodium uptake in the outward-facing state and supports sodium trapping by Glu255 in the inward-facing state. These findings provide detailed insights into the dynamic behavior and interaction mechanisms of membrane transport proteins, highlighting the importance of lipid composition and conserved residues in their function, contributing to a deeper understanding of membrane protein behavior, and informing drug development, biotechnological applications, and microbial-based production.

Key words: MD simulation, Fuji forcefield, transporter, NhaA, bacteriorhodopsin, MATE, lipid-protein interaction

現所属:大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 統計数理研究所 E-mail: kshinoda@ism.ac.jp 共同研究者: Hendrik W. Van Veen (Department of Pharmacology University of Cambridge) 富田 武郎 (東京大学農学生命科学研究科) 堀 一将 (協和発酵バイオ株式会社)

緒 言

膜タンパク質は生物学的プロセスにおいて中心的な役 割を果たし、細胞膜を介して物質や情報を輸送する機能 を持つ.これらの機能を理解することは、薬剤開発、生 物学的機能の解明、そして微生物を介した物質生産にお いて重要な要素となる.近年、分子動力学(Molecular Dynamics; MD)シミュレーションは膜タンパク質の構
造と機能を原子レベルで解析する強力な手法として広く 用いられている. MDシミュレーションは、分子の運動 をナノ秒からマイクロ秒スケールで追跡することで、静 的な構造からは得られない動的な情報を提供する。さら に、高精度の力場を使用することで、これまで明らかに されなかった相互作用や動的挙動を詳細に解析すること が可能となる。例えば、高精度な力場は、タンパク質と 脂質分子間の複雑な相互作用や、輸送過程における構造 変化をより正確に再現できる。特に、脂質分子の力場の 高精度化は、膜タンパク質研究において不可欠である. 膜タンパク質の機能は、周囲の脂質環境に強く依存して おり, 脂質分子との相互作用を正確に再現することが信 頼性の高いシミュレーション結果を得るためには必須で ある、私たちは、独自に開発した高精度の脂質分子力場 (Fuji forcefield)を用いることで、これまでにない詳細 な相互作用解析を行い. 膜タンパク質の機能メカニズム の解明に貢献したいと考える.

本報告書では、膜タンパク質の実験とシミュレーショ ンを組み合わせた解析として、ナトリウム/プトロンア ンチポーターである NhaA, 光駆動プロトンポンプであ るバクテリオロドプシン,および多剤排出トランスポー ターである MATE の研究成果について報告する.

実験方法

シミュレーション条件

(Abraham et al., 2015)を用いて行われた、タンパク質、 脂質分子,およびイオンの力場にはFuji力場(Kamiya et al., 2020; Fujitani et al., 2009)が、水の力場には TIP3Pモデル (Jorgensen et al., 1986) が用いられた. IMPの部分電荷は RESP 法で求められ、その他の力場 パラメータは Fuji 力場のものが使用された. すべてのシ ステムは150mM NaCl水溶液で溶媒和された.温度は Nosé-Hoover 法 (Nosé, 1984) (結合定数 1.0) を用いて 298Kに, 圧力はBerendsen法 (Berendsen et al., 1984) または Parrinello-Rahman 法 (Parrinello & Rahman, 1981)を用いて1気圧に制御された(結合定数2.0ps). 静電相互作用は, Particle Mesh Ewald (PME)法 (Darden et al., 1993)を用いて計算された.実空間のカットオフ 距離は 1.0nm に設定された. Lennard-Jones 相互作用に は Lennard-Jones Particle Mesh Ewald (LJ-PME) 法 (Wennberg et al., 2015) が用いられ, 逆空間でのコン ビネーション・ルールに geometric approximations が適 用された. Neighbor list には Verlet カットオフスキーム が使用された. すべての結合長はLINCS法 (lincs order 6) (Hess, 2008) によって拘束され、水素原子か ら結合角の自由度を取り除くために virtual site モデルが 適用された.

前処理, 前計算, 本計算

PDB (Protein data bank) などから取得するタンパク 質構造は missing atom や incomplete residue があるた め. Discoverv Studio 2020 を用いて構造を補正し、その 後LAMBADA プログラム (Schmidt & Kandt, 2012) を 用いて大腸菌モデル膜に埋め込んだ、タンパク質と重な る脂質分子を削除した後シミュレーションボックスに配 置し、150mMのNaCl溶液、0.1mMのMgCl。溶液で満 たして初期配置とした.次にタンパク質や溶媒分子の局 所的な衝突を防ぐため、最急降下法と共役勾配法を交互 に使用して系のエネルギー最小化を行った、その後、膜 構造を緩和するために、 タンパク質の重原子にのみ位置 制約をかけた状態で、半等方的な Berendsen 圧力制御 法を用いてタイムステップ2フェムト秒で60ナノ秒間 の等温等圧アンサンブル MD シミュレーションを行っ た、次に、位置制約のないシミュレーションをタイムス テップ2フェムト秒で20ナノ秒間,その後タイムステッ プ4フェムト秒で10ナノ秒間行った。その最終構造を 初期構造として、平衡化と解析用トラジェクトリを取得 するため、半等方的な Parrinello-Rahman 圧力制御法を 用い(タイムステップ4フェムト秒)初期運動量の異な る複数の独立な MD シミュレーションを行った. この時 系の各原子は298Kの温度における Maxwell-Boltzmann 分布に従う初速度を持つ.

大腸菌ナトリウム/プロトンアンチポーター NhaAの活 性に対する細胞膜脂肪酸による調整メカニズムの解析 膜モデルの構築

本研究では、脂肪酸合成関連遺伝子をノックアウトし た変異株を用いた NhaA 細胞膜の脂質組成評価実験に 基づき、大腸菌の野生型 W3110S 株の細胞膜(W3110S 膜)と大腸菌 cyclopropane fatty acid synthase 遺伝子欠 損株膜(ΔCFA 膜)のモデル膜を構築した.まず分子モ デルとして不足している2種のカルジオリピンのモデリ ングと力場開発を行なった.Fig.1に示されるように、 W3110S 膜のカルジオリピンではB鎖の炭素9位と10 位の位置にシクロプロパン環があるのに対し、ΔCFA 膜 のカルジオリピンではその部位が二重結合になっている という違いがある.次に実験から得られた脂肪酸の比率 (Table 1)に基づき,脂肪酸組成の異なるW3110S 膜と ΔCFA 膜を構築した(Fig.2).シクロプロパン環合成遺 伝子を破壊したΔCFA 膜ではシクロプロパン環を有する 脂質分子は含まれていないのがわかる.



Fig. 1 Chemical structures of cardiolipins from W3110S membrane and ΔCFA membrane
 (a) Cardiolipin of W3110S membrane (b) Cardiolipin of ΔCFA membrane. Each of the four chains of cardiolipin is designated as chain A, chain B, chain C, and chain D from top to bottom.

Strain	Pal ^{a)}	Ple ^{b)}	C17c ^{c)}	Vac ^{d)}	C19c ^{e)}	total UFA	total (%) CFA
W3110S	47.1	5.2	37.7	2.2	7.9	7.4	45.5
Δcfa	50.3	36.3	N.D.	13.3	N.D.	49.7	0

 Table 1
 Fatty acid composition of constructed strains

N.D.: not detected.

^{a)}Palmitic acid (SFA)

^{b)}Palmitoleic acid (UFA)

 $^{\rm c)}{\it cis}$ -9,10-Methylene hexadecanoic acid (CFA)

^{d)}cis-vaccenic acid (UFA)

 $^{\rm e)}{\it cis}$ -11,12-Methylene octa
decanoic acid $({\rm CFA})$



Fig. 2 Membrane composition Lipid chemical structures, lipid composition and ratios of W3110S (a) and ΔCFA(b) membranes.

初期構造の作成とシミュレーション時間

NhaAの初期座標は、X線結晶構造(PDBID: 4AU5) (Lee *et al.* 2014)から取得した.この構造をDiscovery Studio 2020を用いて、不完全なアミノ酸の補完などの 前処理を行った後、NhaA二量体の界面にカルジオリピ ンをDiscovery Studio 2020のCDOCKERツールを使用 して挿入し最適化した.作成したNhaA-カルジオリピ ン(シクロプロパン環あり)の複合体をW3110S 膜へ、 NhaA-カルジオリピン(シクロプロパン環なし)の複合 体を ΔCFA 膜へ埋め込んで、タンパク質と重なる脂質分 子を削除し溶媒(水, Na, Cl, Mg)を加えて初期構造 とした. 各系に対し、400ナノ秒の4つの独立な MDシ ミュレーションを行った.

バクテリオロドプシンの MD シミュレーション 古細菌脂質分子の力場開発

バクテリオロドプシンが存在する高度好塩菌膜では、 他の生物とは異なり、L-glycerol 結合を持つ分岐鎖エー



Fig. 3 Chemical structures of biomembrane model lipid and archaeal model lipids Biomembrane model lipid: POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) Archaeal model lipids: PHLE (2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerol-1-phosfatidyletanolamine), DQLE (2,3-Di-O-pentanoylsn-glycerol-1-phosfatidyletanolamine) The area enclosed by the dotted circle is the glycerol backbone.

テル型脂質が多数を占める.既存の力場にはこのL型の グリセロ骨格部分を含む力場パラメータセットが存在し なかったため,Fuji力場の手法(Kamiya *et al.*, 2020)を 用いて古細菌膜脂質分子 PHLE (2,3-Di-O-phytanyl-snglycerol-1-phosfatidyletanolamine)とDQLE (2,3-Di-Opentanoyl-sn-glycerol-1-phosfatidyletanolamine)(Fig.3) の力場パラメータセットを開発し,PHLE:DQLE=1:1 の古細菌モデル膜を構築した.

初期構造の作成とシミュレーション時間

自由電子レーザーを用いた実験では光照射後16ナノ 秒から1.7ミリ秒まで13のタイムポントで構造が決定 されているが、本研究では、バクテリオロドプシンの初 期構造は、実験で得られた結晶構造のうち、K状態(励 起後16ナノ秒と760ナノ秒)の構造とL状態(励起後 2マイクロ秒と36.2マイクロ秒)の構造、および励起前 の構造を用いた、プロトン移動に関わる数残基のアミノ 酸(Asp85, Arg82, Asp96, Arg212, Glu204, Glu194, Arg115)については結晶構造に基づきプロトン化状態 を考慮した.各状態のバクテリオロドプシンの構造は、 400ナノ秒のMDシミュレーションを経て十分に平衡化 された古細菌モデル膜に埋め込まれた.励起前の構造を 初期構造としたシミュレーションでは500ナノ秒、それ 以外の構造では1から2マイクロ秒のシミュレーション をそれぞれ4本行った.

多剤排出トランスポーター MATE の MD シミュレー ション

初期構造の作成とシミュレーション時間

*Vibrio cholerae*由来のNorM-VCとそのホモログである *Pseudomonas stutzeri*由来のNorM-PSに対して, inwardfacing 状態と outward-facing 状態における構造を, 3つ

の保存された酸性残基(D36, E255, D371)のプロトン 化状態を変えて作成した. NorM-VCにおいては, Outward-facing 構造は NorM-VC の結晶構造 (PDB-ID: 3MKT) を用い, inward-facing構造は, pfMATEの inward-facing 結晶構造 (PDB-ID: 6FHZ) を用いたホ モロジーモデリングにより作成した. NorM-PSにおい ては, outward-facing 構造は NorM-VC の結晶構造に基 づいて, inward-facing 構造は pfMATE の inward-facing 結晶構造に基づいてホモロジーモデルを使用して作成さ れた. 各タンパク質は、1マイクロ秒の MD シミュレー ションを経て十分に平衡化された大腸菌モデル膜に埋め 込んだ. NorM-VCとNorM-PSに対して,酸性残基それ ぞれをプロトン化した系と全て脱プロトン化した系の合 計4つの系を作成した. 1マイクロ秒の MD シミュレー ションを経て十分に平衡化された大腸菌モデル膜に各タ ンパク質構造を埋め込み、NaCl溶液で満たして MD シ ミュレーションの初期座標とした. 各系に対してそれぞ れ4本ずつ500ナノ秒のMDシミュレーションを行った.

結果および考察

大腸菌ナトリウム/プロトンアンチポーター NhaAの活 性に対する細胞膜脂肪酸による調整メカニズムの解析

細菌の細胞膜の脂質は環境に応答して脂質組成が変化 することが知られている(Zang & Rock,2008).例えば 大腸菌(*Escherichia coli*)では、温度が低下すると細胞 膜の流動性を保つため不飽和脂肪酸の割合が増加するこ とや(Mansilla *et al.*, 2004)栄養状態や酸素供給の変動 によって細胞膜の機能を最適化するため脂質構成が変化 することが知られている(Parsons & Rock, 2013).我々 の実験グループでは大腸菌膜の脂肪酸組成の差が、大腸 菌の主要なナトリウム/プロトンアンチポーターである NhaAの輸送活性に影響を及ぼし、シクロプロパン環を 持たない脂肪酸組成の膜では、野生型の膜に比べてNhaA のナトリウム排出活性が高いことを見出した.しかしそ の脂肪酸組成の差が具体的に膜タンパク質にどのように 影響を及ぼすのか、そのメカニズムは不明である.本研 究では、脂肪酸合成関連遺伝子をノックアウトした変異 株を用いた NhaA 細胞膜の脂質組成評価実験に基づき、 シクロプロパン脂肪酸シンターゼを欠損させた細胞膜 (ΔCFA 膜)と野生型の細胞膜(W3110S 膜)について計 算モデルを構築し、分子動力学(Molecular Dynamics; MD)シミュレーションを用いて脂肪酸組成と NhaAの 活性との関係を解析した.

NhaAと膜との相互作用エネルギーの差を調べた結 果, NhaAとW3110S膜の相互作用エネルギーは-3620 ±120kJ/molであるのに対しNhaAとACFA膜との相互 作用エネルギーは-3820±60kJ/molとなり, NhaAは W3110S膜よりもACFA膜との相互作用の方が大きいこ とがわかった.この差がどのアミノ酸からの寄与による ものかを調べるために, NhaAの各アミノ酸と膜全体と の相互作用エネルギーを計算した(Fig.4).その結果, 差が見られるアミノ酸の多くは,膜-溶媒界面の位置に 存在しており,特に活性中心が存在している膜貫通領域 の5番目のヘリックス(TM5)の両端のループに多いこ とがわかった.

Fig.5で見られるように、このループ上のアミノ酸は 脂質分子のヘッドグループと相互作用している. NhaA は外向き構造から内向き構造へのコンフォメーションを 変化させながら、プロトン2つに対してナトリウムイオ ン1つを輸送するが、その輸送にTM5のアミノ酸が関 わっていることが知られており(Lee et al, 2014), 先行 研究ではこのTM5が、TM5上に存在する活性中心を中 心として曲がるようなコンフォーション変化を起こすと 考えられている (Huang et al., 2016). そこでこのTM5の 曲がり角度や活性中心を含む cytoplasmic gate (Gadsby 2009)と呼ばれる水やイオンの細胞側からの通り道の ゲートの慣性半径を計算した. その結果 ACFA 膜系と W3110S 膜系では、ΔCFA 膜系の方が僅かに曲がりの角 度が大きく (Fig.6), cytoplasmic gate の慣性半径も W3110S 膜系の4.2±0.2Åに対し4.7±0.2Åと僅かに大 きくなっていることがわかった. これらのことは、TM5 両端のループ上のアミノ酸と膜との相互作用の差によっ て、TM5のコンフォメーションに差が現れたことを示し ている. また, ΔCFA 膜系の area per lipid は W3110S 膜 系の42.7±0.6Å²に対して41.0±0.5Å²と小さく、ΔCFA 膜系の膜はW3110S 膜系と比べ,脂質分子のパッキング がタイトであることがわかった. このパッキングの差は NhaAと周りの脂質分子との距離の差に直結することか ら、相互作用の大きさに影響を及ぼしたと考えられる.

本研究では、脂肪酸組成の差が具体的に膜タンパク質 にどのように影響を及ぼすのかを MD シミュレーショ ンを用いて解析した.シクロプロパン環を持たない脂質 で構成された ΔCFA 膜系は、シクロプロパン環をもつ脂 質を含む W3110S 膜系と比べ、脂質分子がタイトにパッ キングされるため NhaA との相互作用が強くなること、 特に TM5 の両端のループ上のアミノ酸との相互作用が 強いため TM5 のコンフォメーションがより変化するこ とが見出された.膜の脂肪酸組成の差が TM5 のコンフォ メーションに影響を及ぼし、NhaA のナトリウム輸送活 性の向上に関与することが示唆された.

バクテリオロドプシンの MD シミュレーション

バクテリオロドプシンは微生物ロドプシンの中で最初 に発見された高度好塩菌膜に存在する光駆動型プロトン ポンプである.バクテリオロドプシンに含まれるレチ ナール分子が光を吸収すると、トランス体からシス体へ と異性化が起こり、複数の中間体を経てプロトンを細胞 外へと輸送するサイクルが起こることが知られている (Haupts et al., 1999; Neutze et al., 2002; Wickstrand et al., 2015, Matsui et al., 2002; Borshchevskiy et al., 2011; Borshchevskiy et al., 2014). 南後らのグループは、X線 自由電子レーザーを用いた時間分解連続フェムト秒結晶 構造解析 (SFX) より、光活性化後のナノ秒からミリ 秒にわたるバクテリオロドプシンの立体構造変化を13 のタイムポイントで決定することで可視化し、プロトン の輸送に対してロドプシン内の鍵となるアミノ酸のみな らず水分子の関与も示した (Nango et al., 2016). これ らの知見は静止状態である結晶中で得られたものである が、ゆらぐ実際の細胞環境ではバクテリアロドプシンは どのような振る舞いをしているのだろうか?本研究は, 古細菌膜を構成する脂質分子の力場開発から始めて古細 菌膜モデルを構築することで、実際の膜環境に近い条件 でバクテリオロドプシンの原子レベルの動態を調べ、新 たな知見を得ることを目的とした.

まず,励起後16ナノ秒と励起前構造についてレチナー ルと周りのアミノ酸との相互作用,水の分布を調べた. レチナールと周りのアミノ酸との相互作用を調べた結 果,レチナールはプロトン移動に関与するアミノ酸のう ち,Asp212とAsp85との相互作用が大きく,さらに Asp212との相互作用は光励起後状態の方がレスティン グ状態よりも有意に大きいこともわかった(Fig.7). Asp85はシッフ塩基からプロトンを受け取る主要なプロ トン受容体であり,Asp212は,光励起後に新たな水分 子との水素結合を形成し,プロトンポンピングの過程に おいて構造変化を引き起こすことが知られる.結晶構造



Fig. 4 Interaction Energy

Blue and orange bars represent interaction energies for NhaA-W3110S system and NhaA- Δ CFA system, respectively. Red and blue arrows indicate residues which show significant increase and decrease of interaction energy between NhaA and membrane in NhaA- Δ CFA system compared to NhaA-W3110S system. Black, pink, and green horizontal bars indicate transmembrane, cytoplasmic side loops, and extracellular side loops, respectively. The numbers above the horizontal bars are the helix or loop number. Error bars represent standard error.



Fig. 5 NhaA structure after molecular dynamics

(a) Residues with significant differences in interaction energy between NhaA-W3110S and NhaA- Δ CFA systems mapped in 3D structure. In the comparison of NhaA- Δ CFA and NhaA-W3110S systems, residues with stronger interactions with the membrane in the NhaA- Δ CFA system than those in the NhaA-W3110S system are indicated in orange, while those with weaker interactions are shown in blue. Residues located in TM5 with stronger interactions are highlighted in magenta. (b) Close-up view of Fig.4a focusing on the interaction site between the head group of membrane lipid and the residues on cytoplasmic loop of NhaA.



Fig. 6 A bending of TM5 and Cytoplasmic gate

(a) A bending of TM5. TM5 (cyan cartoon display) of NhaA-ΔCFA system is shown superimposed on TM5 (green cartoon display) of NhaA-W3110S system. NhaA of W3110S system is shown in gray cartoon.
(b) Cytoplasmic gate. Five hydrophobic cytoplasmic gate residues (Val75, Ile134, Met157, Ala160 and Ile161) are depicted in green sticks, and two asparagine acids (Asp163 and Asp164) are depicted in orange sticks.



Fig.7 Interaction between retinal and surrounding amino acids

(a) Retinal (cyan) and key amino acids. (b) Interaction energy between retinal and surrounding amino acids.

では、レチナールとAsp212やAsp85との平均の距離は 同程度で、この両残基の間にW402が、その近傍に W400とW401の水分子が存在している.一方, MDシ ミュレーションでは、W402に相当する水分子はAsp212 とAsp85の間ではなくAsp212寄りに位置しており、 Asp85 近傍の水分子が激しく入れ替わっていた. W402 に相当する水分子はほとんど入れ替わりがなくレチナー ルとの間で安定に位置していたことから、この水の安定 性がレチナールとAsp212との相互作用を安定に維持し、 強さに反映されたと考えられる.水の分布にもその状況 が現れており、W402に相当する水は特定の場所に強く 束縛されている様子が観察された(Fig.8). また. W404 の位置に2つの強く束縛された分布領域があることがわ かるが、MDシミュレーションで観察すると、この領域 に存在する水は、それぞれその場所に水分子が束縛され るわけではなく、絶えず入れ替わっていた、実際の結晶 構造では、alternate form として記録されており、水分 子のダイナミクスが反映されたことが示唆される. 更に レスティング構造と励起後16ナノ秒の構造ともに、結 晶構造では見られなかった水分子 W452 の分布があるの がわかる (Fig.8). この領域にはL状態の結晶構造に おいて水分子が存在していることから, resting および K状態における水分子が束縛されずに絶えず運動して いる状況が、L状態になると2つの谷のどちらかに落ち 着いていくことが考えられる. さらに, 古細菌膜と生 体モデル膜 (POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3phosphoethanolamine) 膜) におけるバクテリオロドプ シンとの相互作用の違いを解析した結果、三量体である バクテリオロドプシンと POPE 膜, 古細菌膜との相互 作用は、-2013 ± 82 kJ/mol、-1801 ± 80 kJ/mol と POPE 膜の方が大きいことが明らかとなり、バクテリオロドプ シンのモノマー・モノマー界面に位置するアミノ酸と POPE 膜は相互作用していたのに対し、古細菌膜では相 互作用がほとんどないことがわかった. また. バクテリ オロドプシンのモノマー・モノマー相互作用は、古細菌 膜系の-844±88kI/mol に対して POPE 膜系では-605± 83kJ/molであり、モノマー・モノマー界面に POPE が 入り込んでアミノ酸と相互作用することにより、モノ マー・モノマー相互作用が弱まったと考えられる. 膜 の違いによる影響は、2番目の膜貫通へリックス(B transmembrane helix)の角度(膜面に垂直な方向との 角度) に顕著に現れ (Fig.9), POPE 膜系では 6.2±0.8 度であるのに対し、古細菌膜系では11±1.4度であった。 これらの差異は、POPEのカルボニル酸素との相互作用 に起因しており、脂質分子のグリセロ骨格部分の構造の 違いがバクテリオロドプシンと膜との相互作用の差に大 きく寄与することが示唆された(Fig.10).

本研究では、新たに古細菌の脂質分子の力場を開発、 膜モデルを構築し、2マイクロ秒のMDシミュレーショ ンを実施した.レチナールと周囲のアミノ酸の相互作用、 水の分布を詳細に解析した結果、光励起後にレチナール とAsp212との相互作用が強くなり、水分子のダイナミク スがそれらの相互作用に関与することが示された.また、 古細菌膜と生体モデル膜の違いがバクテリオロドプシン に及ぼす影響を調べた結果、それは脂質分子の構造の違 い、特にグリセロール骨格の違いに起因し、バクテリオ ロドプシンのコンフォメーションの違いにも及ぶことが 示された.



resting state



K state (at 16ns after excitation)





篠田 恵子, 川崎 寿



Fig.9 Angle of the transmembrane helix relative to the membrane plane From left to right, the angles for the archaeal membrane system, the biological model membrane system, and the crystal structure are shown.



Fig. 10 Lipid molecules penetrating the monomer-monomer interface of bacteriorhodopsin The circled areas indicate the glycerol backbone of the lipid molecules.

多剤排出トランスポーター MATE の MD シミュレー ション

多剤排出トランスポーターは薬物耐性の一つの重要な 要因とされる膜タンパク質で、構造・作用機序の異なる 複数の薬剤(多剤)を認識し排出する. MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) は原核生物から高等 真核生物に至るまで広く保存されている多剤排出輸送体 ファミリーの一つである. MATEファミリーは約450 アミノ酸残基,12回の膜貫通へリックスを有し,Naイ オンあるいはプロトンの濃度勾配を利用した対向輸送に よりさまざまな異物を細胞外へと排出することで、細胞 の恒常性を維持しているとされる. MATEによる能動 輸送に関しては, alternating-access mechanism という 輸送機構モデルが提唱されている (Claxton et al.,2021). このモデルでは、膜輸送体が細胞外に開いている状態 (outward-facing) にプロトンやイオンと基質が結合す ることで, 閉状態を経て, 細胞内側に開いている状態 (inward-facing) へと構造変化を起こす. さらに、

inward-facing 時にプロトンやイオンと基質が外れることで,閉状態を経て outward-facing へと戻る構造変化が 起こる.

これまで、MATEファミリーのトランスポーターは、 Naイオンまたはプロトンと共役して対向輸送を仲介す るとされ、その中でNorMサブファミリーはNaイオン のみに依存すると考えられてきた、しかし、ケンブリッ ジ大の van Veen グループは、コレラ菌(Vibrio cholerae) 由来のNorM-VCがNaイオンとプロトンの両方に共役 して薬剤を排出し、プロトン選択性の経路とプロトンお よびNaイオンの選択性を持つ経路の2種類が存在する ことを見出した(Jin et al., 2014).しかし、なぜ2つの 経路があるのか、その詳細はわかっていない、また、結 晶構造解析よりD36、E255、D371といった保存された 酸性残基がNaイオン結合に寄与する可能性も示唆され ていた(He et al., 2010; Lu et al., 2013)が詳細は不明であ る、そこで本研究では、分子動力学(MD)シミュレー ションを用いて保存された酸性残基の役割やそれらのプ ロトン化の有無が NorM タンパク質のダイナミクスとイ オン輸送にどのように関係しているかを明らかにするこ とを目的とした.

まず3つの保存された酸性残基全てが脱プロトン化 した状態で,NorM-VCとそのホモログであり基質排出 がNaイオンに依存しないことがわかっているNorM-PS のタンパク質表面の静電ポテンシャル面を調べた (Fig.11).NorM-VCはNorM-PSに比べてD36付近に 負の静電ポテンシャルを持つ領域があることが明らかに なった.この違いは,Naイオンの結合特性に影響を与え ていると考えられる.D36は結晶構造解析からNaイオ ンの結合が示唆されており,van Veenグループにおいて もD36N変異体における基質(エチジウム)結合アッセ イによりD36がNaイオン結合に寄与していることが確 認された.そこでこの領域(ポケット)とNaイオンと の相互作用の詳細を調べるためにNorM-VCとNorM-PS に対してNaイオンをあらかじめD36(NorM-VC)やD38

(NorM-PS)の近くに配置させシミュレーションを行っ た. 計算から得られた相互作用エネルギーはNorM-VC の-215kJ/mol に対し NorM-PS では-15kJ/mol と小さい 値であった.この結果は、NorM-PSの基質輸送がNaイ オン濃度に依存しないという実験結果を支持するもので ある. 実際, NorM-VC では 500 ナノ秒後でも 4 本全ての トラジェクトリで Na イオンは D36 ポケット内に保持さ れたのに対し、NorM-PSではシミュレーション開始後 50ナノ秒から300ナノ秒にかけて全てのNaイオンが D38ポケットから離れていった. さらにNorM-VCで D36をプロトン化した系においてもNaイオンとの相互 作用は小さくなり、D36ポケットには保持されなかった (Fig. 12). このことから、NorM-VCにおいてNaイオン がD36ポケットに保持されるためには脱プロトン化し たD36とNaイオンとの相互作用が重要であることがわ かる. Outward-facing 状態の NorM-VC では Na イオン がD36に結合した後少なくとも1µsは結合状態が保持



Fig.11 Comparison of the external surface of NorM-VC and NorM-PS

Electrostatic surface potentials of the protein surface at the periplasmic face of outward-facing NorM-VC (top row) and NorM-PS (bottom row) at the end of four 500 ns equilibrium simulations. The molecular surfaces are coloured according to electrostatic potential from -5 (red) to +5 kT/e (blue). D36, E255 and D371 in NorM-VC and D38, E257 and D373 in NorM-PS are shown in sphere representation. Figure was generated using Pymol v2.4.0.



Fig.12 MD simulations on the dissociation of pre-bound Na⁺ from the D36/D38 pockets in outward-facing NorM-VC/NorM-PS

(a) Interaction energies between bound Na⁺ and residues in the D36 pocket within 0.8 nm distance of the Na⁺ were averaged over four MD simulations from 90 to 100 ns. (b) Close-up view of the D36 pocket at 100 ns for each of the four runs. The interacting residues are indicated using a stick representation. (c) Na⁺ dissociation from the D36 pocket is enhanced by protonation of D36. These simulations show that the pre-bound Na⁺ ion was retained in all four simulations for NorM-VC and was released from the pocket when the anionic charge in the D36 side chain was neutralised by protonation of the carboxylate. (d,e) MD simulations similar to those in *panel a and b* for the D38 pocket in NorM-PS. In two out of four simulations with NorM-PS, Na⁺ was not retained but diffused away from the D38 pocket within 100 ns. These simulations suggest that the D36 pocket binds Na⁺ more easily than the D38 pocket. Values are expressed as mean \pm s.e.m.

されたが、結合されたままinward-facing 状態に構造変 化が起こった場合どうなるかを調べるために、D36 に Na イオンを結合させた状態から出発した inward-facing 状態の NorM-VC の MD シミュレーションを行なった. その結果、Na イオンが周りの空間に応じて配位する水 分子の数を変え(Fig.13)、Cローブ/Nローブ界面へ 移動する様子が観察された.この移動経路は、Na イオ ンの D36 から C ローブ/N ローブ界面への移動経路の一 つであることを示唆するものである.

Outward-facing 状態の D371をプロトン化した NorM-VC の系では、4本のシミュレーションのうち3本において 自発的に Na イオンが D36 に結合することが観察され た (Fig.14). このことから、D371のプロトン化は outward-facing 状態におけるナトリウム取り込みに関与 する可能性が示唆された.一方、inward-facing 状態の D371をプロトン化した NorM-VC の系では、細胞質側 から中央の空洞領域へ Na イオンが入り込み、E255 でト ラップされる様子が4本全てのシミュレーションで観察 された (Fig.15).入り込んだナトリウムは1マイクロ秒 後もトラップされたままだった.プロトン化された D371とE255はNローブ上で互いに近い距離に位置し ており,共通の水分子と相互作用することが観察された. このことから水を介したD371とE255の相互作用が E255によるNaイオンのトラップを間接的に支えている と考えられる.この結果は、E255がNaイオンの細胞質 から細胞外への逆流を防ぐ役割を担い、D371のプロト ン化はその役割に間接的に関与することを示唆している.

本研究では保存された酸性残基(D36, E255, D371) のプロトン化状態を変えたMATEモデルを作成し, そ れぞれのMDシミュレーションを実施した.Naイオン とMATEの相互作用や,ダイナミクスを解析した結果, 保存された酸性残基がNaイオンの結合と輸送において 重要な役割を果たすことが示された.特にD371のプロ トン化が outward-facing 状態でのナトリウム取り込みを 促進し, inward-facing 状態ではE255によるナトリウム トラップを支えることが示された. この知見は,MATE ファミリーの薬剤排出機構の理解を深めるための重要な 要素となるものである.



Fig. 13 Number of water molecules around Na⁺ during the movement from D36 to E255 in inward-facing NorM-VC (D36, E255 and D371 deprotonated)

(a) Change of the number of water molecules around Na⁺ in a time span from 0 to 30 ns. The indicated number of water molecules was the block average calculated for each 0.8 ns period. (b) Close-up views of snapshots at each position ($c1 \sim c5$) in *panel a*. The residues and water molecules within 0.35 nm of the moving Na⁺ are indicated using a stick representation. D36 and E255 are coloured in green and orange, respectively.



Fig. 14 Na⁺ binding to the D36/D38 pockets in outward-facing NorM-VC and NorM-PS

The interaction of Na⁺ with the D36 and D38 pockets was compared by simulating the movement of the free ion into the empty pockets over a time span of 500 ns. (a) Minimum distance between Na⁺ and D36/D38 is plotted against the simulation time. The minimum distance is defined as the distance between D36 or D38 and the nearest Na⁺ among all Na⁺ ions in the external environment. Four MD runs (v1 to v4 for NorM-VC and p1 to p4 for NorM-PS) are represented in different colours. The distances in three out of four runs for NorM-VC reached close to 0.25 nm and were maintained over time, indicating that Na⁺ was bound to D36. However, no binding of Na⁺ in the D38 pocket was observed in the four simulations with NorM-PS. (b) Close-up views of the region close to D36 in NorM-VC or D38 in NorM-PS at 500 ns are presented for each of the four runs. The D36/D38 residues are indicated in a stick representation. These simulations show that the D36 pocket binds Na⁺ in three out of four runs, whereas the D38 pocket remains empty in all four runs.

要 約

本研究では, 膜タンパク質の機能解析を目的として, 高精度な力場を用いた分子動力学(MD)シミュレーショ ンを実施し,大腸菌ナトリウム/プロトンアンチポー ター NhaA,バクテリオロドプシン,多剤排出トランス ポーター MATE の3つの膜タンパク質の解析を行った.

まず,大腸菌ナトリウム/プロトンアンチポーター NhaAの解析では,実験結果に基づき脂肪酸組成の異な る膜モデルを構築し,NhaAと膜との相互作用の違いを 調べた.シクロプロパン環を持たない脂質で構成された ΔCFA 膜系は,シクロプロパン環をもつ脂質を含む W3110S 膜系と比べ, 脂質分子がタイトにパッキングさ れるため NhaA との相互作用が強くなること,特に膜貫 通領域の TM5のコンフォメーション変化が大きくなる ことが示された. 膜の脂肪酸組成の差が TM5のコンフォ メーションに影響を及ぼし, NhaAのナトリウム輸送活 性の向上に関与することが示唆された.

次に、バクテリオロドプシンの解析では、新たに古細 菌の脂質分子の力場を開発、膜モデルを構築し、2マイ クロ秒の MD シミュレーションを実施した. レチナー ルと周囲のアミノ酸の相互作用、水の分布を詳細に解析 した結果、光励起後にレチナールとAsp212 との相互作 用が強くなり、水分子のダイナミクスがそれらの相互作 用に関与することが示された. また、古細菌膜と生体モ





a) Minimum distance between Na⁺ and D36 (with D36, E255 and D371 deprotonated). Na⁺ moves from D36 to E255 via a cavity region containing water molecules rather than residues in close vicinity. (b) Snapshots at 0ns (c1) to 28 ns (c5) of Na⁺ translocation from D36 to E255, and snapshot at 1 μ s (d) of Na⁺ binding to E255 from the cytoplasmic side (with protonated D371). The black letters indicate the residues (in stick representation) that are within 0.35 nm of the moving Na⁺. (c) Minimum distance between Na⁺ and E255 (with protonated D371). In the simulation, Na⁺ moves from the cytoplasmic side and is bound near E255 until the end of the simulation (1 μ s).

デル膜の違いがバクテリオロドプシンに及ぼす影響を調 べた結果,それは脂質分子の構造の違い,特にグリセロー ル骨格の違いに起因し,バクテリオロドプシンのコン フォメーションの違いにも及ぶことが示された.

最後に、MATEトランスポーターの解析では、保存 された酸性残基(D36,E255,D371)のプロトン化状 態を変えたMATEモデルを作成し、それぞれのMDシ ミュレーションを実施した。NaイオンとMATEの相互 作用や、ダイナミクスを解析した結果、保存された酸性 残基がNaイオンの結合と輸送において重要な役割を果 たすことが示された。特にD371のプロトン化が outward-facing状態でのナトリウム取り込みを促進し、 inward-facing状態ではE255によるナトリウムトラップ を支えることが示唆された。この知見は、MATEファ ミリーの薬剤排出機構の理解を深めるための重要な手掛 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

- 堀 一将, 篠田 恵子, 浜本 晋, 氏原 哲朗, 川崎 寿, 富田 武郎, 西山 真. 2023. 細胞膜脂肪酸組成が大腸菌のNa⁺/H⁺アンチ ポーター活性に与える影響. 日本農芸化学会2022年度大会 (3月17日, 京都)
- Shinoda, K. & Kawasaki, H.. 2022. Molecular dynamics study of multidrug efflux transporter complex embedded in lipid bilayer: Role of membrane lipids in the transporter. 第 60回日本生物物理学会年会(9月29日, 函館)
- 3) Shinoda, K., Kawasaki, H., Murakami, S., Raturi, S., Nair, A. V., Singh, H., Bai, B. & van Veen, H. W.. 2021. Involvement of conserved amino acids in ion transport pathways of multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter. 第59回日本生物物理学会年会(1月25 日, オンライン)
- 4) 篠田 恵子, 川崎 寿. 2021. 多剤排出トランスポーター MATEの分子動力学シミュレーション:イオンカップリ ング経路におけるカルボキシレートの役割. 第94回日本生 化学会年会(11月4日,オンライン)

5) 篠田 恵子, 川崎 寿. 2021. MATEトランスポーターの分子動 力学シミュレーション. 第47回生体分子科学討論会(6月4 日. オンライン)

原著論文

- Shinoda, K., Yokojima, S., Fukaminato, T. & Nakamura, S. 2021. Determining factor of the quantum yield of the cyclization reaction via triplet States for dye-attached diarylethene. J. Phys. Chem. A. 125(27): 5895–5902.
- 2) Raturi, S., Nair, A.V., Shinoda, K., Singh, H., Bai, B., Murakami, S., Fujitani, H. & van Veen, H.W. 2021. Engineered MATE multidrug transporters reveal two functionally distinct ion-coupling pathways in NorM from *Vibrio cholerae*. Commun. Biol. 4(1): 558.
- Kamiya, N., Kayanuma, M., Fujitani, H. & Shinoda, K. 2020. A new lipid force field (FUJI). J. Chem. Theory Comput. 16(6): 3664–3676.

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,本研究の計算は自然科学研究機構岡崎共通研究施設計算科学研究センターを利用して行われました(課題番号 22-IMS-C089, 23-IMS-C077).また,本研究の一部はJSPS 科研費 JP20H05453 の助成を受けたものです.合わせて心より感謝申し上げます.

文 献

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B. & Lindahl, E. 2015. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 1-2: 19–25.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A. & Haak, J.R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys. 81 (8): 3684–3690.
- Borshchevskiy, V.I., Round, E.S., Popov, A.N., Büldt, G. & Gordeliy, V.I. 2011. X-ray-radiation-induced changes in bacteriorhodopsin structure. J. Mol. Biol. 409: 813–825.
- Borshchevskiy, V.I. *et al.* 2014. Low-dose X-ray radiation induces structural alterations in proteins. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **70**: 2675–2685.
- Claxton, D.P., Jagessar, K.L. & Mchaourab, H.S. 2021. Principles of alternating access in multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. J. Mol. Biol. 433 (16): Article 166959.
- Darden, T., York, D. & Pedersen, L. 1993. Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. **98**(12): 10089–10092.
- Fujitani, H., Matsuura, A., Sakai, S., Sato, H. & Tanida, Y. 2009. High-level ab initio calculations to improve protein backbone dihedral parameters. J. Chem. Theory Comput. 5(4): 1155– 1165.
- Gadsby, D. 2009. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **10**: 344–352.

- Haupts, U., Tittor, J. & Oesterhelt, D. 1999. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding archaea's photosynthetic apparatus. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28: 367–399.
- He, X. *et al.* 2010. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. Nature 467: 991–994.
- Hess, B. 2008. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. J. Chem. Theory Comput. 4(1):116–122.
- Huang, Y., Chen, W., Dotson, D.L., Beckstein, O. & Shen, J. 2016. Mechanism of pH-dependent activation of the sodiumproton antiporter NhaA. Nat. Commun. 7(1): 12940.
- Jin, Y., Nair, A. & van Veen, H.W. 2014. Multidrug transport protein NorM from *Vibrio cholerae* simultaneously couples to sodium- and proton-motive force. J. Biol. Chem. 289: 14624– 14632.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Buckner, J.K. & Madura, J.D. 1986. Computer simulations of organic reactions in solution. Ann. N. Y. Acad. Sci. 482: 198–209.
- Kamiya, N., Kayanuma, M., Fujitani, H. & Shinoda, K. 2020. A new lipid force field (FUJI). J. Chem. Theory Comput. 16(6): 3664–3676.
- Lee, C. *et al.* 2014. Crystal structure of the sodium-proton antiporter NhaA dimer and new mechanistic insights. J. Gen. Physiol. 144(6): 529–544.
- Lu, M., Symersky, J., Radchenko, M., Koide, A. & Guo, Y. 2013. Structural insights into H⁺-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. Nat. Struct. Mol. Biol. **20**: 1310–1317.
- Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. J. Bacteriol. 186 (20): 6681-6688.
- Matsui, Y. *et al.* 2002. Bacteriorhodopsin: Structural studies in lipid membranes and crystals. J. Mol. Biol. **324**: 469–481.
- Nango, E. et al. 2016. A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. Science 354: 1552–1557.
- Neutze, R. *et al.* 2002. Bacteriorhodopsin: A high-resolution structural view of the archaeal photoreceptor. Biochim. Biophys. Acta **1565**: 144–167.
- Nosé, S. 1984. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. Mol. Phys. **52**(2): 255–268.
- Parrinello, M. & Rahman, A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. J. Appl. Phys. 52(12): 7182–7190.
- Parsons, J.B. & Rock, C.O. 2013. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. Prog. Lipid Res. **52**(3): 249–276.
- Schmidt, T.H. & Kandt, C. 2012. LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. J. Chem. Inf. Model. 52: 2657–2669.
- Wennberg, C.L., Murtola, T., Páll, S., Abraham, M.J., Hess, B. & Lindahl, E. 2015. Direct-space corrections enable fast and accurate lorentz-berthelot combination rule Lennard-Jones lattice summation. J. Chem. Theory Comput. 11 (12): 5737– 5746.
- Wickstrand, C., Dods, R., Royant, A. & Neutze, R. 2015. Bacteriorhodopsin: Structural insights from X-ray and electron crystallography. Biochim. Biophys. Acta 1850: 536–553.
- Zhang, Y.M. & Rock, C.O. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 6(3): 222–233.

チラコイド膜局在性イオンチャネルの 電気生理学的解析と生理的役割の検討

浜本 晋,川崎 寿

東京大学大学院農学生命科学研究科附属アグロバイオテクノロジー研究センター 微生物膜輸送工学寄付講座 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Thylakoid membrane localized ion channel involved in photosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Shin Hamamoto, Hisashi Kawasaki

Laboratory of Microbial Membrane Transport Engineering Agro-Biotechnology Research Center Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo, 113-8657, Japan

Studies on transporters that localize to the thylakoid membrane and are involved in regulating photosynthetic activity have been limited to transport proteins in *Arabidopsis thaliana*. These transporters have all been shown to regulate photosynthetic activity under fluctuating light conditions. However, there are very few reports of transport proteins involved in photosynthetic activity in cyanobacteria. In this study, we focused on the functional analysis of the ion channel Stc1, which localizes to the thylakoid membrane of the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. The $\Delta stc1$ strain showed retarded growth and significantly reduced photosynthetic activity under low concentrations of K⁺, suggesting that it causes abnormalities in electron transfer after PSII in the photosynthetic electron-transfer chain. Furthermore, electrophysiological analysis using patch-clamp assay in *E. coli* mutants expressing *stc1* revealed its ion transport activity. This study clarified the detailed transport activity and physiological role of Stc1 The photosynthetic activity of the $\Delta stc1$ strain was significantly reduced. So far, no ion transport protein, except H⁺ translocating proteins, has been reported to play such an important role in photosynthetic activity in plant and cyanobacterial photosynthesis studies. In the long history of photosynthesis research, the protein molecules that appear in photosynthetic reactions seemed to be almost completely clarified, however, Stc1 was shown to be a new molecule to add to the list.

Key words: Photosynthesis, thylakoid membrane, ion transport protein, Synechocystis sp. PCC 6803

緒 言

光合成は,酸素と炭水化物を生成する地球上で最も重 要な代謝反応の一つである.光エネルギーが吸収され.

E-mail: 浜本	晋 : uhamamoto@g.ecc.u-tokyo.ac.jp				
川崎	寿	: ukaw	asaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp		
共同研究者:	神保	春彦	(埼玉大学大学院理工学研究科)		
	田中	寛	(東京工業大学,科学技術創成研究院)		
	前田	海成	(東京工業大学,科学技術創成研究院)		
	田野井	慶太朗	(東京大学大学院農学生命科学研究科)		
	濡木	理	(東京大学大学院理学系研究科)		
	萩野	達也	(東京大学大学院理学系研究科)		

葉緑体のチラコイド膜で電子伝達反応を駆動することに よってATPに変換される(Allen, 2002). 光エネルギー を利用する明反応では、光化学系II(photosystem II: PSII)が光エネルギーによって励起され、水分子を酸 素とH⁺と電子へと分解して酸素分子を発生させる. 電 子とH⁺を受け取ったプラストキノンが還元型のプラス トキノールになり、PSIIから離れた後にシトクロムb₆f 複合体へと電子を運ぶ.次に、電子はプラストシアニン によって光化学系I(photosystem I: PSI)に運ばれる. 次に電子は、フェレドキシンに受け渡されてフェレドキ シンNADP還元酵素がNADP⁺を還元してNADPHを生 産する. この一連の電子伝達反応では、水の酸化による H⁺のチラコイド内腔への放出、シトクロム $b_{6}f$ 複合体に よるチラコイド内腔へのH⁺の輸送により生じたチラコ イド膜を隔てたH⁺駆動力(*pmf*)を利用してATP合成 酵素はADPからATPを生成する.H⁺は電荷を持つた めに、H⁺の濃度勾配(Δp H)と膜電位($\Delta \psi$)の二つの 成分が生じる.この二つの成分の和が*pmf*となり、ミッ チェルによって提唱された化学浸透圧説におけるATP 合成 酵素を介したATP合成を駆動する(Mitchell, 1961).

植物にとって光エネルギーによる pmfの形成は重要で あるが、強光環境下では活性酸素種(ROS)の発生や チラコイド内腔の ΔpHの過剰な上昇が要因となる光化 学系の障害(光阻害)を受ける(Pospíšil, 2009). 植物は、 光阻害を避けるために、余剰なエネルギーを熱放散に よって消費する非光化学的消光(non-photochemical quenching: NPQ)などの防御システムを獲得した (Müller et al., 2001). チラコイド内腔へのH⁺の汲み上 げによる内腔の酸性環境はNPQを促進させるため、 pmfは主に ΔpHによって形成されて、光強度の変動に対 する光合成の迅速な対応を可能にしている(Johnson & Ruban, 2014).

シロイヌナズナのイオン輸送体遺伝子の変異株を用い た研究により、*bmf*を形成する ΔpHと Δwの割合を制御 することによりイオン輸送体が NPQ の調節に寄与して いることが報告されている.H⁺をチラコイド内腔に輸 送するのと同時にK⁺をストロマに輸送するK⁺/H⁺対向 輸送体 Kea3 は、強光から弱光への変動光環境において、 Awを上昇させることにより光合成における光利用効率 を促進させることが知られている(Armbruster et al., 2014; Wang et al., 2017). 陰イオン輸送体の Bestrophin ファミリーに属する膜電位依存性 CI チャネル AtVCCN1 も変動光環境において光合成の制御に関わっているイオ ン輸送体と考えられている.弱光から強光への変化時に $\Delta vccn$ 株は野生株よりもpmfにおける Δw の割合が高く. NPQ が低下してしまい, その結果として PSII が光阻害 されることが報告されている(Herdean et al., 2016; Dukic et al., 2019). これらより, VCCN1は素早く Cl をチラコイド内腔に輸送することにより, Δψを低下さ せながらも ΔpHを上昇させて NPQを促進する役割を 担っていると考えられる、このように、チラコイド膜に 発現して光合成活性に関わるイオン輸送体が見出されて きた一方で、存在が示唆されながらもイオン輸送体本体 の同定に至っていない例もある.光の照射によりチラコ イド内腔からストロマに K⁺が放出される現象が報告さ れている (Hind et al., 1974). さらに、シミュレーショ ンによってチラコイド内腔からストロマへの K⁺の輸送 の必要性が示唆されている (Li et al., 2021).

シロイヌナズナと同様に光合成研究のモデル生物であ るラン藻 Synechocystis sp. PCC 6803 を対象とした光合成 に関わるイオン輸送体の研究は行われているが,シロイ スナズナと比較して報告例は非常に少ない. Synechocystis sp. PCC 6803のK⁺チャネル SynKは,細胞 膜とチラコイド膜の両方への発現,動物細胞を発現系に 用いた活性測定によりK⁺の輸送活性が確認されている. ΔpHの形成への寄与が示唆されているが,その度合い はあまり大きくはない (Checchetto et al., 2012; Zanetti et al., 2010).本研究では,Synechocystis sp. PCC 6803に おいて光合成活性の調節に明確に関わっている新規のイ オン輸送体を同定し,局在性の同定,電気生理学的な機 能解析方法によるイオン輸送活性などの分子機構の詳細 を明らかにすることを目指した.

実験方法

△stcl 株と stcl:his-tag 発現株の作製

Δstc1株の作製を目的に、相同組換えによるstc1遺伝 子のクロラムフェニコール遺伝子への置換を行った. stc1の開始コドンから上流100bpと終止コドンから下流 100bpをPCRで断片作製後にクロラムフェニコール耐 性遺伝子を両断片の間に挟み込むプラスミドを作製し た.プラスミドDNAと細胞の混合液をBG11寒天培地 に塗布して24時間、50µmol photons m⁻²s⁻¹の光強度で 培養後に菌をクロラムフェニコールを含むBG11寒天培 地に移してstc1遺伝子破壊株を選抜した(Jimbo et al., 2018). Stc1:his-tag発現株の作製のためにstc1遺伝子の 終止コドンの一つ前のコドンから上流100bpと終止コ ドンから下流100bpをPCRで断片作製後にHis-tagとカ ナマイシン耐性遺伝子を両断片の間に挟み込むプラスミ ドを作製した.遺伝子破壊株の作製と同様の操作を行い stc1:his-tag発現株を選抜した.

Synechocystis sp. PCC 6803 を用いた生育実験

Synechocystis sp. PCC 6803 の培養には BG11 液体培地 を用いたが (Jimbo et al., 2018), WTと Δ stc1 株の比較に は次の変更を行った. BG11 液体培地に含まれる K₂HPO₄ を Na₂HPO₄ に置換して K⁺ を除いた BG11-K 培地に異な る濃度の KCl を添加した. 外気を滅菌フィルターを通 すことで通気した. 光強度はレフランプを使用して 70 µmol photons m⁻² s⁻¹で培養した.

光合成活性の測定

BG11 培地を用いて培養した野生株と Astc1 株を集菌 し,酸素電極を用いて酸素の発生する速度を計測するこ とで光合成の各パラメーターを算出した (Jimbo et al., 2021).純光合成速度(Net)の測定には1mM NaHCO₃ を添加し, PSIIから PSIを通ってルビスコによる炭酸 固定までの電子が流れる速度を測定した.PSII活性測 定においては,10µM p-ベンゾキノンを添加することに より,PSIIのみの活性を測定した.電子伝達速度(ETR) の測定では,電子受容体であるメチルビオロゲンが PSI から電子を受け取り,酸素へ電子を伝達する際に活性酸 素となって消費される酸素を測定した.

K⁺ 取込み能を欠損した大腸菌遺伝子破壊株の作製

大腸菌 W3110 株のゲノムに存在する4個のK⁺取込 み輸送体遺伝子(*kdpA*, *kup*, *trkG*, *trkH*)をRed/ET相 同組換え法(Muyrers *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998)に 準じた Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit (Gene Bridges 社)を用いて行った.遺伝子破壊を目指す遺伝 子の50bp上流と50bp下流をホモロジーアームとし、 その配列を付与したプライマーを用いてカナマイシンカ セットを PCRで増幅して W3110株に導入した.次に、 カナマイシン遺伝子の両端に存在する Flp recognition target (FRT)配列を認識する組換え酵素である flippase (FLP)を発現するベクターを導入してカナマイシン遺 伝子を染色体上から除去した.この操作を繰り返すこ とにより4個のK⁺取込み輸送体遺伝子の破壊株を作製 した.

K⁺ 取込み能欠損株を用いた生育相補実験

大腸菌を用いた K⁺ 取込み実験は、一部改変しながら 既報に従って行った (Tholema *et al.*, 1999). K⁺ 取込み能 欠損株に輸送体遺伝子発現ベクターを導入して 25 μ g/ml カナマイシンと 30 mM KCl を添加した最少液体培地 (46 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄, 8 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM MgSO₄, 6 mM FeSO₄, 10 μ g/ml thiamine, 1 % glucose) を用いて 30 ° で一晩前培養した. OD₆₀₀ = 0.05 となるように植え継いで 25 μ g/ml カナマイシンと 30 mM KCl を添加した最少液体培地を用いて 24 時間本 培養を行った. 集菌した菌を KCl を含まない最少培地に 懸濁してから遠心を行い、上清を取り除いた. この操作 を 2 回繰り返した後に、菌を OD₆₀₀ = 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 の希釈系列を調製し、 25 μ g/ml カナマイシンと 30 mM KCl を添加した最少寒天培地にスポットした.

K⁺取込み能欠損株を用いた取込み実験

本培養までは上述と同じ操作を行った.集菌したサン プルを OD₆₀₀=3.0 となるように 150mM Tris-HCl pH 7.5 のバッファーを用いて懸濁し,室温で 30 分振盪培養し た.10mM glucose を添加した 10 分後に 10mM KCl を 添加した.0, 10, 30, 60 分毎に 1ml をサンプリングした. サンプルは、予め200μlのシリコンオイルを分注した 1.5mlチューブに入れて1分遠心し、菌とバッファーを 分離した.遠心後、上清を除去して1mlの滅菌水を加 えて遠心した.再び1mlの滅菌水を加えて遠心を行い、 上清とシリコンオイルを除去した.ペレットを硝酸に懸 濁した後に誘導結合プラズマ質量分析法(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: ICP-MS)を用い てK^{*}含有量を定量した(Ogura *et al.*, 2020).

巨大化大腸菌の調製

大腸菌の巨大化操作は、一部改変しながら既報に従っ て行った (Kuroda *et al.*, 1998). K^{*}取込み能欠損株を 25µg/mlカナマイシンを添加した KLB 培地 (1% (w/v) trypton, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) KCl) を用いて対数増殖期である OD₆₀₀=0.8 まで培養して集菌 し、リゾチーム処理を行ってスフェロプラストを調製し た.次に、終濃度 800µg/ml アンピシリン、25µg/ml カ ナマイシンを添加した GP 培地 (2.75% Trypticase Soy Broth without Dextrose, 10mM MgSO₄, 300mM sucrose, 50mM KCl) を用いて大腸菌スフェロプラストを12時 間培養して巨大化大腸菌を調製した.

巨大化大腸菌を発現系とした Stc1 のパッチクランプ測定

パッチクランプ法は既報に従って測定した (Hamamoto et al., 2008; Hamamoto et al., 2015; Hamamoto et al., 2018; Yabe et al., 1999). 巨大化大腸菌を 700×g で集菌して上 清を取り除いてから100山のGP培地で懸濁した.バッ $7 = (100 \text{ mM KCl}, 10 \text{ mM MgCl}_2, 200 \text{ mM sorbitol})$ 20mM Tris-Mes pH 7.5) で満たされたチャンバーに 20山の巨大化大腸菌懸濁液を加えて5分静置した. 巨 大化大腸菌が洗い流されない流速でチャンバー内をバッ ファーで洗浄して死菌などの残渣を除去し、チャンバー 上部までバスバッファーでチャンバーを満たした.次に、 ガラスマイクロピペット作製装置にガラスキャピラリー をセットして、先端径が1-2µmのパッチ電極(パッチ ピペット)を作製した. パッチピペット内にバス前述の バッファーを充填した. パッチピペットを穏やかに巨大 化大腸菌の原形質膜に接触させてからパッチピペット内 に陰圧を発生させて原形質膜と密着させた. パッチピ ペット内と細胞外液膜の間の漏れ抵抗が1GΩ以上であ ることを確認したのちに 10 msec, 2 volts の電圧を印加 してパッチピペット先端の膜を破って穴を空け、ホール セル法によるパッチクランプ測定を開始してイオン輸送 体由来の電流を計測した.

植物細胞のプロトプラストを用いた一過的遺伝子発現に よる膜タンパク質の局在性解析

短日条件(明期8時間,暗期16時間)で生育した 4週齢のシロイヌナズナCol-0のロゼッタ葉を6枚切り 取り酵素処理を行いプロトプラストを調製した(Yoo *et al.*, 2007). プロトプラスト懸濁液を80 μ m幅のナイロン メッシュを用いて濾過後に通過画分を100×g,5分,遠 心して上清を除去した.沈澱したプロトプラストを洗浄 バッファー(2mM MES pH 5.7, 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5mM KCl)で2回洗浄した.プロトプラストを 40 μ gのプラスミドを含むDNA-PEG 溶液(30%(w/v) PEG4000, 0.2 M mannitol, 100 mM CaCl₂)に懸濁して15 分室温で静置した.洗浄バッファーで2回洗浄して DNA-PEG 溶液を取り除き,プロトプラストを回復バッ ファー(4mM MES pH 5.7, 0.5 M mannitol, 20 mM KCl) に懸濁した.室温で24時間静置して*AtVCCN1:mGFP* 遺 伝子を発現した.

Protease protection assay

AtVCCN1:mGFPを発現したプロトプラストを低浸透 Eバッファー(50mM HEPES pH 7.6, 7mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 2mM EDTA, 30mM KCl, 0.25mM KH₂PO₄, 20mM DTT, 0.2% (w/v) BSA) に懸濁することでプロトプラス トを破裂させて葉緑体を取り出した. 葉緑体懸濁液にア ルギニルエンドペプチダーゼ (Arg-C) を添加して 60 分間静置した後に 20mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えて反応を停止した. AtVCCN1:mGFP 由来の蛍光シグナルを蛍光顕微鏡を用いて撮影し, ImageJソフトウェアを使用してシグナル強度の解析を 行った. さらに, Arg-C処理した葉緑体をSDS-sample loading バッファーに懸濁してSDS-PAGEを行い, ウェ スタンブロットによりAtVCCN1:mGFPを抗GFP抗体 を用いて検出した.

結果および考察

Stc1の Synechocystis sp. PCC 6803 における生理的役割の 検討

Stc1は、多くの生物種に保存されている陰イオン輸 送体の Bestrophin ファミリーと相同性が見られるが, Bestrophin ファミリーに属しながらも Klebsiella pneumoniae のKpBest1は陽イオンを輸送することから (Yang et al., 2014). Stc1の輸送イオン種を一次配列から予測するこ とは困難である. Stc1の Synechocystis sp. PCC 6803 にお ける生理的役割を明らかにするため、染色体上のstc1に クロラムフェニコール遺伝子を挿入した遺伝子破壊株を 作成して表現型の観察を行った. BG11 培地の K*を取り 除いた BG11-K 培地に低濃度の KCl (論文投稿中のため、 濃度不記載)を添加して培養したところ,WTは正常な 生育が見られたが Δstc1 の生育は WTと比較して非常に 遅くなった. BG11-K培地に高濃度のKClを添加したと ころ Δ*stc1* の生育は WTと同等に回復した(Fig.1). こ のことから, Stc1 が細胞外からの K⁺ もしくは CI⁻の取 り込み、または細胞質内のK⁺もしくはCI⁻のチラコイ





(A) Schematic diagram of the construction of the $\Delta stc1$ knock-out strains. The arrows represent the positions of the PCR primers used to verify Cm^r correct insertion. Agarose electrophoresis of PCR product. Genomic DNA from WT (left) and mutant (right) strains was the template for the PCR reaction. (B) Culture of WT and $\Delta stc1$ under 70 µmol photons m⁻² s⁻¹ and photos were taken at 72 hr.

ド内への輸送を担っていることが推察された. これまで に Synechocystis sp. PCC 6803の細胞膜に発現して K⁺の 取込みに関わる輸送体として Kdp と Ktr が報告されて おり (Buurman et al., 1995; Durell et al., 2000), これら の輸送体が既に細胞膜に発現して K⁺の取込みを行って いることから, Stc1が細胞外からの K⁺の取込みに関わっ ている可能性は低く, Stc1のチラコイド膜への機能的 な発現が推察された.

Stc1の細胞内の局在性解析

Stc1の Synechocystis sp. PCC 6803 における細胞内局在 性を明らかにするため、膜画分を調製してウェスタンブ ロット法による Stc1の検出を試みた. 染色体上の stc1 の3'末端にHis-tag 配列とカナマイシン耐性遺伝子を挿 入した形質転換体を獲得した.次に,形質転換体由来の 膜画分を調製して抗 His-tag 抗体を用いてウェスタンブ ロット法を行ったところ, Stc1:Hisのバンドをチラコ イド膜画分のみから検出した (Fig.2). stc1:his は stc1 自身のプロモーターから転写されており、バンドのシグ ナルが非常に弱かったことから stc1 の発現レベルは非常 に低く制御されていると考えられた. stc1:His 発現株の 作製では、検出を容易にするために stc1 本来のプロモー ターを過剰発現プロモーターに置換した過剰発現株の作 製も試みたが、組換え体の獲得には至らなかった. 過剰 に存在したStc1のタンパク質量が細胞に毒性を示した のか,過剰に発現した Stc1の機能が生育を妨げたのか は不明である. これらから, Stc1 はチラコイド膜のみ に発現し, 適切な発現量に調節されていることの重要性 が示唆された. Stc1 はチラコイド膜に局在しているこ とが示され, Stc1 の植物におけるホモログ輸送体であ る VCCN1 と同様にチラコイド膜に局在してイオン輸送 を行うことにより pmfの制御に関わっている可能性が推 察された.

△stc1 株を用いた光合成活性の測定

Stc1のチラコイド膜への特異的な局在性が明らかと なったことと Stc1のホモログタンパク質である VCCN1 が植物葉緑体のチラコイド膜へ局在性を示すことから. Stc1の光合成活性への影響を検討した (Fig.3). BG11-K 培地に懸濁した WTと Δstc1 株それぞれの光合 成活性を酸素電極を使用して測定した. KClを含まない BG11-K 培地では、Astc1の純光合成活性とETR がWT と比較して極めて低い値を示した. ところが高濃度の KClを添加したところ ∆stc1 の純光合成活性と ETR が WTと同等にまで回復した.一方で、PSIIの活性はWT と Astc1 ともに KCl の有無に関わらずほぼ同じ値を示し た. このことから. Stc1 はチラコイド膜に発現して光 合成活性の調節に関わっていることが示された. さらに, ∆stc1ではPSIIの活性に大きな影響は見られなかったこ とから、PSII 以降の電子伝達系に関わっていることが 示唆された.



Fig.2 Localization of Stc1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
(A) Schematic diagram of the construction of the *stc1:His* strains. The arrows represent the positions of the PCR primers used to verify the correct insertion of *His:tag* and *Km^r* at the 3' end of *stc1*. Agarose electrophoresis of PCR product. Genomic DNA from WT (left) and *stc1:his* (right) strains was the template for the PCR reaction. (B) Western blotting analysis of subcellular fractions isolated from *stc1:his* expressing strain. Each lane was loaded with 30 μg protein and probed with the antibodies indicated. Thylakoid membrane (T), plasma membrane (P), soluble (S).



Fig.3 Differences in the photosynthetic efficiency phenotype between WT and $\triangle stc1$.

Total photosynthetic activity, electron transfer rate (ETR), PSII activity were measured under $1500 \,\mu$ mol photons m⁻² s⁻¹.

K⁺ 取込み能欠損大腸菌変異株を用いた Stc1の機能解析

Synechocystis sp. PCC 6803 を用いて Stc1 の機能解析を 行うには、Stc1の機能を維持した状態でチラコイド膜 のみを単離する必要性がある. また. バックグラウンド 活性を排除するためにはチラコイド膜に存在する Stc1 以外の類似したイオン輸送体の遺伝子破壊株の作製が必 要であるが、それらのイオン輸送体の情報が不足してい るため遺伝子破壊株の作製は非常に難しい. 真核細胞に は細胞膜以外に細胞内小器官の生体膜が存在するため異 種発現させた膜タンパク質が細胞膜に発現しないことが あるが、原核生物である大腸菌では発現させた膜タンパ ク質は高い確率で原形質膜に発現する (Uozumi, 2001). これらの知見をもとに、本研究では大腸菌を異種発現系 とした実験により Stc1の機能解析を試みた (Fig.4). 大腸菌原形質膜には四つのK⁺取込み輸送体KdpABC, KUP, TrkG, TrkH が存在するため(Bossemever et al., 1989; Dosch et al., 1991), これらの輸送体をコードする 遺伝子の多重欠損株を作成し, stc1を導入した. この K⁺ 取込み能欠損株は低K*濃度の培地では生育出来ないが, stc1 発現株は15mM KCl を添加した培地で K⁺ 取込み能 欠損株の生育を相補した. さらに. K⁺の取込み実験を 行ったところ, stc1発現株は空ベクターを導入したコン トロール株よりも多くのK⁺の取込みを示した.このこ

とから, Stc1 は大腸菌の原形質膜に機能的に発現して K*を輸送することが明らかとなった.

巨大化大腸菌を用いたパッチクランプ測定

電気生理学的解析手法の一つであるパッチクランプ法 は、イオン輸送体のイオン選択性や膜電位依存性の解析 などが可能であり、生育相補実験や取込み実験などでは 困難なイオン輸送体の詳細な機能解析が可能である (Erwin Neher and Bert Sakmann, 1976). しかし、大腸 菌はパッチクランプ測定に用いるパッチ電極(パッチピ ペット)よりも細胞サイズが小さく、細胞膜外に細胞壁 が存在し、さらに膜が脆弱であることから従来のパッチ クランプ法の適用が困難であった. そのため、本寄付講 座が独自に改良した装置と微生物細胞の培養法を用いた 改良型パッチクランプ法を用いて巨大化大腸菌に発現し た Stc1 の電気生理学的機能解析を行った (Fig.5). バ スバッファー(細胞外液)とピペットバッファーは共に 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 300mM sorbitol, 20mM Tris-Mes pH 7.5 のバッファーを用いて-80mVから 80mVまで電圧を印加したところ, stc1発現株はコント ロール株よりも大きな電流を検出した (Fig.6). Stc1 由来のイオン電流は正と負の両方向への電流を示し. 膜 電位依存性は見られなかった。次に、イオン選択性を検



Fig.4 Complementation of the K⁺ uptake-deficient *E. coli* strain by Stc1.

(A) Spot assay with *E. coli* $\Delta 4$ strains harboring empty vector (EV), Stc1 or the *Arabidopsis* K⁺ channel KAT1 on synthetic solid medium containing 0, 15 or 30 mM KCl. Tenfold serial dilutions of cell suspensions from 10^{-2} to 10^{-6} were spotted and grown at 30°C for 48hr. (B) 5mM KCl was added at *t*=0min, and the K⁺ content of the cells was measured.



Fig.5 Preparation of giant E. coli cell.

(A) Schematic diagram of giant cell preparation. (B) Images of normal cells and giant cells of *E. coli* cells. Panel a, normal-sized cell expressing Stc1; panel b, giant *E. coli* cells expressing Stc1; panel c, patch pipette attached to giant *E. coli* cell; panel d, schematic diagram of patch-pipette attached to the giant cell.



Fig.6 Patch clamp assay on Stc1 expressed in giant *E. coli* cells. Whole-cell current elicited by a series of voltage steps ranging from -80 to 80mV in 20-mV steps recorded in symmetrical 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM Tris-MES pH 7.5, 300mM sorbitol.



Fig.7 Ion selectivity of Stc1.

Whole-cell current elicited by a series of voltage steps ranging from -80 to 80 mV in 20-mV steps recorded in symmetrical 100 mM KCl (\bigcirc or \square), then the experiment was repeated after replacement of the cytosolic KCl with 30 mM KCl (\bigcirc or \blacksquare). The pipette solution contained 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-MES pH 7.5, 300 mM sorbitol.

討するため、ピペットバッファーは前述のままバスバッ ファーの組成を30mM KCl(他は同じ)に置換した (Fig.7). stc1発現株において電流の向きが逆転する逆 転電位が-7.7mVにシフトした.一方、コントロール株 では逆転電位のシフトは-3.0mVに留まった. stc1発現 株はコントロール株と比較して、陰イオンよりも陽イオ ンに対する選択性が高いことを示す結果となった. 陽イ オンのみを選択的に輸送する輸送体では、シフト幅の理 論値は約-30mVであることを考慮すると. Stc1は陽イ オンに対する選択性が高いが陰イオンに対する輸送活性 もあることが示された. Stc1のホモログ輸送体である Klebsiella pneumoniaeの KpBest1 では、イオン選択フィ ルターと推測されるアミノ酸をイソロイシンからアルギ ニンへ置換することによりイオン選択性が陰イオンから 陽イオンに変わることが報告されている (Yang et al., 2014). Stc1 のイオン選択性が厳格に制限されていない ことは、このような過去の知見と何らかの関係性がある と思われる.

チラコイド膜局在性陰イオンチャネル AtVCCN1 の配向 性解析

シロイヌナズナのチラコイド膜に局在する AtVCCN1 は、膜電位依存性の陰イオンチャネルであり、弱光から 強光への変動時に Δψの上昇を抑えることにより、PSII への光阻害を防ぐことが報告されている. AtVCCN1 は 哺乳類に広く保存されている陰イオンチャネルである Bestrophin ファミリーに属しているが相同性は低く、哺 乳類 Bestrophin には存在しない N 末端領域が確認され

ている.AtVCCN1は、人工脂質膜を用いた機能解析例 のみであり、またその配向性が明らかになっていなかっ たため、チラコイド膜のどちらの方向に CI を輸送する のか不明であった.本研究では、AtVCCN1:mGFP 遺伝子 の植物細胞の葉緑体への一過的発現と protease protection assay を組み合わせることにより、チラコイド膜におけ る AtVCCN1 の配向性の決定を目指した. 葉緑体の包膜 は極めて脆弱であるため、遠心操作の繰り返し等により 容易に包膜が損傷して透過性が増し、外部から投与した 化合物やタンパク質がストロマに辿り着くことが知られ ている.この知見をもとに、AtVCCN1:mGFP 遺伝子を 発現するプロトプラストから単離した葉緑体をArg-Cを 用いた protease protection assay を行った (Fig.8). Arg-C 処理後に蛍光顕微鏡で GFP シグナルを観察した ところ、GFPシグナルの低下が観察された. さらに、 異なる濃度のArg-Cで処理したところ,濃度の上昇に 伴い GFP シグナルが低下した.抗 GFP 抗体を用いた ウェスタンブロットも同様にArg-Cの濃度に依存した GFP 量の減少が見られた. このことから, AtVCCN1の C末端はストロマ側に露出していることが示された.こ の結果から、AtVCCN1のN末端領域とC末端領域はス トロマ側に位置することが示された. 負電荷の多い領域 がチラコイド内腔(細胞の外に該当)に運ばれ、正電荷 の多い領域はストロマ(細胞質に該当)に位置するポジ ティブインサイドルールが葉緑体チラコイド膜にも当て はまることが推測されていたが(Gavel et al., 1991; Heijne, 1992),本研究により実験的に正しいことを実証 した.



Fig.8 Topology evaluation of VCCN1 in chloroplasts.

(A) Quenching level of GFP fluorescence with or without Arg-C treatment for 60min. GFP signals were detected with a fluorescent microscope. The GFP signal was normalized with the chlorophyll autofluorescence signal.
(B) Western blotting analyses of AtVCCN1:mGFP and thylakoid luminal marker PsbO, with or without Arg-C treatment. AtVCCN1:mGFP and PsbO were immunoblotted by an anti-GFP antibody and an anti-PsbO antibody, respectively.



Fig.9 Possible physiological role of Stc1 in thylakoid membrane in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ion transport activity of Stc1 accelerates the electron transport rate after PSII.

要 約

チラコイド膜に局在性を示して光合成活性の制御に関 わる輸送体研究は、シロイヌナズナの輸送体を対象とし た研究に限られており、これまでに複数の輸送体につい て報告が行われている.これらはいずれも光の強度が変 動する光環境ストレス下において光合成活性の調節を担 うことが示されていた.本研究では、シロイヌナズナと 同様に光合成研究のモデル生物であるラン藻 Synechocystis sp. PCC 6803 のチラコイド膜に局在性を示すイオン輸送 体 Stc1 の機能解析を中心に行った. Δstc1 株は,低濃度 のK⁺環境下では生育が遅延するのと同時に光合成活性 が著しく低下し,電子伝達系の PSII 以降の電子伝達に 異常を生じさせていることが示唆された(Fig.9).さ らに,Stc1 を発現した大腸菌変異株を使用したパッチ クランプ測定による電気生理学的解析も行い,そのイオ ン輸送活性も明らかにした.ラン藻において光合成活性 に関わる輸送体の報告例は極めて少ないなかで本研究で は詳細な輸送活性と生理的役割を明らかにした. Δstc1 株では光合成活性が著しく低下したが,植物・ラン藻の 光合成研究においてこれ程までに光合成活性に重要な役 割を担うイオン輸送体はH⁺輸送を担うシトクロムb₆fと ATP 合成酵素以外には報告されていない.長い光合成 研究の中で,光合成反応に登場するタンパク質分子はほ ぼ明らかになったように思われていたが,Stc1 は新た な分子として加わることが示された.

本研究で得られた研究成果の報告

口頭発表

 浜本 晋,神保 晴彦,田野井 慶太朗,田中 寛,川崎 寿. 2024. Synechocystis sp. PCC 6803の光合成に関わるイオン輸送体の解析. 2024年度日本農芸化学会大会 (3月24-27日,東京.)

原著論文

- Hagino, T., Kato, T., Kasuya, G., Kusakizako, T., Hamamoto, S., Sobajima, T., Fujiwara, Y., Yamashita, K., Kawasaki, H., Maturana, A., Nishizawa, T., and Nureki, O. Cryo-EM structures of thylakoid-located voltage-dependent chloride channel VCCN1. 2022. Nat. Commun. 13, 2505
- Hamamoto, S., Jimbo, H., Maeda, K., Tanoi, K., Tanaka, K., and Kawasaki, H. Thylakoid membrane localized ion channel involved in photosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. (unpublished)

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所寄付講座助成金(平 成30年10月~令和6年3月)により行われたもので、 ここに感謝の意を表します.また本研究の一部は科研費 基盤研究C(22K05425)による研究助成により行われた. この場をお借りし深く感謝いたします.

文 献

- Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP— Electrons, proton pumps, rotors, and poise. Cell 110, 273–276.
- Armbruster, U., Carrillo, L. R., Venema, K., Pavlovic, L., Schmidtmann, E., Kornfeld, A., Jahns, P., Berry, J. A., Kramer, D. M. & Jonikas, M. C. 2014. Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments. Nat. Commun. 5, 5439.
- Bossemeyer, D., Schlosser, A. & Bakker, E. P. 1989. Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system. J. Bacteriol. 171, 2219–2221.
- Buurman, E. T., Kim, K. T. & Epstein, W. 1995. Genetic evidence for two sequentially occupied K⁺ binding sites in the Kdp transport ATPase. J. Biol. Chem. 270, 6678–6685.
- Checchetto, V., Segalla, A., Allorent, G., La Rocca, N., Leanza, L., Giacometti, G. M., Uozumi, N., Finazzi, G., Bergantino, E.

& Szabò, I. 2012. Thylakoid potassium channel is required for efficient photosynthesis in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 11043–11048.

- Dosch, D. C., Helmer, G. L., Sutton, S. H., Salvacion, F. F. & Epstein, W. 1991. Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: evidence for three constitutive systems mediating uptake potassium . Genetic Analysis of Potassium Transport Loci in *Escherichia coli*: Evidence for Three Constitutive Systems Mediating Up. J. Bacteriol. 173, 687-696.
- Dukic, E., Herdean, A., Cheregi, O., Sharma, A., Nziengui, H., Dmitruk, D., Solymosi, K., Pribil, M. & Spetea, C. 2019. K⁺ and Cl[−] channels/transporters independently fine-tune photosynthesis in plants. Sci. Rep. 9, 8639.
- Durell, S. R., Bakker, E. P. & Guy, H. R. 2000. Does the KdpA subunit from the high affinity K⁺-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K⁺ channels? Biophys. J. 78, 188–199.
- Gavel, Y., Steppuhn, J., Herrmann, R. & G., von H. 1991. The "positive-inside rule" applies to thylakoid membrane proteins. FEBS Lett. 282(1), 41–46.
- Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., Higashi, K., Igarashi, K., Nakagawa, T., Kuroda, T., Mori, Y., Murata, Y., Nakanishi, Y., *et al.* 2008. Characterization of a tobacco TPK-type K⁺ channel as a novel tonoplast K⁺ channel using yeast tonoplasts. J. Biol. Chem. 283, 1911–20.
- Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J. I. & Uozumi, N. 2015. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. Curr. Opin. Biotechnol. 32, 113–120.
- Hamamoto, S., Mori, Y., Yabe, I. & Uozumi, N. 2018. In vitro and in vivo characterization of modulation of the vacuolar cation channel TRPY1 from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS J. 285, 1–16.
- Heijne, G. von 1992. Protein structure prediction hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. J. Mol. Biol. 225, 487–494.
- Herdean, A., Teardo, E., Nilsson, A. K., Pfeil, B. E., Johansson, O. N., Ünnep, R., Nagy, G., Zsiros, O., Dana, S., Solymosi, K., *et al.* 2016. A voltage-dependent chloride channel fine-tunes photosynthesis in plants. Nat. Commun. 7, 11654.
- Hind, G., Nakatani, H. Y. & Izawa, S. 1974. Light dependent redistribution of ions in suspensions of chloroplast thylakoid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1484–1488.
- Jimbo, H., Yutthanasirikul, R., Nagano, T., Hisabori, T., Hihara, Y. & Nishiyama, Y. 2018. Oxidation of translation factor EF-Tu inhibits the repair of photosystem II. Plant Physiol. 176, 2691– 2699.
- Jimbo, H., Izuhara, T., Hirashima, T., Endo, K., Nakamura, Y. & Wada, H. 2021. Membrane lipid remodeling is required for photosystem II function under low CO₂. Plant J. 105, 245–253.
- Johnson, M. P. & Ruban, A. V. 2014. Rethinking the existence of a steady-state $\Delta \psi$ component of the proton motive force across plant thylakoid membranes. Photosynth. Res. 119, 233–242.
- Kuroda, T., Okuda, N., Saitoh, N., Hiyama, T., Terasaki, Y., Anazawa, H., Hirata, A., Mogi, T., Kusaka, I., Tsuchiya, T., *et al.* 1998. Patch clamp studies on ion pumps of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 273, 16897–16904.
- Li, M., Svoboda, V., Davis, G., Kramer, D., Kunz, H. H. & Kirchhoff, H. 2021. Impact of ion fluxes across thylakoid membranes on

photosynthetic electron transport and photoprotection. Nat. Plants 7, 979–988.

- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 191, 144–148.
- Müller, P., Li, X. P. & Niyogi, K. K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol. 125, 1558–1566.
- Muyrers, J. P. P., Zhang, Y., Buchholz, F. & Stewart, A. F. 2000. RecE/RecT and Redα/Redβ initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. Genes Dev. 14, 1971–1982.
- Neher, E. & Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260, 799–802.
- Ogura, T., Kobayashi, N. I., Hermans, C., Ichihashi, Y., Shibata, A., Shirasu, K., Aoki, N., Sugita, R., Ogawa, T., Suzuki, H., *et al.* 2020. Short-term magnesium deficiency triggers nutrient retranslocation in *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. 11, 563.
- Pospíšil, P. 2009. Production of reactive oxygen species by photosystem II. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1787, 1151–1160.
- Tholema, N., Bakker, E. P., Suzuki, A., & Nakamura, T. 1999. Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K⁺ and Na⁺ of the Na⁺ dependent K⁺ uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. FEBS Lett. 450, 217–20.

- Uozumi, N. 2001. *Escherichia coli* as an expression system for K⁺ transport systems from plants. Am J Physiol Cell Physiol 281, C733-739.
- Wang, C., Yamamoto, H., Narumiya, F., Munekage, Y. N., Finazzi, G., Szabo, I. & Shikanai, T. 2017. Fine-tuned regulation of the K⁺/H⁺ antiporter KEA3 is required to optimize photosynthesis during induction. Plant J. 89, 540–553.
- Yabe, I., Horiuchi, K., Nakahara, K., Hiyama, T., Yamanaka, T., Wang, P., Toda, K., Hirata, A., Ohsumi, Y., Hirata, R., *et al.* 1999. Patch clamp studies on V-type ATPase of vacuolar membrane of haploid *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 274, 34903–34910.
- Yang, T., Liu, Q., Kloss, B., Bruni, R., Kalathur, R. C., Guo, Y., Kloppmann, E., Rost, B., Colecraft, H. M. & Hendrickson, W. A. 2014a. Structure and selectivity in bestrophin ion channels. Science 80. 346, 355–359.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H. & Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat. Protoc. 2, 1565–1572.
- Zanetti, M., Teardo, E., La Rocca, N., Zulkifli, L., Checchetto, V., Shijuku, T., Sato, Y., Giacometti, G. M., Uozumi, N., Bergantino, E., *et al.* 2010. A novel potassium channel in photosynthetic cyanobacteria. PLoS One 5, 1–10.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. P., & Francis Stewart, A. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. Nat. Genet. 20, 123–128.

2022年度一般研究助成の研究報告

助成期間:2022年4月~2024年3月

制限酵素断片のエンドシーケンシングによる細菌のハイスループット系統解析法の確立

【目的】これまで、病原細菌や薬剤耐性菌の遺伝学的関 連性の評価のために、ゴールドスタンダードとしてパル スフィールドゲル電気泳動法(PFGE)が用いられてき た、現在では次世代シーケンサー(NGS)による細菌 株の全ゲノム解析が PFGE の代替手法として用いられ ることも多い. 一般的に、細菌株の遺伝学的関連性評価 のためには100株以上と多くの細菌株の解析が必要とさ れるが、PFGEではこれら多検体の解析には多くの労力 を要し、再現性がやや低いなどの問題があり、NGS によ る全ゲノム解析では菌株当たりのコストが高く煩雑なデー タ解析が必要とされるといった問題がある.本研究では、 PFGEやNGSによる全ゲノム解析が持つ問題を解消でき る細菌のハイスループット系統解析法の確立を目的とした. 【方法】被検菌として臨床分離大腸菌株75株を用いた. Genbank など公の遺伝子データベースから完全な大腸 菌ゲノム (3,186 配列) を収集し完全長ゲノムデータベー スとした. 完全長ゲノムデータベースから 8,442 の XbaI の切断部位周辺配列(以下,エンドシーケンスとする) を抽出し、データベースを作成した. 被検菌から抽出し た 全 DNA を 制限酵素 Xbal および HaeIII で 消化し得た DNA 断片にバーコード Xbal アダプターおよび HaeIII アダプターを付加した. アダプター特異的プライマーに よって、エンドシーケンスを特異的に増幅した後に、 Nanopore シーケンサーで解析し菌株毎のシーケンス リードを得た。得られたシーケンスリードを用いて作成 したエンドシーケンスデータベースを検索し菌株毎に含まれ るエンドシーケンスを検出した. 菌株毎に検出されたエン ドシーケンスを用い、完全長ゲノムデータベースを検索し、 最も相同性の高いゲノムをエンドシーケンシングの指標ゲノ ム配列 (Indicator genome sequence, 以下 IGS) とした. 【結果・考察】本エンドシーケンシングでは、Flongle セ ル使用時に少なくとも12菌株の同時解析が可能であっ た. データベース作成に用いた大腸菌ゲノムから推定し たXbaIの切断数は20~76カ所(平均36.8カ所)であ るため、想定されるエンドシーケンス数は40~152と なるが、実際にはXbaIは認識配列のメチル化によって、 切断される個所は推定された数よりも少ない、本研究で は、エンドシーケンスデータベースの検索結果から、 depth of coverage の高い順から40 配列を用いて,完全 長ゲノムデータベースを検索し、IGSを同定した.

図1に示したように、検索に用いた40配列のエンド シーケンスとIGSとして決定された大腸菌ゲノムとの一 平井 到

致率は菌株毎に異なり、平均33.3 配列(83.3%)が一致した.また、完全長ゲノムデータベースを検索して得た IGS数も被検菌によって異なっていたが、被検菌75株中、57株(76.0%)は1つのIGSが決定された.



公の遺伝子データベースには多くの大腸菌ゲノムが収 載されているが,配列中に未決定の塩基がない完全な大 腸菌ゲノムはそれほど多くはない.また,偏りもあり遺 伝系統をまんべんなくカバーすることはできていない. そのため,図1Bのように,菌株によっては40配列の エンドシーケンスを用いて検索した際に,最大27件の IGS が得られることもあった.

この点をさらに検証するために、ランダムに選択した 15 菌株について全ゲノム解析を行い、得られた全ゲノム 配列から同様に IGSを検索した.その結果、15 菌株中8 菌株ではエンドシーケンスによって決定された IGSと同 ーの IGS が検出された.その他の菌株についてはエン ドシーケンスによって決定された IGSとは異なる IGS が検出されたが、これら二つの IGS の全ゲノムアライン メントは、転座は確認されるものの、ゲノムの95%以 上が共通であり、同一の遺伝系統である可能性を示した.

細菌の全ゲノム解析による遺伝学的関連性の検討は、 被検菌株間に共通する遺伝子に含まれる一遺伝子多型 (いわゆる SNPs) に着目して行われることが多い. multi-locus sequence typing や phylogenetic grouping な ど複数の遺伝子の配列を用いて行う系統分類法もある が、いずれも細菌株のゲノム全体を対象として行われて いるものではない.この点に関して本研究は、PFGEと 同様に、被検菌株のゲノム全域を対象として、すなわち、 被検菌の遺伝学的にユニークな遺伝子領域も含めて、被 検菌間の遺伝学的関連性を検討できる IGS を同定するこ とが出来る、新たな系統解析法であると考えられる.

多細胞化と性進化のモデル生物群「ボルボックス類」を次世代に伝える

野崎久義

【目的】 「多細胞化と性進化」 研究のモデル系統群である 「ボルボックス類」(図1)の凍結保存株化は世界的に見 てもほとんど実施されていなかった. 即ち. 本生物群の 凍結保存株は UTEX カルチャーコレクションにパンド リナ (Pandorina morum) が4株存在するだけであった. また、本群の凍結保存に関する研究も日本のグループに よるものが2報出版されているだけであった. Mori et al. (2002, Microbiol, Cult, Coll.) は国立環境研究所微生 物保存施設(MCC-NIES)保有のボルボックス類10属 76株の凍結保護剤 DMSO を用いた凍結後の生存を調査 したが、ゴニウム18株中の1株だけが凍結融解後の生 存を示したと報告した. 一方, Nakazawa & Nishii (2012, CryoLetters)は凍結保護剤と凍結容器の改良で本群の 一部で凍結保存の可能性を明らかにしたが、生存率等の 詳細なデータはなく、本手法は凍結保存株の確立には利 用されてはいなかった.従って、本研究課題を開始する 以前は世界的に広まりつつあるボルボックス類の研究の 根幹をなす「培養材料」のほとんどが「継代培養法」で 維持されており、活発な性発現能力または正常な形態形 成能力を持つ培養株は個々の研究者の「日常的努力」に 委ねられている状況であった.

本研究課題では、「多細胞化と性進化」の研究の基盤 を次世代の研究者には伝える目的で、申請者は MCC-NIESにおける凍結保存株の確立を目指す研究を 開始した。



図1 ボルボックス類の多様性と系統,及び全ゲノム情報 を用いた研究.アスタリスクは本研究期間に凍結保 存の研究論文を出版した属を示す.

【方法】本研究では生活環に着目した材料の選定,プロ グラムフリーザーによる2段階凍結法を実施し、Nakazawa & Nishii (2012)の凍結保護剤を使用した.

【結果・考察】ゴニウム (Gonium pectorale) の栄養細胞と 接合子を用いた凍結保存条件の確立(Nozaki et al. 2022. BMC Microbiol.). アストレフオメネの2種 (Astrephomene gubernaculifera, A. perforata)の凍結保存条件の確立に成 功した (Nozaki et al. 2023, BMC Microbiol.). 更に, 球 状の多細胞体が反転(inversion)を経て形成される6属 (パンドリナ, ボルブリナ, ヤマギシエラ, コルマノス ファエラ、プラティドリナ、ユードリナ)および4細 胞性のシアワセモとバシクラミスの合計8属(図1)の 凍結保存条件の検討を実施した。即ち、2mLクライオ チューブを用いた2段階凍結法で、凍結保護剤としては 6% N,N-dimethylformamide, 3% hydroxyacetone, 5% methanol を用いて比較した結果,各属の至適凍結条件 が明らかになり、それぞれの属で0.1%以上(MCC-NIES における凍結保存株の確立条件)のthe most probable number (MPN) 生存率を得た. その結果, MCC-NIES 保有の8属99株中86株(87%)を凍結保存化した(Mori et al.2023, Microb. Resour. Svst.).約2年間実施された 以上の研究の結果、世界的に見ても凍結保存化がほとん ど実施されていなかった多細胞性のボルボックス類10 属のMCC-NIESの156株中111株(71%)を永久凍結 保存株に移行することができた(Nozaki et al. 2022; Nozaki et al. 2023; Mori et al. 2023, Microb. Resour. Syst.).

今後はボルボックスとプレオドリナ(図1)の安定な 至適凍結保存条件を探索する.また,新規培養株の凍結 保存された株を用いることで,「性発現能力の高いボル ボックス類の材料」を常時利用できる状態にする.更に, 陸上植物の祖先的な系統で唯一遺伝子導入系が確立され ている性のモデル微細藻類ヒメミカヅキモに着目した同 様の研究も併せて実施する(図2).





多重微小電極培養装置を用いた未培養電気合成微生物の分離および 電気合成生物カルチャーコレクションの拡充

若 井 暁

【目的】電気エネルギーを直接利用する第三の生命エネ ルギー変換システムが、化学合成(Chemotrophy)、光 合成(Phototrophy)と並ぶ、電気合成(Electrotrophy) という概念で提唱されている.しかしながら、実際の電 気合成生物の報告例は極めて少なく、化学合成生物を電 気的に培養できるという実証例しかない.本研究では、 電気培養装置を用いて電気合成微生物の選択的集積培養 と新規培養装置を用いて電気合成微生物の純粋分離を実 施し、これまでほとんど登録のない電気合成微生物のカ ルチャーコレクションへの拡充を目指した.

【方法】ITO ガラス電極上に 10×10 cm の露出面積を残 してシリコン樹脂でフレームを作成し、この中にゲラン ガムで固形培地(人工海水ベース,炭素源は炭酸イオン) を作成した.固形培地表面に、微生物細胞懸濁液を塗布 し、40本のステンレス製微小電極と銀塩化銀電極を穿 刺し、ポテンショガルバノスタットにより電位を好気的 な微生物の電気培養で実績のある+400 mV に保持して 15℃で培養した(図1).



図1 多重微小電極培養装置の外観

【結果・考察】最初に本培養システムで電子供給が可能 であることを確認するために,既に実験室レベルで従来 型の電気培養(溶液中に電極を浸漬する手法)がされて いる継代培養中の微生物集積培養物(*Thiomicrorhabdus* 属近縁種含む)に適用した.本集積培養物を培地上に塗 布し,構築した多重微小電極培養を実施した結果,目視 可能なコロニー形成は確認できなかったが,微小電極の 一部を装置から外して回収し,DAPIによる染色を行っ た後で蛍光顕微鏡観察を実施した結果,電極表面に微生 物細胞を確認することができた(図2).

次に,実環境サンプルからの電気化学活性微生物の取得を試みた.相模湾の初島沖水深約700mの地点に,

8カ月間浸漬試験を行ったステンレス鋼試験片の微生物 群集構造解析を実施し,腐食していたステンレス鋼試験 片において電気化学活性細菌として知られる Candidatus Tenderia 属に近縁な遺伝子が,相対比で70%まで濃縮 していた.また,当該微生物遺伝子の濃縮は,腐食が進 行するアノードよりも腐食部周辺の健全なステンレス鋼 表面で見られるため,アノード反応(金属のイオン化) から供給された電子を本菌がエネルギー源として利用す ることで,本菌が集積したと考えられる.

次に、この深海で腐食したステンレス鋼の表層に形成 されているバイオフィルムの一部を拭い取り、人工海水 に懸濁した後、固形培地上に塗布し、多重微小電極を穿 刺して定電位保持して培養した.コロニー形成の有無を 観察しながら培養を3カ月まで実施したが、視認可能な コロニーの形成には至らず、長期間の培養により、固形 培地が乾燥して割れ始めたため、本実験はここで一旦終 了とした.

これとは別に、東青ヶ島海丘カルデラの熱水環境から 採取した岩石試料において、電気化学活性の報告のある 硫黄酸化細菌 *Thiomicrorhabdus* 属の遺伝子配列が検出 されたため、同様の試験を実施した.しかしながら、多 重微小電極培養でのコロニー形成には至らなかったた め、従来法に従いチオ硫酸培地を用いて培養し、得られ たコロニーの電気化学活性を検証することとした.現在 までに、41個のコロニーを取得し、2株のドラフトゲノ ムを解析済みである.今後、これらの分離微生物の性状 解析と電気化学培養の可否について検討し、電気化学活 性細菌あるいは新種であった場合には、NBRCへの寄託 を進める予定である.



図2 電極表面上微生物細胞の蛍光顕微鏡像

南極産菌類の保存による微生物資源としての基盤形成

【目的】南極産菌類は氷点下でも成長が可能という低温 での類まれな特徴を持っており、近年、微生物資源・遺 伝子資源として注目を集め始めている。昭和基地周辺か ら分離された菌類は、現在まで計77種の菌類が報告さ れている。しかし日本の菌株保存機関に寄託されている 昭和基地周辺から分離された菌類はわずか5種8株で あった。

そこで本研究では、① 昭和基地周辺から菌株を分離 し、国立極地研究所に保存、菌株リストをweb上で公 開する、② 南極産菌類について、全ゲノム配列解析お よび遺伝子配列予測を行うことで、南極産菌類を微生物 資源としての基盤形成を図ることを目的とした.

【方法】南極・昭和基地周辺の試料から菌類の分離は, 4℃, 10℃, 20℃の培養温度で, 1倍, 2倍, 5倍希釈し たポテトデキストロース寒天培地(クロラムフェニコー ル含)に南極の試料を直接置いて培養する直接培養法を 用いて行った。約1ヶ月~3ヶ月後に出現した菌類のコ ロニーを新しい1倍,2倍,5倍希釈したポテトデキス トロース寒天培地 (クロラムフェニコール含) に植菌し、 コロニーの形態や色が単一になるまで、植菌を繰り返し、 菌株を取得した.取得した菌株は、菌類の種同定に広く 利用されている ITS 領域および 26S rRNAの D1/D2 領 域のプライマーを用いて PCR 法により DNAの増幅を 行った. PCR により ITS 領域および D1/D2 領域の DNA の増幅が認められなかった菌株については、16S rRNA のプライマーを用いて再度、PCRを行った. PCRによ り増幅が認められた DNA については、サンガーシーケ ンスにより塩基配列を取得した.取得した塩基配列は NCBIの BLAST 検索により 菌類および細菌類の分類を 行った.

全ゲノム配列の取得は, PacBio Sequel2およびillumina Hiseq2500により行った. 遺伝子配列予測はBRAKER2 (ver. 2.1.6)を使用して行った. また遺伝子配列予測の精 度はBUSCOスコアにより評価を行った.

【結果・考察】本研究では、921株の微生物コロニーを 分離することができた、921株のうち、823株については、 PCRにより遺伝子の増幅が認められた。823株のうち、 503株については、ITS領域、D1/D2領域のプライマー ではDNAの増幅は認められず、16SrRNAのプライマー により、DNAの増幅が認められた。16SrRNAのプライマー

辻 雅晴

ところ、全て細菌類であった.残り 320 株は ITS 領域 および D1/D2 領域のプライマーにより DNAの増幅が認 められ、NCBIの BLAST 検索したところ、全て菌類で あった.さらに 320 株の菌類の菌株について種同定を試 みたところ、子のう菌類 18 種、担子菌類 25 種の計 43 種に分類された.これらの菌類のうち、子のう菌類の Leuconeurospora sp., Aotearoamyces sp., Symbiotaphrina microtheca の 3 種、担子菌類 では Cystobasidium sp., Leycosporidium yakuticum の 2 種がこれまで昭和基地周 辺から報告が無い菌類であった.

本研究で取得した菌類の菌株 320 株から 50 株をラン ダムに選抜し、5%トレハロース含有 20% グリセロール 溶液に入れ、-80℃で約6ヶ月間保存した.保存から約 6ヶ月後に菌株の復元試験を行ったところ、すべての株 で増殖が認められた.現在、本研究で取得した南極産菌 類、細菌類は、5%トレハロース含有 20% グリセロール 溶液に入れ、国立極地研究所のディープフリーザー内で 保存されている.

次に分離した南極産菌類の中から2株を選抜し、 PacBio Sequel2 およびillumina Hiseq2500 によりゲノム 配列を取得した. 9A-1株および MGH-2株の全ゲノム解 析 結 果 を 表1に示す. 9A-1株のゲノムサイズは 21.5Mb,予測されたタンパク質コード遺伝子の数は 7213,BUSCOスコアは92.6%であった.また MGH-2 株のゲノムサイズは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11524,BUSCO スコアは94.3%であった.

今後も引き続き,南極産菌類の収集と保存,全ゲノム 解析による遺伝子配列の予測を継続し,南極産菌類の微 生物資源としての基盤形成を継続していきたい.

表1 ゲノム解析の結果

種名	Cystobasidium tubakii	Mrakia gelida
菌株	9A-1	MGH-2
試料採取場所	東オングル島	スカルブスネス 露岩域
全長 (Mb)	21.5	34.9
タンパク質数	7213	11524
BUSCO スコア (%)	92.6	94.3

MIC を測定した.

Actinotignum 属菌種の系統分類における新規解析手法の確立

富田純子

Actinotignum 属の菌種分類が検査室等でも行えるよう に,gyrA およびgyrBのPCRプライマーを設計した. 現在,臨床分離株についてゲノム解析結果とgyrA およ びgyrBのPCRプライマーを利用した分類同定結果が一 致するか検証中である.



図1 gyrA 塩基配列による系統樹.

薬剤感受性試験では、MIC 測定の結果、 β ラクタム系 薬剤(AMPC)のMIC₉₀は0.1 μ g/mL以下であり、感 受性を示した.キノロン系(CPFX)、マクロライド系 (EM)、リンコマイシン系薬剤(CLDM)には一部の 株が耐性を示した(表1).耐性機構について調べたと ころ、キノロン系薬剤への耐性にはgyrA 遺伝子の変異 が、マクロライド系薬剤への耐性にはerm(X)遺伝子お よび23SrRNA変異の関与が示唆された.

表1 Actinotignum 属4菌種に対する各種抗菌薬のMIC50 およびMIC90 (μg/mL)

	AMPC	VCM	TC	EM	CPFX	CLDM
MIC_{50}	0.016	0.19	0.25	0.023	3	0.023
MIC_{90}	0.032	0.25	0.5	>256	>32	>256
AMPC:アンピシリン TC:テトラサイクリン CPFX:シプロフロキサシン VCM:パンコマイシン EM:エリスロマイシン CLDM:クリンダマイシン						

【目的】新興尿路感染症起因菌のActinotignum属菌種は、 培養が煩雑であり、生化学性状試験による識別が難しい ことから、臨床現場において同定が困難な菌群として 認識されている.現在, Actinotignum 属にはA. schaalii, A. sanguinis, A. urinaleの3菌種, および非承認の 'A. *timonense*'の計4 菌種が存在しているが、従来法では菌 種レベルまでの同定が不可能であり、新たな系統分類の 手法が必要である、そこで、本菌群の系統解析に有用な 遺伝子を探索し、迅速および正確に分類同定できる方法 の確立を目的とした、また、本属菌種の治療方針は未だ 策定されておらず、抗菌薬治療におけるブレイクポイントが 設定されていない. ブレイクポイントは治療効果を予測で きる基準値であるため、適切な抗菌薬の選択に重要であ る. そこで臨床分離株の各種抗菌薬に対する MIC データ を収集し、薬剤感受性および耐性の傾向を明らかにした. 【方法】Actinotignum 属菌株は、国内の医療機関におい て分離された22株、海外の系統保存機関から入手した 40株、および遺伝学的解析においては NCBI データベー スの50株を利用した.各菌株のゲノム配列を利用して, TYGS, ANI, GGDC 解析により菌種を明確にした. さ らに18種のHousekeeping geneを用いて系統解析を行 い,ゲノム解析の分類結果と一致する遺伝子を探索した. 薬剤感受性試験は、10系統15薬剤についてEtestにて

【結果・考察】ゲノム解析では、TYGS・ANI・GGDCの それぞれの結果について基準株と比較し、3解析とも菌 種分類の閾値(TYGS: species cluster, ANI: ≥ 95%. GGDC: ≥ 70%)を上回った菌株について同一菌種と確 定した. 16S rRNA 塩基配列を用いた系統解析では、A. schaalii, A. sanguinis, 'A. timonense' 3 菌種の相同性 が高く,正確に分類することが不可能であった.そこで 18種のHousekeeping gene (atpA, atpD, dnaE, dnaJ, dnaK, fusA, gltX, groL, gyrA, gyrB, metG, pgi, pheS, recA, rpoA, rpoB, rpoD, tuf)の配列を比較 して系統解析を行ったところ,gyrAおよびgyrBを使用 した解析はゲノムによる分類結果と一致しており、 菌種 レベルまで明確に分類できることが判明した(図1). gyrA は基準株と 97.6% 以上, gyrB は基準株と 98.4% 以 上の相同性を示した場合に同一菌種と同定した.ただし. 今回使用した菌株においてゲノム解析によりA. schaalii と同定された菌株は基準株1株のみであったため、A. shcaalii における gyrA および gyrB の有用性については 臨床分離株を追加して検証する必要がある.また,

所属 愛知学院大学薬学部 E-mail: jtomida@dpc.agu.ac.jp

嫌気性環境に棲息する未知の捕食性原核微生物の探索・分離と多様性解明

山本京祐

【目的】捕食性細菌は異種細菌を襲いその細胞内容物を 生育基質とする一群の細菌であり,自然環境中に幅広く 存在する.微生物の捕食一被食関係は相互作用する種の 個体群サイズ変化をもたらし,微生物群集動態を規定す る要因のひとつとして重要である.しかし,既知の捕食 性細菌種はほぼ全てが好気性で,嫌気性種はごく限られ た種しか報告がなく,嫌気性環境の微生物捕食一被食関 係はほとんど理解が進んでいない.そこで本研究では, 様々な嫌気性環境から捕食性原核微生物を検出し分離培 養を試みることで,嫌気性捕食性生活様式の実態を明ら かにすることを目指した.

【方法】水田,海洋,嫌気消化汚泥プロセス等様々な環境から採取した試料およびそれを微生物源とした集積培養系を分離源とし、餌微生物(大腸菌等の各種グラム陰性細菌,黄色ブドウ球菌等)の菌体を含む希釈培地を用いて分離培養を行った.各種環境試料および集積培養試料を段階希釈し,嫌気二重寒天平板培養法(軟寒天培地に希釈試料と餌微生物とを混合した後寒天培地に重層)あるいはスウォーム培養法(無機平板培地上に画線塗布した餌微生物菌体に試料を接種)を用いて培養を行い、 プラーク形成もしくはスウォーム形成を指標として捕食性微生物を検出した.また,嫌気消化汚泥を微生物源として捕食性微生物を検出した.また,嫌気消化汚泥を微生物源として構築した集積培養系については微生物群集構造解析および各種顕微鏡観察を実施し,捕食性微生物の存在を分子生態学的および形態学的に探索した.

【結果・考察】湛水期の水田土壌およびそれを接種源と した集積培養系からの培養では二重寒天平板培地でのプ ラーク形成はみられなかった.また、海洋試料として表 層海水もしくは海洋底泥を用いて分離培養を実施した が、プラーク形成あるいはスウォーム形成はみられず、 嫌気条件下での捕食性微生物の検出には至らなかった. 一方、嫌気消化汚泥を分離源とした際には、排水処理施 設由来の汚泥試料から直接分離をかけた場合では餌生物 (大腸菌) 菌体を侵食するスウォームの形成が認められ、 Myxococcus 属のような粘液細菌様の捕食様式を有する嫌 気性微生物の存在が示唆された(図1A). さらに、上 記とは異なる施設由来の消化汚泥を微生物源とし、余剰 汚泥を主要炭素源とした集積培養系からの分離培養で は、二重寒天法によってプラーク形成が認められた (図1B). これらの株については現在スウォームおよび プラークからの分離培養・純化および系統解析を進めて いる. 当該集積培養系では捕食性細菌の主要系統群であ る Bdellovibrionota 門が集積しており、プラーク形成微



図1 嫌気性捕食性菌のA)スウォームおよびB)プラーク

生物の帰属系統について興味が持たれる.

一方,近年の研究進展によって,幅広い嫌気性環境に 棲息する未培養系統群の Candidatus Patescibacteria 上門 細菌が寄生性/捕食性の生活様式を有することが示唆さ れている.当該系統群の生理生態解明を目指し,嫌気性 無機塩培地に微生物源として UASB 型メタン発酵反応 器のグラニュール汚泥を,餌微生物としてメタン生成 アーキアを添加し培養したところ,Ca. Patescibacteria を集積することに成功した.FISH 解析や電子顕微鏡観 察等によって,異なる系統のCa. Patescibacteria がそれ ぞれ Methanothrix 属と Methanospirillum 属の細胞に付着 して存在することが明らかとなった(図2).本培養系のメ タゲノム解析ではこれらのCa. Patescibacteria がアミノ酸・ 脂肪酸等の生体分子生合成経路の多くを欠くことやIV型ピ リ線毛のような寄生性関連候補遺伝子群を保有することが 示され,寄生性/捕食性の生活様式を強く示唆している.



図2 メタン生成アーキアに付着する *Ca.* Patescibacteria (Kuroda *et al.*, DOI: 10.1101/2022.04.10.487813を改変)

今後は得られた株の系統・生理学的特徴付けとともに, 引き続き幅広い環境からの分離培養を進めることで,捕 食性原核微生物の多様性や生態学的役割のより深い理解 につながることが期待される.

醤油酵母の分類に関する研究

【目的】醤油の主発酵酵母 Zygosaccharomyces sp. は日本の 伝統的な発酵調味料である味噌や醤油の製造に重要な微 生物である.近年,この酵母は一倍体のZygosaccharomyces rouxii と近縁の他の一倍体酵母(Strain X)とのハイブ リッド,すなわち異質二倍体であることが明らかになっ た.また,Strain X は Zygosaccharomyces siamensis との異 種交雑により,醤油の主発酵酵母とは別の異質二倍体酵 母(NCYC 3042 株)を形成したと考えられている(図1). しかしながら,Strain X は現時点で未発見である.醤油 の主酵母の理解のためには,Strain Xを単離し,その性 質を詳細に解析する必要があると考えられる.そこで, 本研究では,Strain Xを自然界から単離することを目的 とした.



【方法】Zygosaccharomyces 属酵母が存在する可能性があ る,浸透圧が高い食品や自然環境由来のサンプルを, NaClを10%添加したYPD培地(YPD10),または, 20%のグルコースを添加したYPD培地(YPD20)にプ レーティングした.形成されたコロニーから細胞を採取 し,顕微鏡観察により,酵母様の形態を示す株を選抜し た.コロニーの形態およびRAPD-PCRによるバンドパ ターンを指標に,同一株と考えられた株をまとめた後, 26S rDNAのD1/D2領域をユニバーサルプライマーを 用いて増幅し,シーケンス解析により種の推定を行った. また,醤油の主発酵酵母やNCYC 3042株のゲノム情報 からZ. rouxii, Z. siamensis, Strain Xに由来すると考え られる配列に特異的なプライマーを設計した.これらの プライマーを用いたPCR解析により,分離した株の特 徴づけを実施した. 渡 部 潤

【結果・考察】Zygosaccharomyces 属酵母は濃縮果汁やハ チミツなど高浸透圧環境に適応した微生物である. Strain Xも類似した特性を備えていることが予想された ため、市販および自家製の味噌6サンプル、市販のハチ ミツ1サンプルをYPD10およびYPD20にプレーティン グし、酵母を分離した.コロニー形態やRAPD-PCR解 析等により分離された株をタイピングし、58株につい て26S rDNA領域のシーケンス解析で種を推定した.そ の結果、分離された株は、Zygosaccharomyces sp. が43株, Debaryomyces hansenii が2株, Debaryomyces indobonesis が5株, Yamadazyma triangularis が1株, Debaryomyces subglobosus が1株, Debaryomyces prosopidis が1株であった.

PCR 解析により, *Zygosaccharomyces* 属酵母を簡便に 分類するため, ゲノム情報を参照して種特異的なプライ マーを *PRB1* 遺伝子近傍に設計した (表1).

表1 Zygosaccharomyces 属酵母の種特異的プライマー

プライマー名	配列
Rouxii-1_F	TCAACCAAATCGTGTAACTCCA
Rouxii-1_R	ACCTGAAGAACATTCATTTTTCGAAG
Rouxii-2_F	TTATTGGGGAACACTTCACGTAC
Rouxii-2_R	ACCTGCGATCGACTACTTGA
Rouxii-3_F	GGATGGACAGATCTAATCATGAT
Rouxii-3_R	AAATCTTAAGCTTGTTGGTATTTCTTG

分離されたZygosaccharomyces 属酵母が Strain X に特 徴的な DNA 配列を有するかどうかを検証するために, PRB1 遺伝子近傍に設計したZ. rouxii, Z. siamensis, Strain X に対する特異的なプライマーを用いた PCR 解 析を実施した. その結果,分離したすべての株はZ. rouxii 特異的なプライマーで増幅が認められた. この結 果は,分離した株が,一倍体のZ. rouxii か,醤油の主発 酵酵母に相当する異質二倍体であることを示唆していた.

そこで、分離源を浸透圧が高い食品サンプルだけでは なく、自然環境サンプルにも広げることにした. 福島市、 郡山市、大玉村の山林に自生しているサクラ、コナラ、 ミズナラなどの樹種から計25サンプルの樹液を採取し た. これらのサンプルから酵母を分離し、種特異的なプ ライマーを使用した PCR 解析に供した結果、2株が Zygosaccharmyces 属酵母であると判別できたが、Strain Xではなかった. シングルセルソーティングによる新規温泉アーキアの網羅的分離培養およびリソース化

加藤真悟

【目的】アーキアは、全生物界の一翼を担う生物群であり、「生命とは何か」を理解する上で欠かせない研究対象である.しかしながら、多くのアーキア系統群(目レベルで8割以上)において、分離培養株が未だ得られておらず、リソース化もできていない.それゆえ、我々のアーキアの生理・生態に関する知見は極めて限定的である.本研究では、これら多様な未培養アーキアを網羅的かつ効率的に分離培養してリソース化することを目的とし、生物学全体にとって重要な基盤構築を目指した.

【方法】本研究では、国内の温泉に生息する未培養アー キアを対象として、シングルセルソーティングおよび限 界希釈法による新規温泉アーキアの網羅的分離培養およ びリソース化を試みた.

まず、4つの温泉地(伊豆、箱根、日光、奥塩原)に おいて、温度の異なる試料を複数採取し、Illumina Miseq および PacBio Sequel II を用いてメタゲノム解析 を行い、微生物群集構造を調べた.同解析により得られ た MAG (metagenome-assembled genome) 情報に基づ いて、主要アーキアの培養条件の検討を行った.採取試 料中の微生物細胞を SYBR Green Iを用いて染色し、セ ルソーターを用いて1細胞ずつ96 穴プレートに分取後、 検討した条件下で培養を行った.増殖確認は、フローサ イトメーターを用いて細胞数カウントにより実施した. 並行して、従来通りの限界希釈法も実施した.

【結果・考察】ショートリードメタゲノム解析により、 4つの温泉地から計19試料の微生物群集構造を決定した。その結果、奥塩原の試料では、全原核生物コミュニ ティーの中でアーキアが90%以上を占め、さらに未培 養アーキアも多数含まれることがわかった。同試料より、 高-中品質 MAG を約70 個得ることに成功した。また、 十分量の DNA が抽出できた伊豆の試料については、ロ ングリードメタゲノム解析を行い、14 個の完全長ゲノ ムを含む、61 個の高品質ゲノムの再構築に成功した。 ただし、アーキアの存在比は低く、本試料は分離培養に は適さないと判断した。

奥塩原の試料から再構築した MAG の情報から,未培養アーキアの中には,有機物を炭素・エネルギー源として, 微好気・嫌気条件で生育すると推定される種が含まれると推定された.そこで,同試料を植菌源として,セルソーターを用いた分離培養(温度25℃もしくは50℃; pH2.5もしくは5.0)を試みた結果,25℃,pH5.0の条 件下において Acidocella 属 (バクテリア)の新種レベル の分離株 SRK01 株を得た.しかしながら,同方法での アーキア株の獲得には至らず,高温条件での培地の蒸発 や,酸性条件でのフローサイトメーターの検出感度低下, 嫌気培養への適用など,改善を努めたが解決には至らず, 今後の課題として残された.

並行して従来通りの限界希釈法を用いて, 奥塩原の 試料を植菌源として分離培養を試みたところ, *Thermoplasmatales*目に属する科レベルで新規のアーキ ア株SR-01株の獲得に成功した.また, *Nanobdellati*界 に属する絶対共生性アーキア株の共培養系を2系統 (MJ1株, MJ2株)獲得することに成功し, MJ1株に関 しては, *Nanobdella aerobiophila*と命名し,詳細な形態・ 性状解析結果についても誌上発表した(図1).



図1 A. 超薄切片 TEM 像, B. 付着面拡大, C. 生活環

その他の株においても、全ゲノム配列を決定し、生理性 状も部分的に決定した(表1).いずれも好熱好酸性を 示し、分離源の環境条件と一致した.

表1 分離株の特徴

株名	ゲノムサイズ	生育温度	生育 pH
SR-01	1.4 Mbp	55°C	3.5
MJ1	0.67 Mbp	60−75°C	1.0 - 4.0
MJ2	0.70 Mbp	70°C	2.5

各株は, JCM に寄託済みであり(現時点では非公開 の株を含む), Nanobdella aerobiophila 以外についても論 文化に向けてデータ取得を進めている.

日本産アミガサタケ類の多様性解明と栽培化実現に向けた系統分類的整理

吉田裕史

【目的】アミガサタケ類(Morchella spp.)は食用として 世界的に珍重される一方で,共生関係や発生条件などの 生態は明確でなく,商業的栽培化の実現は現在のところ 特定種(e.g. M. importuna)での事例に限られる.生態理 解の遅れの背景には,基盤としての多様性解明の遅れが ある.大分類として Morchella 属は3クレード(Esculenta clade, Elata clade, Rufobrunnea clade)に分かれるこ とが分子系統的に明らかとなっており,これは子実層の 色の違いなどに基づく外部形態的な大別と概ね合致す る.しかし,各クレードにおけるさらなる細分について は従来の形態に基づく分類が系統関係を反映しないこと が指摘されており,日本国内においては種レベルでの多 様性がほとんど未解明であった.そこで本研究では,日 本各地から採集されたアミガサタケ類を材料として,分 子系統解析に基づく系統分類的整理に取り組んだ.

【方法】成松眞樹博士(岩手県林業技術センター),坂本 裕一博士(岩手生物工学研究センター)らと共同で下記 サンプル収集ならびにサンガーシーケンシングを実施し た.まず、北海道・本州・九州各地(計80地点以上) から採集されたアミガサタケ類子実体サンプル群につい て、組織分離または胞子分離により分離培養株を取得し た. これらについて、5座 (RPB1, RPB2, EF1a, rDNA 28S, ITS)の DNA 配列を取得し, 良好な配列データセッ トが揃った全69株について分子系統樹推定を行った上 で, GCPSR (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition)の理論に基づき系統樹上の種の 境界を推定した. さらに, 別種として識別された系統 群について、それぞれ単胞子由来の分離培養菌株を1株 ずつ選定し、MinION ロングリードシーケンシングなら びに Illumina ショートリードシーケンシングに供した. MinION ロングリードを元に, Flye · GetOrganelle によ るミトコンドリア環状ゲノムアセンブリを実行したのち. ミトコンドリアゲノムにマップされないリードを抽出し て NECAT による核ゲノムアセンブリを実行した. その 後, Racon によるアセンブリ補正, Pilon による Illumina ショートリードを用いた配列修正を経て全ゲノム配列を 取得し, Ascomycota コア遺伝子セットに対する BUSCO 解析を実施してゲノム網羅性を評価した. 続いて各株の 平板培養菌体 RNA-seq データを元に遺伝子モデルを構 築し、Funannotate による遺伝子予測と機能アノテー ションを実施した. さらに, Morchella 属のゲノム既知 種 (JGI MycoCosm 登録種)のゲノム情報と合わせ、シ ングルコピーオルソログを OrthoFinder により探索・抽 出し、MAFFT・trimAl・IQ-TREE2・ASTRAL-III を用 いて Supermatrix 法または Supertree 法による種系統樹 推定を実施した。

【結果・考察】5座 DNA 配列に基づく分子系統解析の結 果, サンプル群は黄色系 (Esculenta clade)・黒色系 (Elata clade)の2クレードに明確に大別され、黒色系クレード はさらに GCPSR に基づいて3 推定種にグループ分けさ れた.これら3推定種の採集地を比較したところ.それ ぞれ関東以西エリア (15株), 岩手県エリア (11株), 北 海道含む岩手県以北エリア (9株) に偏って分布した。分 布については今後さらなる菌株収集により検証していく 必要があるが、互いに緯度分布傾向が異なることが示唆 される. これら3推定種 (仮称: Mel-Honshu, Mel-Iwate, Mel-Kitanihon) それぞれにつき代表1株を選定して全 ゲノムシーケンシングを実施した結果、染色体スケール に近い連続性と良好な網羅性を有したアセンブリが得ら れた(表1). ゲノムサイズには株間で数 Mb 程度の差 異があったほか、ドットプロットやシンテニープロット により各ゲノムに特異な領域の存在も見出された.

表1 アミガサタケ類3推定種のゲノムアセンブリ

GCPSR 識別種	サイズ	コンティグ数	遺伝子数	Complete BUSCOs
Mel-Honshu	56.5 Mb	29 contigs	12,268 genes	95.7%
Mel-Iwate	52.7 Mb	28 contigs	12,211 genes	95.8%
Mel-Kitanihon	53.3 Mb	36 contigs	12,496 genes	95.5%

上記3ゲノムとJGI登録 Morchella 属 36ゲノムを合わせ た全39ゲノムからシングルコピーオルソログとして 4,097 組の遺伝子セットを同定し、それらのアミノ酸配 列を元に種系統樹を推定したところ、日本産3推定種は それぞれ離れた系統的位置に配置され、互いに別系統で あることが支持される結果となった.以上の研究から、 日本国内には黄色系に加えて、少なくとも3系統の黒色 系アミガサタケ類が分布していることが明らかとなっ た.これら3系統は互いに緯度の異なるエリアに分布す る可能性があり、好適生育条件・発生条件等の差異につ いて今後検証していくことが望まれる.
ヒト腸内有益放線菌の役割-迅速検出法と選択分離法の構築-

【目的】我々は、Clostridioides difficile 感染症患者に対す る糞便微生物移植治療に成功し、糞便のメタゲノム解析 により本症例の回復とともに放線菌 DNA が検出される ことを明らかにした.放線菌は、土壌や植物などの自然 環境で普遍的に生息している.その中には、生理活性物 質を生産する有益な放線菌が多数存在している.そこで、 健常人において、どのような割合で糞便から有益放線菌 が検出されるかを調べるため、簡易迅速検出・定量法と 選択的分離法の構築に向けて条件検討を行った.

【方法】まずは放線菌 Actinobacteria 門の中で,有益放線 菌 10 目のみが有する転写調節因子 bldD に着目した. bldD の配列を各種基準株の全ゲノムデータから収集し, 保存されている領域を探索することで,特異プライマー 対を作成した. PCR 条件は,放線菌基準株および分離 株の DNAを鋳型にして,増幅の有無により検討した. その後,土壌および糞便検体から直接細菌 DNAをキッ トにて抽出し,決定した条件で PCRを行い,クローニ ング後 bldD の部分塩基配列を解析することで,有益放 線菌が検出されるか確認した.

次に,糞便懸濁液からカプセルを作製し,放線菌用寒 天培地に混釈後,同懸濁液を塗布,1か月培養して放線 菌を分離した.添加する抗生物質の検討には,ドライプ レート(栄研化学)を用いた.分離した放線菌は,16S rRNA遺伝子解析により属を推定した.また,分離株に ついて生産培養し,培養液について抗菌活性試験をC. difficileを含む病原細菌に対して行った.

【結果・考察】各有益放線菌の bldD から各塩基数 20 の プライマー対(増幅産物約 250 bp)を作製した. PCR 条件は, Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)を用いて2ステップ(変性 98℃, 30 秒, アニーリング 72℃, 30 秒, 30 サイクル)の反応が最も 良好であった. それを用いて5つの土壌の環境 DNA か ら検出した結果,想定した菌群のみの増幅が認められた (図 1).一方で,ヒト糞便に対して同様の検討を行った ところ,目的遺伝子の増幅は確認できなかった.放線菌 は細胞壁が厚く,DNAの抽出効率が悪い一方,腸内細 菌は比較的容易に DNAを取得できる.したがって,糞 便からキットを用いて DNAを抽出したが,他細菌に比 べて含有量の少ない放線菌 DNAが抽出されなかった可 能性がある.このことから今後,ヒト糞便からの放線菌 DNAの精製過程を検討する必要がある.



図1 作製したプライマーを用いて土壌から検出された 放線菌 DNAの系統樹(近隣結合法)

次に、放線菌の分離では、腸内細菌科などの目的外の細 菌が大量に生育した.そこで、抗生物質による選択分離 の検討を行った結果、セフタジジムに全ての放線菌が耐 性であった.本物質を添加した状態で20人のヒト糞便 から分離を行った結果、4人の検体から6属14種20株 の放線菌を得ることに成功した(表1).これら分離株 のうち、Nonomuraea属2種とStreptomyces属2種の培 養液に活性が認められた.今後、分離株の性状解析を行 うことにより、ヒト腸内での常在放線菌の役割を明らか にすることが期待される.

表1 ヒト糞便検体から分離された放線菌

	分離源の	のヒト糞便	更検体(分	離株数)
放線菌の推定属	А	В	С	D
Actinomadura	4	-	-	1
Gordonia	2	1	-	-
Micromonospora	2	-	-	-
Nonomuraea	5	-	-	-
Sphaerisporangium	1	-	-	-
Streptomyces	2	-	1	-
Unknown	1	-	-	-

晃

武

新規乳酸菌の系統分類とバイオリソースの整備

【目的】乳酸菌は糖から乳酸を生成する細菌の総称であ る. Lactococcus 属 は Schleifer ら に よ っ て L. lactis を Streptococcus 属から分離して提唱された属であるが,代 表的な乳酸菌である Lactobacillus 属が 250 以上の種から 構成されているのに対し,これまでに 20 数種程度しか 記載されていない.乳酸菌は古くから発酵食品の製造に 利用されており,免疫機能の調節作用など,ヒトの健康 に対する機能が期待されている. Lactococcus 属は現在 迄に申請者らの報告を含めて 20 数種しか記載されてい ない.最近になり乳や発酵食品以外から分離された種が 多く,特に昆虫の消化管からの分離例が増加しているが (図 1),昆虫の消化管内の機能についての知見はほとん どない.そこで,シロアリを分離源として Lactococcus 属を単離することを試みた.



図1 オオシロアリから単離した L. hodotermopsidis

【方法】日本に生息するシロアリ6種を用いて、乳酸菌 用培地 MRS やトリプチケースソイ (TS) 培地など複 数の培地で,消化管内細菌の培養を行なった.使用した シロアリはヤマトシロアリ属 (Reticuliterme 属) の5種 (沖縄県産 R. yaeyamanus と R. okinawanus, 鹿児島県産 *R. amamianus* と *R. miyatakei*,静岡県産 *R. speratus*)と、 兵庫県で採集した北米原産の外来種である Zootermopsis nevadensis である. 生育したコロニーは単離し, 16S rRNA 遺伝子配列を解析した. グラム染色やカタラーゼ 試験,オキシダーゼ試験,顕微鏡による細胞形態の観察 などの、基本的な微生物学的試験を行なった、新規性が 高いと考えられた株については, 生育条件 (耐塩性, pH, 温度) や炭水化物資化性試験(API50), 酵素活性 試験(APIZYM)を行なった。また、菌体脂肪酸組成と ペプチドグリカンタイプについても Lactococcus 属の近 縁の基準種とともに評価した. 菌体脂肪酸組成の解析に

野田悟子

は Sherlock Microbial Identification System (Version 6.2B) (MIDI) を使用し、得られたデータはTSBA 6 デー タベースを用いてプロファイリングした。生成乳酸異性 体タイプは、F-キット (J.K.インターナショナル社製) を用いて評価した。単離株から DNeasy PowerSoil Pro Kit (キアゲン)を用い、添付の説明書に従ってゲノム DNAを抽出した。ゲノム DNAライブラリーの調製は QIAseq FX DNA Library Kit (キアゲン)を用いて行っ た. 調製したライブラリーは、シーケンサー MiSeq (llumina) により配列を決定した。クオリティーコント ロールを行ったシーケンスリードは SPAdes (Ver 3.15.0) でアセンブリして、コンティグ配列を得た。ゲノム配列 の遺伝子機能予測は、Prokka (Ver 1.11)を用いて行っ た. 近縁種とのゲノム相同性は、OrthoANIとアミノ酸 配列相同性 (AAI) により評価した。

【結果・考察】複数のシロアリ種から、10株ほどの Lactococcus 属細菌を単離した。これらの株は、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析で、すでに我々が単離し て新種記載しているオオシロアリ由来のL. insecticolaと L. hodotermopsidis や、ヤマトシロアリから単離されたL. reticulitermitis などとともにグループ化された. 系統解 析の結果.他の地域から採集した同種の宿主シロアリか らも非常に近縁のLactococcus 属が単離されたことから, 宿主の系統と共生する乳酸菌の系統に相間があると考え られた. ヤエヤマシロアリ(R. yaeyamanu)から単離 した RvT2株は、 最近縁種である L. chungangensis と 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 97.2% であったことか ら新種の可能性が考えられたため、理化学研究所 JCM に寄託した (JCM 36015). 次いで, RyT2株と近縁種で, 耐酸性や耐塩性、炭水化物資化性などの比較を行なった ところ, 複数の試験で違いが確認された. 本株のゲノム 解析から推定したG+C含量は38.8%であった. ゲノム 塩基配列相同性(ANI)と、全アミノ酸配列相同性(AAI) はL. chungangensis とそれぞれ 86.4% と 85.2% であり, 共に新種の基準である95%を下回っていた.これらの 結果から、RvT2株はLactococcus属の新種であると考え られた. 我々がヤマトシロアリ属以外の宿主から単離し た乳酸菌株も新規性が高く、シロアリ共生系は新規乳酸 菌の分離源として有用であると考えられる.

プラスミド宿主域を用いた微生物微分離法の利用域拡大

木 村 善一郎

【目的】環境中の任意の細菌を狙って形質転換し,付与形 質を用いて分離するという分離技法を試行した.付与の 方法論として本研究ではプラスミドの宿主域による選択 性を利用することで特異的な分離が可能かを調査した.



図1 プラスミド宿主域を用いた特異分離スキーム

プラスミドの複製起点である oriV の配列から宿主域 を予測することが可能なら本法の適用範囲を未分離細菌 に拡充出来る.本研究は報告者が立案した上記仮説を立 証することを目標に下記する3つのタスクを実施した. 【方法】

タスク1. 複製起点の系統樹作成試行

複製起点(oriV)の系統樹を作成し系統的な進化と、 プラスミドの宿主域を一致させることが本法の利用域拡 大にあたり最も有効かつ単純であるため同定済みプラス ミドの既知 oriV 系統樹作成を試行した.

タスク2. モデル試料を用いた分離能限界の調査

本法が実試料中において、どれほどの相対量を持つことで 分離対象として成立するのか?という情報も本法の適用にお いて重要である.本タスクではOD660:0.5に調整した複数菌 種同士からなるモデル複合系へのpUC19プラスドを導入し、 大腸菌を分離対象に設定して分離培養可能限界を調査した. タフク? 実試料を用いた菌株公離

タスク3.実試料を用いた菌株分離

複数の実環境試料を対象として、宿主域の異なるプラ スミドを導入し、抗生物質(ストレプトマイシン・カナ マイシン)存在下でのコロニー回収・同定を行った. 【結果・考察】

成果1. oriV系統樹作成の試行

oriVはDnaAとの相互作用によりプラスドの複製を開始す る役割を果たし、発生的には単系統である.従って当初報告 者は当該部位を用いた系統樹を作成することで宿主域を推 論可能であると仮説を立案したが本仮説に従った系統樹作 成は不成功に終わった.既知 oriVを用いた系統樹のアライメ ントは同じ backboneを持つプラスドでは成立したが、分離 源が異なると配列上の差異が過大で成立しない場合が多発 し、少なくとも単純な配列ベース・系統樹ベースでは oriVに 基づき宿主域を判別することは困難であると結論した.

成果2. モデル試料への適用

大腸菌を含む5種既知細菌の混合培養物(O.D. 660: 0.5)を作成し、大腸菌の混合割合を変化させることで直 接分離培養可能な存在比を検証した(図-2). pUC19+ 導入混合物をアンピシリン耐性でスクリーニングした結 果,予想通り大腸菌以外の4種細菌はpUC19にコード されたアンピシリン耐性を利用できず(i.e. 宿主域に選 択され)大腸菌のみが分離された.さらに大腸菌のみ 1/1000 希釈したのちの混合物(i.e. 濁度ベースでの存在 割合は1/5000)でも容易にアンピシリンにより特異分離 出来ることを解明した.すなわち本法の分離能は存在比 1/5000以下の細菌を,少なくとも固体培地上でコロニー 形成が可能でさえあれば集積を経ずに特異分離しうる.



図2 混合菌体からのpUC19を用いた大腸菌特異分離

成果3. 実試料への適用

3種の実試料から、宿主特異性を用いて分離培養に成功 した. 試料1(活性汚泥好気集積物)とストレプトマイシン 耐性付与 pUC19により大腸菌に近縁な Enterobacter 属細 菌の分離に成功した. 同様に試料2(80%H₂/20%CO₂雰 囲気55℃下嫌気集積物)からカナマイシン耐性 pIKM1を 用いて Moorella 属細菌,同様に試料3(80%H₂/20%CO₂ 雰囲気25℃下嫌気集積物)とpIKM1で Bacteroides 属細 菌を分離した. いずれの試料においても形成されたコロ ニー菌叢は上記した属のみが検出され,野生の耐性株と 思われるコロニーは検出されず,上記の集積条件・抗生物 質選択圧では野生の耐性菌の問題は表出しないことが示 唆された. さらに試料1由来の Enteorbacter 属細菌につい ては分離菌株からのプラスミド回収を実施し,細胞内での 保持・発現を確認した. すなわち実試料を対象として宿主 域を選択圧とする特異分離が可能であることが示された.

技術の現状と今後

現状として、本法は集積物に対し、宿主域既知プラス ミドを用いることで分離細菌をコントロールでき、実試 料への適用も可能であることが明らかとなった。一方で oriV系統樹の構築失敗から未分離細菌のメタゲノム情 報に基づく分離技術としてさらなる高度化を目指すには 課題が残されている.DnaAとoriVの構造ベースの親和 性評価からなる未知 oriV 同定・設計を進めていく.

梅川碧里

【目的】N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)は真核生物 の細胞壁キチン, N-グリカン, 糖脂質, および GPI ア ンカーなどの糖鎖構築に不可欠な単糖であり.環境中 に普遍的に存在する. GlcNAc キナーゼは、ATPをリ ン酸基供与体として GlcNAc をリン酸化する酵素であ り、GlcNAc6-リン酸(GlcNAc6P)を生成する. 生成物 のGlcNAc6Pは、バクテリアや一部の真菌ではフルク トース6-リン酸(F6P)に変換され解糖系で代謝利用され ることが知られている。この酵素は、バクテリアから 動物まで広く発見されているが、モデル酵母である Saccharomyces cerevisiae (出芽酵母) においては, GlcNAc キナーゼと推定される遺伝子がゲノムに存在しないこと から、当該酵素および GlcNAc 代謝経路は存在しないと 考えられてきた.本研究では、出芽酵母より発見した GlcNAc キナーゼおよび GlcNAc 代謝経路の出芽酵母に おける役割を解明することを目的とした.

【方法】へキソキナーゼ様ドメインを有する機能未知遺 伝子 YLR446Wに着目した.YLR446Wはデータベース 上のいずれの既知酵素ともアミノ酸配列相同性が約 20%以下であり,酵素の機能をアミノ酸配列から類推す ることは不可能であった.そこで,YLR446Wによって コードされるタンパク質の機能を明らかにするため,組 換えタンパク質を用いて in vitro における酵素反応解析 を行った.また,出芽酵母のYLR446W 遺伝子の欠損株・ 過剰発現株を作製し,当該遺伝子の in vivo における機 能解析を行った.

【結果・考察】 in vitro における酵素反応解析により, YLR446Wによってコードされるタンパク質がGlcNAcキ ナーゼ活性を有する酵素であることを見出した.YLR446W は出芽酵母で1つ目に発見されたGlcNAcキナーゼで あることから,遺伝子名をNGK1 (<u>N</u>-acetylglucosamine <u>k</u>inase 1)としてデータベースに登録した (https://www. yeastgenome.org). Ngk1はグルコースに対して K_m 値 が70mM 程度でありほぼ作用しないが,GlcNAc に対し て K_m 値が 0.094 mM であり高い特異性を持つGlcNAc キ ナーゼであることが判明した. Ngk1とは異なり,出芽 酵母の既知ヘキソキナーゼはGlcNAc に作用しないこと も示された. Ngk1はATP以外にも,酵母細胞内に存在 するGTP, ITP, UTPなどの異なる糖ヌクレオシドを リン酸基供与体とする反応も触媒した.

GlcNAc は糖鎖の構成糖として不可欠であり、糖ヌク

レオシドのウリジン二リン酸*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc)を基質とする酵素反応により糖鎖に導 入される.これまでの酵母研究では. 解糖系のF6Pを起 点として、GlcNAc-6Pを経由するヘキソサミン経路が 唯一の UDP-GlcNAc 生合成経路であると考えられてき た (図 1). しかし, Ngk1 の反応生成物である GlcNAc6P は、UDP-GlcNAc 生合成の前駆体化合物であることか ら. 「Ngk1 による GlcNAc 代謝は UDP-GlcNAc 供給に 関わるのではないか」と考え検証した. 出芽酵母の 細胞内 UDP-GlcNAc 定量法を確立し、野生株との比較 解析を行った. Ngk1 過剰発現株は UDP-GlcNAc 量が 野生株の約5倍まで増加し(図1), 培地に添加した GlcNAc 濃度依存的に増加した.対照的に,Ngk1 欠損 株は UDP-GlcNAc 量が約 30% 減少し, NGK1 遺伝子相 補により野生株と同程度まで回復した。ヘキソサミン経 路の律速酵素である Gfa1 を阻害する Isr1 を過剰発現さ せることにより UDP-GlcNAc 量が著しく減少した. Isr1 過剰発現株にNgk1を共過剰発現させることにより UDP-GlcNAc 量が回復したが、Ngk1を欠損させると UDP-GlcNAc量はさらに減少した. 多量のUDP-GlcNAc を消費して生合成される細胞壁キチンの定量法を確立 し. Ngk1の過剰発現によりキチン量が著しく増加し. 遺伝子欠損により減少することを見出した.

本研究により,出芽酵母において,環境中から取り込 まれた GlcNAc が UDP-GlcNAc の生合成に利用される 新経路(Ngk1 経路)の存在を明らかにした(図 1).Ngk1 経路は,酵母の細胞壁を構成するキチンの生合成を促す 役割をもつことも明らかにした.キチンは酵母の形態制 御やストレス耐性と深く関わる.今後,Ngk1 経路の生 理的役割と酵母における普遍性を解明し,酵母の育種や 抗真菌薬開発に結びつけていきたい.



図1 Ngk1 過剰発現による UDP-GlcNAc 量の増加(左)と 推定される Ngk1 の位置づけ(右)

D-サイクロセリン生合成に関わる金属酵素の活性制御機構

的場康幸

【目的】酸素分子がFe(II)やCu(I)と相互作用すると活 性酸素種が生成する.活性酸素種は細胞内のタンパク質 や脂質を酸化し、その機能を破壊してしまう. このため、 細胞内には活性酸素種に対抗する仕組みが備わっている。 一酸化窒素 (NO) は、活性酸素種の毒性を弱める効果を 持ち、その合成は厳密に制御されている。NO 合成酵素 (NOS)は、P450に似たヘム結合タンパク質であり、ア ルギニンを原料として NO を合成する (図1A). この反 応では、中間体として*N*-ヒドロキシアルギニン(NOHA) が生じる. 生じた NOHA は, Mn(II) 要求性酵素である アルギナーゼ (図1A) を阻害し、NOの原料となるアル ギニンの分解を抑制する.このため、酸化ストレスが増 大し, NO が必要なとき, 効率よく NO を合成できる. 当 研究室では、抗生物質 D-サイクロセリンの生合成機構を 研究する過程で、アルギニンから NOHA までの反応しか 触媒しないヘム酵素 DcsAと, NOHAを特異的に加水分 解するアルギナーゼ類似酵素 DcsBを発見した (図1B).



図1 アルギニン代謝系の各酵素が触媒する反応

これまでに、DcsAとDcsBの三次元構造を明らかにしている.DcsAは新規フォールドを有するヘムタンパク 質である.機能的な類似性を有するNOSと比較すると、 へムの近位配位子であるシステインの周辺領域にのみ構 造学的類似性を有しているが、他の部分では類似性を持たない.一方、DcsBの結晶構造は、機能的類似性を有 するアルギナーゼのものと非常に類似している.ラマン スペクトル解析から、DcsAとNOSでは、システイン のチオール基からへム鉄への電子供与性がP450に比べ て弱いことが明らかとなった.このため、DcsAとNOS では、P450とは異なる機構で反応が進行する可能性が ある.一方、DcsBはアルギナーゼと同じくふたつの Mn(II)と結合する酵素であるが、Cu(II)が存在すると 活性が消失した. また, アルギナーゼと DcsB とを比較 すると、Mn(II) に対する配位子のひとつがアルギナー ゼではヒスチジン、DcsBではシステインになっている. このように、DcsAとDcsBでは金属に対する配位力の 違いが特殊な酵素活性を創出していると考えられる.本 研究では、これら2つの金属酵素に着目し、活性制御機 構を原子レベルで明らかにすることを目的とする. 【方法】これまでに、基質や反応物と結合していない DcsAとDcsBの結晶構造を明らかにしていた.本研究 では、NOHAと複合体を形成したDcsAの結晶構造、お よび、反応中間体アナログ2-amino-6-boronohexanoic acid (ABH) と複合体を形成した DcsB の結晶構造を高分 解能で決定した.得られた構造をもとに、それぞれの酵 素反応に関与していると推測されたアミノ酸を置換した 変異体を作成し、その酵素活性や結晶構造を求めた、ま た、Cu(II) と結合した DcsB の結晶構造を決定した.

【結果・考察】 DcsAと DcsB はともに基質結合ポケット のサイズが小さくなっており、それが原因で特殊な基質 特異性が生み出されていると考えられた. NOHAと複 合体を形成した DcsA の結晶構造では、ループの移動や 遠位ポケットに存在する残基の配座変化により、基質結 合ポケットが形成されていた. また, NOHAの水酸基 がヘムの遠位配位子として結合し、ヘム中のプロピオン 酸基やビニル基の構造が変化していた。これらは共鳴ラ マンスペクトル解析の結果と一致した. また, NOHA の結合に伴うヘムの並進移動は、酸素添加反応のために 必要な構造変化であると考えられた。一方、ABHと結 合した DcsB では、活性中心付近に陽イオン結合サイト が見いだされた。アルギナーゼでは、活性中心の近傍に 一般酸塩基触媒となるアミノ酸残基が存在するが. DcsBではそのような残基が存在しない. 陽イオン結合 サイトは、特殊酸触媒として働くヒドロニウムイオンを 保持する役割を持つと考えられた. また. Cu(II) 結合 型 DcsB においては、金属配位子となっているシステイ ン残基がスルフィン酸へと酸化されており、Cu(II)添 加により DcsB が不可逆的に不活性化されると考えられ た. 銅イオンは酸素と結合し活性酸素種に変換する作用 を持つ.細胞内で活性酸素種が増えたとき、DcsBの不 活性化が起こり、DcsA反応物のNOHAがNOSの基質 として消費されるため、NOの合成が亢進するのではな いかと推測される.

オミックス解析による酵素の探索とその理解

【目的】植物が生産する多糖類はその構成糖や結合様式, 分岐・側鎖構造などによって多種多様であり,これらの 多糖類を分解するために微生物は様々な酵素を生産して いる. 黄麹菌 Aspergillus oryzae はそのゲノム中に300を 超える推定糖質分解酵素を有しているが,それらの多く は機能が未解明である.糖質に作用する酵素はそのアミ ノ酸配列によってGlycoside Hydrolase (GH)ファミリー や Polysaccharide Lyase (PL)ファミリーなどに分類さ れるが,黄麹菌は同一ファミリーに属する酵素を多数保 有しており,これらの酵素は機能分化によって多様な酵 素活性を有していると推察される.

しかし, ゲノム情報や推定酵素のアミノ酸配列だけで は, これらの酵素の機能や分解システム全体における役 割を推察することは困難である.そこで本研究では,種々 の糖質の存在下において培養したA. oryzaeのトランス クリプトーム解析によって,特定の糖質の利用に重要な 酵素を探索し,その酵素学的性質と糖質分解システムに おける役割を明らかにすることを目指す.

【方法】まず,植物由来多糖類を酵素処理することによっ てオリゴ糖を調製した.液体培地で前培養したA. oryzae RIB40株をオリゴ糖(キシログルカンオリゴ糖やアラビ ノキシランオリゴ糖)もしくは単糖(アラビノースやフ コース,ラムノースなど)を含む培地および糖質飢餓培 地に移し,30℃で5時間培養した.濾過器で回収した菌 体から RNAを抽出し, RNA-Seq によってトランスクリ プトーム解析を実施した.特定の糖質で発現が誘導され た推定酵素を Pichia pastoris X-33 株における異種宿主発 現によって調製し,当該推定酵素の機能を解析した.

【結果・考察】A. oryzae において各種糖質で発現が誘導 される遺伝子を探索した結果,糖質の種類によって誘導 される遺伝子が異なること、また、各糖質の存在下で 30~200 程度の遺伝子の発現量が数十~数百倍に誘導さ れることが明らかになった.その中で、ゲノム上で隣接 している2つの遺伝子がキシログルカンオリゴ糖存在下 において発現が誘導されることに着目した.cDNAを鋳 型にした PCR によってこれらの遺伝子の増幅とクローニ ングを試みたが、データベースにおいて予測されていた CDS に基づくプライマーでは増幅することができなかっ た.そこで、cDNA の配列を精査した結果、これら2つ の隣接した遺伝子は独立した2つの遺伝子ではなく、1つ の遺伝子であること(上流側の遺伝子の終止コドンを含

松沢智彦

む一部の領域がスプライシングによって取り除かれ、1つ の CDS となること)が明らかになった.また、当該遺 伝子がコードするアミノ酸配列を解析した結果、GH31 に属する推定酵素であることが示唆された.精製酵素を 調製して機能を解析した結果、当該酵素はα-キシロシ ダーゼであることが明らかになり、AxyC と命名した. AxyC はこれまでに糸状菌において同定されたα-キシロ シダーゼとはアミノ酸配列の類似性が低く、また、pNP基質 (pNP α-D-XyI)には強い活性を示すが、 ${}^{}$ /ソプリメ ベロース (α -XyI-(1→6)-Glc)やキシログルカンオリゴ 糖のキシロース側鎖へはほとんど活性を示さないという 特徴的な基質特異性であることが明らかになった(図1) (Matsuzawa *et al.*, *J. Appl. Glycosci.* 2023, 70:119-125).



図1 新奇α-キシロシダーゼの遺伝子と基質特異性

AxyCに加えて、特定のオリゴ糖や単糖によって発現 が誘導される推定酵素を多数見出している。例えば、キ シログルカンオリゴ糖の側鎖に付加しているフコース残 基を遊離する新規α-L-フコシダーゼの同定にも成功して おり、現在、機能解析を進めている。その他の各種糖質 によって発現が誘導される推定酵素についても、トラン スクリプトームデータを参考にしつつ、順次機能解析を 進めている。

所属 香川大学農学部 E-mail: matsuzawa.tomoiko@kagawa-u.ac.jp

極低濃度の抗生物質が示す新作用:細菌の細胞間形質転換を促進する作用

前田純夫

【目的】第一次産業や医療での抗菌薬の大量常用を原因と する「新規な抗生物質耐性菌の発生・蔓延」が世界的に問 題化している. この「新規耐性菌の発生」は、「耐性遺伝子 の細菌間水平伝播 | が主機構とされる。申請者は近年、極 低濃度(sub-MIC)のアンピシリンが、大腸菌の細胞間形 質転換による遺伝子水平伝播を顕著に促進する新現象を発 見した.本研究では、この「sub-MIC 抗生物質の細菌へ の新作用 に関して、①発生に影響する環境要因の探索、 ② 普遍性検証,および③機構解析を行うことを目的とした. 【方法】実験系は、申請者が過去構築してきた「大腸菌 の気相-固相バイオフィルムでの細胞間形質転換系(外 からの DNA 添加なしに、系内で細胞から細胞ヘプラス ミド DNA が形質転換で移る系.図1左)」を主に用いた. 大腸菌株は、DH5, BW25113, Keio collection 株、プラス ミドは, pHSG299, pHSG299cm, pSY510 および天然プ ラスミドを用いた.

【結果・考察】以下,主要な結果に絞って記述する.まず, 発生に影響する環境要因の探索を sub-MIC アンピシリン を用いた系で行った.発生促進要因に関しては, sub-MIC アンピシリン存在下で増殖させたバイオフィルムへのガ ラス球等による穏和な機械的刺激の適用(図1右)が, sub-MIC 抗生物質で促進される細胞間形質転換を数十 倍促進させることを見出した.この結果を受け,以降の 実験では機械的刺激を併用する方法を主に用いた.



図1 左:実験方法の概略.右:sub-MICアンピシリンと 機械的刺激の細胞間形質転換促進効果.

また他の環境要因では、バイオフィルム培養時の培地 の浸透圧やイオン強度が、細胞間形質転換頻度に百倍か ら千倍幅の大きな変化を与えることを見出し、その最適 値(各1.0-1.70sm/Lおよび0.1-0.3mol/L)を測定した. また、発生抑制要因に関して、バイオフィルム培養時の 各種添加物の影響解析から, 10mg/mLのリゾチームや 300-400μMの銅イオンなどが,約1/2-1/4倍の抑制効 果を示すことを見出した.



次いで、本現象の普遍性検証を行った.抗生物質の種 類の検討では、試した14抗生物質の内、作用機序が異 なる数種の系列に属する12種類で、促進作用を見出し (図2)、促進作用そのものは抗生物質の作用機序の違い に比較的寛容である、という予想外の興味深い結果となっ た.ただし、無添加対照と比べ100倍前後の最も強い促 進効果を示した薬剤3つ(アンピシリン:Amp,アモキシ シリン:Amo,セファレキシン:Cep)は全て細胞壁合成 阻害系であった.これは、高分子DNAが二つの細胞の 細胞表層障壁を透過する際に、細胞壁構造の変化が重要 な引き金となることを示唆する合理的結果と考えられた.

次いで、本現象の機構解析を、大腸菌の個別遺伝子変 異株数十個をDNA受容細胞に用いて行った.その中で、 本現象との合理的繋がりが推察できた結果として、細胞 表層ストレス応答の制御遺伝子(*ompR*, *cpxA*など)の 複数の欠失株が、明確な抑制(1/2-1/10倍)あるいは 促進(数倍前後)効果を現すことを見出した.さらに、 当該ストレス応答レギュロンの下流遺伝子群数十個を調 べた結果、電子伝達系の構成因子遺伝子群の欠失株十数 個が、共通して強い促進効果(数-数十倍)を示すこと を見出した.この結果から、ストレス応答の一つである 電子伝達系の活性制御が、本現象でのDNA取り込みプ ロセスに大きな影響を与える可能性が示唆された.

以上,本研究では,「sub-MIC 抗生物質の細菌への新 作用」に関して,上記の新事実を明らかにすることがで きた.これらは将来的に,抗生物質の細菌遺伝子水平伝 播への関与の新側面解明や,新規抗生物質耐性菌の発生 抑制方法の考案等の応用等に繋がることが期待される. 生体内の GTP 量を感知しエピジェネティックに発現制御される遺伝子の機能解析

【目的】ヘテロクロマチン領域の境界は、ヘテロクロマ チン領域の伸長を止め、ヘテロクロマチン領域の範囲を 規定し、同時に近傍の遺伝子の発現抑制を防止すること が主な機能であると考えられてきた.現在までに、ヘテロ クロマチン領域の境界の変動により遺伝子の発現状態が エピジェネティックに制御されているという報告はなく、 我々は、ヘテロクロマチン領域の境界が状況に応じて変化 し、近傍の遺伝子の発現状態を制御するという、新規の 遺伝子発現調節機構の機能解明を目指し研究を進めた. 現在までに抗 Sir3 抗体を用いた ChIP on chip 解析および、 出芽酵母ヘテロクロマチン形成に必須である SIR3 破壊株 を用いたマイクロアレイ解析により、ヘテロクロマチン領域 の境界変動により制御される候補遺伝子を複数同定した.

【方法】本研究は Saccharomyces cerevisiae を用いて行った. ヘテロクロマチン領域の境界変動により制御される 候補遺伝子中で新規の GTP 合成に関わり, GTP 生合成 阻害剤であるマイコフェノール酸 (MPA) により発現誘 導可能な遺伝子 *IMD2* を選択し, 1細胞追跡システムに より *IMD2* の世代を超えた発現状態変化を解析した. ま た,破壊株ライブラリーを用いた解析および LacZ を用 いた青白スクリーニングにより *IMD2* の発現制御に関わ る因子を同定し,機能解析を行った.

【結果・考察】最初に*IMD2*のORFを、蛍光タンパク質 をコードする遺伝子に取り替え発現状態が可視化出来る 酵母株を作製した.作製した酵母株を用い1細胞追跡実 験を行ったところ、予想に反し、GTP 非枯渇の状態で も分裂を繰り返すと*IMD2*の発現状態が変動し、常に細 胞集団の約30%の細胞で発現していることが明らかと なった(図1).この結果は、GTP 枯渇時に直ぐに発現 誘導が掛かる状態を維持している可能性が示唆された.



図1 ヘテロクロマチン領域内部に存在する *IMD2* が約30% の出芽酵母で発現している様子(蛍光顕微鏡写真)

沖 昌 也

そこで、上記モデルを証明するために、GTP枯渇を 模倣する薬剤であるマイコフェノール酸(MPA)を添加 し、添加前から発現している細胞のマイコフェノール酸 添加後の挙動を、1細胞追跡システムを用い確認した. GTP枯渇前から*IMD2*が発現している細胞を追跡した ところ、予想に反し最初は発現していても分裂を繰り返 すと発現が抑制される細胞が一定数存在し、我々はこの 細胞を「発現経験細胞」と定義した、興味深いことに「発 現経験細胞」にマイコフェノール酸を添加しても「発現 未経験細胞」とは異なり直ぐには発現が誘導されなかっ た. この結果は現在のエピジェネティクス分野で考えら れている「1度経験すると次の経験時には素早く適応出 来るようになる」という概念とは逆の結果である.

また,細胞内のGTPに結合すると構造変換が起こり GFPの蛍光を発するアプタマーの作製に成功した.今後, 開発したアプタマーを使用し,細胞内のGTP量と*IMD2* の発現の関係性を,1細胞追跡システムを用い解析する.

次に、全遺伝子レベルでの網羅的なスクリーニング及 び遺伝子破壊株ライブラリーを用いた解析を併用し、 GTPの枯渇を感知し、*IMD2*の発現を誘導する制御因子 としてヒストンアセチル化酵素のSAGA 複合体の構成因 子である SPT8, NuA4 複合体の構成因子である EAF3, 及び RTT109を同定した.様々な組み合わせの破壊株を 作製し1細胞解析を行った結果から以下のモデルを提唱 する(図2).*IMD2*領域での境界制御はRtt109, SAGA, NuA4とSir 複合体のバランスによって制御されており, OFF 細胞ではSir 複合体が優勢である.ON でも発現量 が少ない状態ではRtt109や SAGA が優勢になっており, ON で発現が高い状態ではRtt109と NuA4 が優位となり 発現状態を制御している.



図2 IMD2の発現制御モデル

また, *RTT109* は複製の際にラギング鎖のヒストン分 配制御に関わっていることが報告されており,上記「ヘ テロクロマチン上での記憶」に複製とヘテロクロマチン の継承が関係するのではないかと考えている.

所属 福井大学学術研究院工学系部門 E-mail: ma4sa6ya@u-fukui.ac.jp

砂漠植物の根部内生微生物の多様性と培養可能な微生物の検証

【目的】砂漠植物は乾燥や貧栄養に対する強いストレス 耐性を有しており、この耐性には根に共生する微生物も 関与している、近年、メタゲノム解析による網羅的な微 生物群集解析と機能推定からのアプローチが主流である が、複数の微生物が植物と共生する中で、微生物が実際 にどのように相互作用を行い、植物への機能を発揮して いるのかは不明な点が多い. この点を明らかにするため には、植物体内に存在する微生物群集を把握した上で、 この情報に基づいて複数種の接種試験を行う必要がある. 本研究では、この前段階として、砂漠植物根の微生物群 集と分離培養した微生物系統の比較を行い、根から分離 培養できる細菌の割合とその系統、そして優占する細菌 の培養可能性について明らかにすることを目的とした. 【方法】 アメリカ,カリフォルニア州のコロラド砂漠か ら採取した土壌を用いて、乾燥および湿潤条件下でキク 科植物, Encelia farinosa を3ヶ月育成した後, 表面殺菌 した根の内生微生物のメタアンプリコン解析を行なっ た. E. farinosa は降水量 135mm の砂漠から 500mm の 半乾燥地まで広く分布し、かつ種子発芽が容易であるた め、異なる水分条件下での乾燥地植物-微生物間相互作 用を調べるのに適した植物種である.採取した土壌に加 えて、採取土壌をオートクレーブ土壌で1000倍に希釈し た希釈土壌処理区を設けた.また、土壌含水率は5%と 11%の2処理区を設けた、この根の一部を用いて、内生 菌および内生細菌の分離培養を行った.残りの根と地上 部は60℃で3日間乾燥した後,乾燥重量を測定した.内 生細菌については、粉砕した植物根懸濁液を用いた希釈 平板法を行った. 培地としては, 1/10 濃度トリプティッ クソイ寒天培地(TSA)およびR2A培地を用いた.85 各植物個体から24コロニーをTSA 培地で培養した後, DNA 抽出, 16SrRNA 遺伝子の PCR, 制限酵素処理 (Hhal および Hae III)を行なった. DNA 断片のパターン解析 をマイクロチップ電気泳動装置(MultiNA,島津製作所) で行い、遺伝子型による種分別を行なった.続いて、 16SrRNA 遺伝子の DNA シーケンスを行い,系統解析と ブラスト解析による種推定を行なった.内生菌は、ゲラ ンガム、コーンミール寒天培地、および麦芽エキス寒天 培地に5mmに切断した根を静置し、生えてくる菌糸を 培養した後、遺伝子解析による種推定を行った(図1). 【結果・考察】植物根に含まれた内生細菌のAmplicon Sequence Variant (ASV) 数は1450であり、植物個体

谷口武士



図1 砂漠植物の根から 分離後,再培養し た内生菌

平均は51.7(最小15,最大120)であった.一方で, PCR-RFLP法に基づいて保存菌株としていた約200種の 細菌は,16SrRNA遺伝子の系統解析の結果,120種ほ どであり,根内に存在した細菌の10%程度であった.



図2 砂漠植物, Encelia farinosa の内生細菌の相対量,および保存菌株の有無,相対量と植物バイオマスとの関係(○:促進,△:促進と抑制の両方,-:有意な関係なし). Dilution:土壌希釈あり, Original:土壌希釈なし,0.05:含水率5%,0.11:含水率11%

全植物個体における相対量の平均が0.5%以上であっ た優占細菌15属のうち、11属で菌株を保存していた (図2).植物重量とそれぞれの微生物の相対量を用いて、 各微生物と植物の回帰分析を行ったところ、優占する細 菌の大部分が植物の成長に関わる可能性が示された.細 菌綱では、Actinomycetes、Alphaproteobacteria、Bacilli, Betaproteobacteria、Cytophagia、Gammaproteobacteria、 Thermoleophiliaで培養できており、遺伝子解析で認め られた36綱の20%弱であった。

真菌については、大部分が子嚢菌門であり、分子同定で きない Eurotiales, Pleosporales, Sordariales, Xylariales の菌種も含まれていた. 担子菌としては Polyporales の *Irpex* 属菌や *Daedalea* 属菌が含まれていた.

本研究を通して,再培養で成長しないもの,そして培 養できないものが依然として多く含まれた.接種試験に 加えて,培養可能な微生物の幅や継代培養を効果的に行 う方法の確立も今後の課題である.

酵母の成長・分裂様式の可塑性の基盤解明

【目的】海は生命の宝庫でありながら、ほとんどの生物 種は未同定とされている.酵母も例外ではなく、海洋環 境から多様な酵母種が採集でき、未記載種も多数存在す る.私たちは最近、研究場所である名大附属臨海実験所 (鳥羽市菅島)の近海から酵母を多数単離し、個々の細 胞をタイムラプス観察した.すると、細胞の密度に応じ て単細胞性(高密度)と多細胞性(低密度)の生活を切 り換える黒色酵母種がいることを見出した.このような 表現型の可塑性は、実験室環境で培養したモデル酵母 (*Schizosaccharomyces pombe* など)では見られない.本 研究では、この驚くべき成長と分裂の可塑性を保障する 基盤的機構の解明を目指した.



図1 黒色酵母の単細胞性/多胞性変換

【方法】 黒 色 酵 母 Dothideomycetes sp. NU30 株 と Dothideomycetes sp. NU200 株について、ゲノム DNA を抽出後. Illumina NovaSeq 6000 システムでシーケン スし、ドラフトゲノムを決定した. 酵母の成長・分裂様 式を評価するのにはタイムラプス顕微鏡観察を行った. 表現型可塑性を失う Hortaea werneckii 株は、進化実験 により取得した.具体的には、培養液を交換することで 培養容器の表面に接着する細胞を約1ヶ月間選抜し続 け、多細胞優勢の株を取得した. 単細胞型の株選抜は培 地を懸濁させる能力が高い性質を利用した.具体的には、 接着型の細胞を持ち込まないよう、懸濁培養液を新たな 培養液に400倍希釈する操作を繰り返した.得られた株 のゲノム DNA 配列を親株と比較し、タンパク質コード 領域に見出された変異を同定した. 複数株で同じ遺伝子 領域に異なる変異が見出された場合、その変異が原因で 表現型が現れたことが強く示唆される.

【結果・考察】周辺海域から数十種以上の真菌類を単離 した.タイムラプス顕微観察の結果,黒色酵母5種が細 胞密度に依存して成長・分裂様式を変換することを見出 した(図1).さらに,酵母の多細胞化は培地中のペプ

五島剛太

チドカクテルが豊富にあるときに起こることがわかっ た.ゲノム情報のなかった2種についてはゲノム解読を 行い,全5種ともDothideomycetes綱に属することが明 らかになった(図2).

次に、Hortaea werneckii NU195株に対して、特定の 表現型を呈した個体を人為的に選抜し続ける進化実験を 行い、培養環境によらず多細胞型の生態を示す株や、逆 に、単細胞性が優勢になる株を取得した。ゲノム配列を 解読したところ、転写因子と想定される Myb様ドメイ ン含有タンパク質や C2HC5型 Zinc フィンガーモチーフ 含有タンパク質,さらには MAPKKK (シグナル伝達関 与キナーゼ) に変異が認められたため、表現型の原 因遺伝子だと結論した。また MAPKKK については NU200株で相同組換え法により遺伝子破壊株を作出し、 同様の表現型が現れることを確認した。具体的には、薬 剤耐性マーカー遺伝子を1kbの相同 DNA 配列の間に挟 んだ PCR 断片を、エレクトロポレーションにより酵母 へ導入した。

以上の実験結果から,採取された黒色酵母は周辺環境 (特に栄養源)を感知し,シグナルが伝達され,遺伝子 発現に変化が生じることが表現型可塑性の基盤であると のモデルが生まれた.また,分子的知見の乏しい表現型 可塑性を細胞レベル,タンパク質レベルで明らかにする ことができる実験系を立ち上げられた.



 図2 分子系統樹.単細胞性/多細胞性変換を示した黒色 酵母はいずれも Dothideomycetes 綱に含まれていた (*で印). SPAdes v3.13.0を用いてゲノム DNA 配 列の de novo アッセンブリを行った.分子系統樹作 成には, RPB2, alpha-Tubulin, TIF5 及び TOP1 遺伝 子のコードするアミノ酸配列をタンデムに繋いだも のを最尤法で解析した. Bifidobacterium bifidum 糖質分解酵素によるムチン糖鎖コア切り分けの分子メカニズムの解明

【目的】粘膜ムチン層の分解は、腸管バリア機能を低下 させ病原体の侵入リスクを増大させる.しかし、ムチン 糖鎖分解活性を有するビフィズス菌 Bifidobacterium bifidum はプロバイオティクスとして知られ、その旺盛 な分解活性にも関わらず人体に対する害悪が認められな いばかりか.むしろヒトの健康増進に貢献し、粘膜恒常 性と菌叢の多様性の維持に寄与するとされる. この理由 の1つに、本菌のムチン分解様式が、病原性菌のそれと 異なる可能性が考えられる.本研究では、ムチン糖鎖の コア構造への作用が予想される糖質加水分解酵素 β-Nacetylglucosaminidase (β-GlcNAc-ase) をコードする未 知遺伝子群に関して、それら酵素の特異性とムチン糖鎖 に対する作用機序を明らかにすることを目的とした.

【方法】ムチンにはブタ胃由来ムチン (PGM)を用いた. 遺伝子発現は定量的 PCR により解析した。細胞表層アン カー型酵素をコードする3つのB. bifidum JCM 1254株 由来 β-GlcNAc-ase 遺伝子, すなわち glycoside hydrolase family 20 (GH20) に分類される bbhI, GH84 に分類さ れる機能未知の bbhIV および bbhV について、大腸菌発 現系を用いて組換え酵素を調製した. さらに相同組換え 法(シングルクロスオーバー)によって B. bifidum 遺伝 子欠損株を作製した. これらを用いて, 基質特異性解析 およびムチングライコーム比較解析を行った.

【結果・考察】B. bifidum JCM 1254 について、PGM を 唯一の炭素源として培養し、遺伝子発現解析を行ったと ころ、対数増殖期において bbhI が 10 倍程度, bbhIV が 2倍程度発現増加した.一方、bbhVの発現量には変化が なかった.次に、様々な基質を用いて組換え酵素の基質 特異性を調べたところ、BbhIはコア3-Thrやラクト-N-トリオース II など非還元末端に β-1,3-GlcNAc 残基を持



図1 薄層クロマトグラフィーによる基質特異性解析.

藤 紀 加 彦

つ構造に対して顕著な特異性を示すこと。BbhIVはコ ア 2-Thr など β-1,6-GlcNAc 残基を持つ糖鎖に特異性を 示した (図1). BbhV は β-1,2/3/6-GlcNAc 残基を含む 各糖鎖構造を加水分解し、広い特異性を示した. さらに、 PGMの各酵素処理後グライコーム比較解析を行ったと ころ、BbhIV処理では未処理 PGM と比べて末端 GlcNAc 残基を有する複数の糖鎖の分解が認められた. さらに菌 体レベルでの基質特異性を検討するため各遺伝子欠損株 を PGM で培養したところ, BbhI⁻株および BbhIV⁻株は 増殖能が低下していた. 続くムチングライコーム解析の 結果,培養後のPGM 総糖鎖量は未処理ムチンと比べて 野生株で1/4程度まで減少したが、BbhI⁻株やBbhIV⁻株 ではその減少幅は低下した. また BbhI 株は非還元末端 に β-1.3-GlcNAc 残基を持つ糖鎖構造を蓄積し、BbhIV⁻ 株はコア2およびコア4を含むβ-1.6-GlcNAc 残基を持 つ糖鎖を蓄積した.以上の結果は、ムチン糖鎖コア構造 がBbhIおよびBbhIVの2つのβ-GlcNAc-aseによる切 り分け、あるいは協働的な分解を受けることを示してい た (図2). 一方, BbhV は様々な基質に対して分解活性 を示したものの、ムチン糖鎖に対して顕著な活性を示さ なかったことからムチン以外の糖鎖の分解に関わる可能 性が示唆された.

ムチン糖鎖に作用する GH84 酵素は本研究において初 めて同定された. GH84 ドメインの系統解析では, BbhIV は哺乳類由来 O-GlcNAc-ase や Bacteroides 属由来酵素と はクレードが異なる一方で, Clostridium perfringens 由来 NagHとはクレードを共有していた. 今後,本研究によっ て得られた知見が疾患との関連の解明へとつながること が期待される.



図2 本研究から推定された Bifidobacterium bifidumの ムチン糖鎖コア構造の分解機序.

TORC1 シグナル経路を介した酵母細胞の高温増殖制御

両 角 佑 一

【目的】分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe)の至適 生育温度は30℃付近であり、37℃を超える高温環境で は生育できず死に至る.しかし、栄養シグナル伝達で中 心的な役割を果たすTORC1キナーゼ複合体をラパマイ シンによって阻害することで、酵母細胞が39℃の高温 でも生育できるようになることを見出した.このことは、 栄養に応答して細胞成長・増殖を促進するTORC1が、 高温環境では増殖を抑えていることを示唆している.そ こで、本研究ではTORC1シグナル経路を介した高温生 育の抑制メカニズムを解明することを目的とした.

【方法】分裂酵母の目的遺伝子の破壊株やアミノ酸配列 置換を導入した変異株を作製し、それらの高温(39℃) での生育を調べた.また,分裂酵母の非必須遺伝子が 1つずつ欠損した遺伝子破壊株ライブラリーを利用した スクリーニングなどにより高温での生育制御に関わる因 子を探索した.相同組換えを利用した遺伝子改変手法に より、同定された因子にGFPやFLAGタグなどが付加さ れた酵母株を作製し、それらを用いて機能解析を行った. 【結果・考察】TORC1キナーゼ複合体の下流で高温生育 抑制に関わる因子を探索するために、既知の基質 (Sck1, Sck2, Psk1, Maf1, Atg13)の遺伝子破壊株の高温生 育を観察した. その結果, sck1 欠損株のみラパマイシン 非存在下でも高温で生育したことから、TORC1はSck1 を介して高温生育を抑制していることがわかった.また. リン酸化部位と予想される残基をアラニンに置換した Sck1を発現する変異株を用いて Sck1 のリン酸化を調べ た結果,462と632番目のスレオニンの置換によりリン 酸化が消失した.加えて.これらを発現する sck1 変異 株は欠損株と同様の高温生育能を示したことから、この 2ヶ所のリン酸化がSck1の機能に重要なことがわかった.

分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いて,高温 生育を抑制する因子を探索した結果,機能未知のMks1 が同定された.Mks1はリン酸化タンパク質であること が報告されていたが,興味深いことにラパマイシンに よってそのリン酸化が消失した.これは,Mks1は TORC1経路によってリン酸化されることを示唆してお り,実際に共免疫沈降法(Co-IP)によりMks1とTORC1 の相互作用が検出されたことから,Mks1はTORC1の 基質であることが示された.また,sck1とmks1の二重 遺伝子破壊によって相加的に高温生育が亢進することか ら,TORC1はSck1とMks1の2つの独立した経路を介 して高温生育を抑制することがわかった(図1).



図1 TORC1経路による高温増殖抑制モデル

次に,野生株を用いて高温生育能を獲得した自然突然 変異体をスクリーニングした.その結果,Rad24の185 番目のグルタミン酸がバリンに置換されたE185V 変異 が同定されたが,驚くべきことにRad24とMks1の相互 作用が検出され,その変異によって相互作用が減弱した (図2).このことから,Mks1はRad24と複合体を形成し, 高温耐性を抑制していることが示された(図1).



 図2 rad24-E185V (EV) 変異の効果
(右)段階希釈した培養液を寒天培地にスポットし、 各温度での生育を観察. rad24EV 変異株は39℃で 生育を示す.(左)供免疫沈降法による Rad24 と Mks1の相互作用検出. Rad24EV は Mks1 との相互 作用が弱まっている.

Mks1-Rad24 複合体の機能解明を目指して、その相互 作用因子を Co-IP により探索した結果、小胞輸送に関わ る因子が多数同定された.特筆すべきことに、遺伝子破 壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにおいて、小 胞輸送に関わる ArfGAP を欠損するとラパマイシン存在 下でも高温で生育できなくなることを発見した.これら の結果から、分裂酵母が高温で生育するうえで、小胞輸 送が重要な鍵を握っており、Mks1-Rad24 複合体が小胞 輸送制御に関わることが示唆された.

バイオエコノミー技術への貢献を志向した 植物ホルモン様物質による微細藻類の増殖制御と回収法の開発

高橋利幸

【目的】微細藻類は、化学製品、食品など広い分野で期 待される次世代バイオマスとして注目が高い.一方、有 用発酵微生物と比べ、微細藻類の増殖は遅く、量の確保 が恒常的な課題である.微細藻類の培養・回収技術の律 速は最終製品の高価格につながっている.本研究では、 微細藻類の新規培養・回収技術の開発を目的として、植 物ホルモン様物質の微細藻類に対する評価を行った.

【方法】モデル微細藻類の緑藻クロレラ(東京大学IAM カルチャーコレクション由来の Parachlorella kessleri 【C-531株】)に対して、植物ホルモンのジャスモン酸(ジャ スモン酸【JA】及びメチルエステル誘導体【ジャスモン酸メ チル, MJ】)の作用を検証した. JAと MJ はわずかな作用 効率の違いはあるが、ほぼ同等の結果だったため、紙面 都合上,今回は主に MJの結果を示す. MJ 含有培地でク ロレラ (1×10⁶ cells/ml)を培養し (23℃, 12 時間毎の明 暗周期), 藻類細胞量は培養容器外観と藻類 DNA 量で 評価し、藻類の凝集性は顕微鏡観察、分光法とフローサ イトメトリー (FCM) 法で評価した. また, MJ処理した 藻類の凝集機構の検討のため、培養液の化学特性をpH 測定とソルバトクロミズムによる極性解析で評価した. さ らに, MJ処理後の藻類の変化は, 藻類の生理的指標(光 合成色素量、光合成指標及び細胞内脂質量など)を分光 法, PAM 蛍光法や蛍光分光法でそれぞれ評価した.

【結果・考察】一般に,植物体内の離れた器官同士(また は異なる植物体の間)で作用する植物ホルモンが,単細 胞性の微細藻類に対してどのように反応するのか知見は少 ない.今回,植物の障害応答や老化などと関係する植物 ホルモンのジャスモン酸類を用いて,微細藻類のクロレラ に対する作用を評価した.その結果,MJの処理濃度によ りクロレラに対する作用が異なった.具体的には,MJ 濃度 0.5wt%程度の高濃度では,藻類は生育不良による 白化(光合成色素の退色)が起こり,植物の老化を想起 するような作用を誘導した.一方,低濃度のMJ処理(≦ 0.05wt%)では,微細藻類の増殖誘導が起きた(図1).

また、実験で使用した浮遊・単細胞性の微細藻類細胞 (直径5µm前後)は目視困難だが、興味深い現象として、 MJ処理すると目視可能な藻類凝集塊が生じた. MJ処 理した微細藻類の凝集の程度を顕微鏡観察とFCM分析 した結果、凝集反応は極めて低濃度のMJでも生じ、藻 類凝集塊の維持はMJ濃度により差があった(図2).

MJ処理による凝集発生と維持の要因を探るため, MJ 処理後の培養液を分析した結果, MJ処理により一過的



図1 MJ処理によるクロレラ細胞の増殖性の変化

なpHの低下と培養溶媒の低極性化という培養環境の変 化が観察された.この変化が、藻類細胞の表面荷電の変 化を誘導した結果、溶媒中の水分子と藻類細胞との間の 相互作用の変化を引き起こし、藻類凝集塊を発生させた 可能性が示唆された.10分程度ではほぼ沈降しなかっ た未処理クロレラに対して、MJ処理で生じた藻類凝集 塊は1~3分でも迅速に自然沈降した.したがって、MJ 処理による藻類の凝集性は、藻類の回収技術へ転用可能 である.紙面都合で詳細は割愛するが、MJ処理した藻 類の生理的指標(光合成色素量,光合成効率及び細胞内 脂質量)にもMJ濃度により影響の差が観測された.

A) Control	B) MJ 0.001%
200 um	200 um
C) MI0.0079/	D) MI0.01%
C) MJ 0.005%	D) 115 0.0170
<u>C) NJ 0.005 %</u>	17 113 0.0170
	D) 113 0.0170

図2 低濃度 MJ処理で誘発された微細藻類細胞の凝集塊. 画像の白色は藻類細胞のクロロフィル蛍光を示す.

バイオエコノミーの一翼として微細藻類を使用する上 で、農業に成長調整剤等として使用される植物ホルモン のように、微細藻類の増殖調整や機能増強に役立つ天然 物は有用性が高く、市場ニーズも期待できる. MJ処理 により微細藻類の遺伝子発現にどのような変化が起こる のか、分子レベルの検討は時間の都合から現在も実験中 で結論が出ていない. この分子機構の解明は、MJ処理 で生じる諸現象の効率化に貢献するとともに、MJ処理 で作製した微細藻類製品の安全性などの質的評価に重要 であるため、引き続き検証が必要である.

腸炎ビブリオ菌が腸管の粘性環境に応答して病原性を発揮する仕組みの解明

寺 島 浩 行

【目的】腸炎ビブリオは、炎症性の下痢を伴う胃腸炎の 起因菌である.本菌の病原性には、耐熱性溶血毒 TDH と2種類のIII型分泌装置が重要な働きをすることが明 らかにされてきた.しかしながら、毒素や病原性装置は 適切な場所・タイミングで使用しない限り、細菌にとっ て十分な効果が発揮されないはずである.例えば、III 型分泌装置は、宿主細胞内に直接病原性因子を送り込む 注射器として働くため、宿主細胞に接着していないと全 く病原性を発揮できない.本研究では、「腸炎ビブリオ が腸管環境にどのように応答するのか?」、「粘性環境に どのように適応するのか?」と言った点を明らかにし、 運動性と病原性を連結させた包括的な感染メカニズムの 解明を目指した.

【方法・結果・考察】べん毛運動する細菌は、走化性に よって移動が制御される.走化性は、周囲の化学物質な どを感知し、より適切な方向へ移動する能力である.腸 炎ビブリオは小腸に感染するため、小腸に存在する化学 物質に走化性応答していると考えた.そこで、ヒト腸内 に存在する代謝産物や構成成分に対して、腸炎ビブリオ が誘引される、あるいは忌避されるかどうか検証した. キャピラリーアッセイによって、走化性応答の定量的な 解析をおこなった.その結果、乳酸、プロピオン酸、酪 酸、ピルビン酸を含む毛細管の中に菌が誘引され、誘引 物質であることが示唆された(図1).また、酢酸を含 む毛細管の中には野生型は誘引されなかったが、走化性 受容体 mcp27 変異体では誘引されたことから、Mcp27



が酢酸を忌避物質として認識していることが示唆され た.次に,見出した誘引物質,忌避物質を認識する走化 性受容体の同定を行なった.走化性受容体は,化学物質 を結合すると,フィードバック制御によりメチル化(誘 引物質)・脱メチル化(忌避物質)を受ける.この特性 を利用し,走化性物質によってメチル化・脱メチル化修 節を受ける受容体を探索した.その結果,Mcp1がピル ビン酸・乳酸・セリンを,Mcp27がプロピオン酸・酪 酸を,Mcp28が乳酸・プロピオン酸・酪酸を誘引物質 として認識していた.また,Mcp27については,酢酸 を忌避物質として認識していた.Mcp1のセンサードメ インのX線結晶構造解析を行い,乳酸・ピルビン酸が 結合した立体構造を解明した.現在,走化性物質と受容 体の特定と探索を行っている.

腸炎ビブリオは、水中では桿菌状で1本の極べん毛を 生やし泳ぐ.一方で,腸管のような粘性表面では細胞が 伸長し、細胞周囲から多数の側べん毛を生やし表面を這 う(はう).まず、寒天培地上での菌集団の運動活性の 変化を観察した、その結果、寒天培地上にスポットした 菌液のエッジ部の菌だけが、最初に表面運動を始めた. 時間経過とともに、エッジ部から内部へと表面運動する 菌が広がっていった.この結果は、菌スポットのエッジ 部に表面運動を誘導する刺激が存在することを想像させ た、そこで、運動活性の変化のメカニズムを明らかにす るために、表面運動能が変化した変異体の取得を目指し た.3% (w/v) NaCl 含有 LB 培地 1.3% (w/v) 寒天培地上, 37°Cで表面運動をさせ、運動活性が上昇する変異体を 取得した.結果として、β-ラクタム系抗菌薬耐性に関わ る二成分制御系 VbrK/VbrR が影響することを見出し た. VbrK/VbrRは, β-ラクタム系抗菌薬への暴露によっ て, β-ラクタマーゼの発現を誘導する二成分制御系であ り, β-ラクタム系抗菌薬を直接感知するか, あるいはペ プチドグリカンの恒常性をモニターしていると考えられ ている. VbrK/VbrR が欠損した変異体では、野生型に 比べ、寒天培地上での37°Cでの表面運動能が高かった。 この結果は、VbrK/VbrRシステムはペプチドグリカン の状態を感知し、その環境に適したペプチドグリカンへ の再構成を制御するが、欠損株では再構成が起きず表面 運動能が高い状態で維持されたと考えている。我々は、 ペプチドグリカンに対する何らかの刺激が表面運動を制 御することを現在想定している.

所属 長崎大学熱帯医学研究所, 現金城学院大学薬学部 E-mail: terashimah24@kinjo-u.ac.jp

麹菌の製麹時に見られる発熱現象の分子生物学的,生化学的解析

外 山 博 英

【目的】微生物が関与する発熱現象には、牛糞などのた い肥化時のバチルス属細菌による発熱現象、酵母や酢酸 菌による発酵過程での発熱現象,麹菌による製麹時の発 熱現象などが知られている. 生物による発熱現象は, 代 謝において物質生産やATP 生産などに利用されなかっ たエネルギーが熱として放出されていると一般的には言 われている。しかし具体的な発熱メカニズムについては 解明されていない、近年の研究において、動物細胞の運 動を伴わない発熱現象には、ミトコンドリアに存在する 輸送タンパク質の一種である UCP (Uncoupler protein) が関与すること、ザゼンソウが開花するときに雪を溶か す様な植物の発熱現象には、ミトコンドリアに存在する 代替末端酵素(Alternative oxidase: AOX)が関与する ことが示唆されている. 麹菌による製麹時には、適切な 温度管理をしないと「麹が焼ける」といわれるほどの発 熱が起こることが知られている。これらの麹菌ゲノム中 には植物のAOXのホモログ遺伝子が存在しており、植 物での発熱現象のようにミトコンドリア及び AOX が関 与していることが予想できる. そこで, まず麹菌の製麹 時における発熱反応に AOX が直接関与しているかどう かを調べることを目的とした.

【方法】沖縄の伝統的な蒸留酒,泡盛の醸造に使用され ている黒麹菌 Aspergillus luchuensis のゲノム配列中には UCP 遺伝子は存在せず, aoxA 遺伝子が1つ存在してい る.そこで, aoxA 遺伝子の破壊株 (ΔaoxA),過剰発現 株 (OEaoxA)を黒麹菌 ΔligD 株 (親株)を宿主にプロ トプラスト・PEG 法により造成した.製麹は手入れを 必要としない無通風箱培養法にて行い,小型温度ロガー を用いた詳細な品温測定を行った.得られた米麹の抽出 液を作成し,クエン酸定量キットを用いてクエン酸量の 測定を行った.また,メタボローム解析については, ヒューマン・メタボローム社に委託した.

【結果・考察】黒麹菌 ΔaoxA 及び OEaoxA 株は、ゲノム PCR にて、目的の位置で相同組換えが行われているこ とが確認された.続いて、ΔaoxA、OEaoxA 株の無通風 箱培養法による製麹を行い、詳細な品温測定を行った. その結果、親株と比較して、ΔaoxA 株で僅かに高く、 OEaoxA 株で僅かに低い品温となり、当初の予想とは逆 の結果となった.以上の結果から、AoxA が発熱現象の 直接的な要因となっていないことが示唆された.一方で、 AoxA 自身の役割を明らかにするために、ΔaoxA 株の培 養 48 時間後の米麹サンプルのメタボローム解析を行っ た.その結果、親株と比較していくらかの変化が観察さ

れた. 両菌株の間で生育に大きな違いがないことは確認 している. 乾燥米麹重量当たりの比較なので有意差があ るかは疑問が残るが、特にATP 量の増加が見られた。 AoxA が存在しないことで通常よりプロトン輸送が活発 となり、親株より多くのATPが生産されていることが 予想された。また、近縁種のA. nigerでは、AoxA がク エン酸生産に関係すると報告がある。そこで、黒麹菌に おいてもクエン酸産生用液体培地で調べたところ、同様 に ∆aoxA で減少し、OEaoxA で増加することが観察され た.固体培養においても同様の結果になるかを調べるた めに、仕舞仕事後に温度を下げることでクエン酸生産を 促す焼酎・泡盛用製麹を行った所, ΔaoxA株で減少し, OEaoxA株で増加することが明らかとなった(図1). 更に、本製麹の場合も ΔaoxA 株での最高品温が若干高 くなる傾向が観察された. そこで、クエン酸産生量と品 温との関係を調べるために、他の研究グループが既に取 得していた白麹菌のクエン酸低生産株群を用いた品温測 定を行った. その結果,通常の出麹時間では、菌体外に クエン酸を排出する cexA 遺伝子破壊株やミトコンドリ アからクエン酸を排出する、yhmA 及び ctpA 二重遺伝子 破壊株で有意に品温が低くなった(図2).一方,製麹 時間を延ばすことで、親株と同程度の品温まで上昇する ことが観察されたが、品温曲線が明らかに親株と異なっ ているため、今後、クエン酸生産と発熱との関係性をよ り詳細に検討する必要があると考えられた.



図1 固体培養における ∆aoxAと OEaoxA のクエン酸量





所属 琉球大学農学部 E-mail: toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp

ゲノム構造から紐解くヒト常在性日和見レンサ球菌の病原性進化メカニズム

田端厚之

【目的】ヒト咽頭口腔内に常在する日和見レンサ球菌で あるミティス群レンサ球菌(MGS)には溶血性を示す株 も見出されており、その溶血因子としてタンパク質溶血 毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC) が報告されている.興味深いことに、CDCのコード遺 伝子は同菌種の非溶血株の染色体上の特定の位置に挿入 された遺伝子配座をとる.そこで本研究では、日和見レ ンサ球菌の病原性進化に携わるゲノム構造の特徴を見出 し、病原性進化のメカニズムの全容を明らかにすること を目指した.具体的には、CDC遺伝子の有無に基づいた 日和見病原性レンサ球菌の比較ゲノム解析より、CDC遺伝 子の獲得に携わるゲノム構造や関連因子の探索を行った. また、CDC遺伝子保有株の特性についても検討した.

【方法】本研究では、MGSに属する Streptococcus infantis に注目し、研究室保有株の中で溶血性を示す株(SInf_1 ~SInf_4)を被検株とした.被検株のゲノム配列は、 ショートリードシーケンスとロングリードシーケンスの ハイブリッドシーケンスにより高精度に決定した.得ら れたゲノム配列のアノテーションはDFASTを用いて行 い、遺伝子配座は drawGeneArrows3等のソフトウェア を用いて可視化した.また、ゲノム上におけるファージ 関連遺伝子は PHASTEST を利用して探索した.被検株 の培養は、基本条件としてブレインハートインフュー ジョン培地を用い、5% CO₂存在条件下で37℃にて実 施した.被検株の表現型として、溶血特性やファージ誘 発についても検討を行った.

【結果・考察】本研究では、ハイブリッドシーケンスに より、被検株ゲノムの完全長配列(205.5kb~220.0kb) を決定した.検討した4株中の2株(SInf_1および SInf_4)については、プラスミドと考えられる環状DNA (5.5kbおよび4.5kb)も確認された(表1).

表1 被検株の可動性遺伝因子および形質転換関連因子

	SInf_1	SInf_2	SInf_3	SInf_4
Chromosome	205.5 kb	209.5 kb	207.0 kb	220.0 kb
Plasmid	+	-	-	+
Prophage	intact	intact	intact	-
Transposase	3	47	6	35
comCDE	+	+	+	+

また,得られた配列情報について PHASTEST でファー ジ関連遺伝子の探索を行った結果,SInf_4 以外の3 株に ついて溶原性ファージの存在を示唆する結果が得られ,マ イトマイシンによるファージ誘発試験の結果より,SInf_1 お よび SInf_2 についてファージ誘発に起因すると考えられる 培養液の濁度低下が確認された. この溶原性ファージゲノ ム内には CDC 遺伝子は確認されなかったが,溶原性ファー ジの感染に伴うダイナミックなゲノム構造の改変を基点とし た S. infantis の形質変化の可能性が示唆された.

また、DFASTによるアノテーション結果に基づいて、 CDC 遺伝子周辺配列の詳細な解析を行った.その結果、 被検株が保有する CDC 遺伝子は、CDC 遺伝子を保有し ない S. infantis 基準株(S. infantis^T)のゲノム上の特定 の位置,具体的には翻訳因子 Sua5のコード遺伝子と McrCファミリータンパク質のコード遺伝子の間に挿入 されていることが明らかとなった(図1).興味深いこ とに、被検株のゲノム上には多くのトランスポザーゼの コード遺伝子(部分配列を含む)が確認され、SInf_2株 では CDC 遺伝子の近傍に IS630 も確認された.加えて、 被検株の染色体上には、外来遺伝因子の菌体内取り込み に機能する受容能促進ペプチドとその感知システムを コードする comCDE オペロンの存在も確認された(表1). 以上の特徴的なゲノム構造に関する情報に基づいて、S. infantis における CDC 遺伝子の水平伝播が示唆された.



図1 S. infantis と類縁菌染色体の CDC 遺伝子挿入部位

ところで、CDC 遺伝子を保有する S. infantis 株の溶 血特性の検討結果より、S. infantis が産生する CDC は 他の動物種赤血球と比較して、ヒト赤血球に指向的な溶 血特性を示した.よって、ヒト咽頭口腔内に常在する日 和見病原性の S. infantis は、溶原性ファージの感染によ るダイナミックなゲノム構造の改変や病原因子遺伝子の 水平伝播により、宿主であるヒトに対する病原性を発揮 するように進化している可能性が示唆された.本研究に おいて S. infantis で確認された事象は、他のヒト咽頭口 腔常在性レンサ球菌でも生じている可能性が考えられ、 メタゲノム解析等の微生物集団を対象とした網羅的な解 析手法による検討も期待される.日和見病原菌と認識され ているヒト咽頭口腔常在性レンサ球菌の真の病原性の解明 には更なる研究が必要であり、現在も検討を進めている. エゾマツの天然更新を阻害する雪腐病菌の種構成と冬季の環境条件との関係の解明

【目的】北海道の森林の主要な構成種であるエゾマツは, 地表では天然更新しない. その大きな理由は,種子や実 生が積雪下で暗色雪腐病菌(*Herpotrichia juniperi*)に 侵されるためとされている.しかし,東京大学北海道演 習林(北海道富良野市;以下,北演)での予備調査の結 果,*H. juniperi*以外にも複数種の菌類がエゾマツ種子か ら分離され,未知の雪腐病菌の天然更新阻害への関与が 推測された.そこで本研究では,エゾマツの種子や稚樹 を加害する雪腐病菌の種を特定し,積雪下での各菌種の 生態を明らかにすることを目的とした.

【方法】北演において,積雪期間が1~2週間程度異な る標高500m(低標高)と700m(高標高)の天然林各6ヶ 所に調査地を設定し,2021年10月にエゾマツ種子を入 れたシードバッグを設置し,2022年5月に回収した. また,帯広の森(北海道帯広市内:以下,帯広)におい て,同じ標高(同じ環境)で落葉の樹種組成が異なるア カエゾマツ(Pg),トドマツ(As),シラカンバ(Bp)の 各人工林1ヶ所に,同様のシードバッグを2022年11月 に設置し,2023年4月に回収した.回収した種子から 菌を分離した後,rDNA ITS領域の塩基配列により分離 菌株をOTU(操作的分類単位)に分けた.さらに*H. juniperi*菌株については,分子系統解析により種内系統 を決定した.また,各OTUの病原性と病原力を評価す るため,エゾマツ種子に対する接種試験を行った.

各 OTUの土壌中の分布や積雪下の生態を明らかにす るため、北演の低標高と高標高の各 3 調査地において、 夏季および積雪下の土壌およびリター層に生息する菌類 群集と、秋に落下した葉(落葉)に積雪下で定着する菌 類群集をメタバーゴーディングにより調べた.

一方,本研究において,生きた菌株がないために分類 学的位置付けが不明であった雪腐病菌 Phacidium abietis の菌株を分離できたため,分離菌株の形態観察と系統解 析により, P. abietis の分類学的再検討を行った.

【結果・考察】北演からは254 菌株が分離され,それら は26 OTU (OTU1~26) に分けられた(表1).分離率 の高かったOTU1 は H. juniperi, OTU2 は Neonectria candida と同定され,低標高では後者の,高標高では前 者の分離率が高い傾向がみられた.接種試験の結果,25 OTUで病原性が認められ,表1のOTU1~3と5を含 む15 OTU は種子の発芽を100%阻害した.帯広からは 80 菌株が分離され,北演では分離されなかった5 OTU

松下範久

(OTU 27~31)を含む11 OTUに分けられた.分離率 の高かったOTU5 はビョウタケ目菌(Helotiales sp.), OTU27 はキチャワンタケ(*Caloscypha fulgens*)と同定 された.以上のように、本研究により,*H. juniperi*とキ チャワンタケ以外に、新たに29 OTUが積雪下で針葉樹 種子に感染することが確認され、場所によっては*H. juniperi*以外の菌種がエゾマツの発芽阻害に大きく関与 していることが示唆された.

*H. juniperi*の菌株は3つの種内系統G1~G3に分けられた. 北演では,低標高にG1とG2,高標高にG2とG3 が優占していた.帯広ではG2は分離されず,As林とBp林にG1,Pg林にG3が優占していた. 北演の積雪量は帯広よりも多く,帯広の3調査地は同じ標高に位置することから,G2の分布には積雪量が,G1とG3の分布には森林の構成樹種が影響を及ぼしていると推測された.

北演の6調査地について菌類群集を調べた結果, H. juniperiは全調査地のリター層と土壌から検出されたが, 相対存在量の平均は夏季が1.1%,積雪下が0.4%と低く, 積雪下で相対存在量が増加する傾向もみられなかった. 一方,落葉でのH. juniperiの相対存在量は平均6.9%と 高かった. N. candia は,種子への感染率が高かった低 標高においても,積雪下のリター層や土壌での相対存在 量がH. juniperiより多い傾向はなく,落葉での相対存在 量も平均0.8%と低かった.以上のことから, H. juniperi は,積雪下の落葉に定着・増殖しながら種子に感染する のに対し, N. candida は,わずかな感染源が高い感染力 によって種子に感染することが示唆された.

P. abietisの分類学的再検討を行った結果,該当する既 知種が存在しなかったことから,新属新種のChionobium takahashii として報告し,菌株を寄託した.

表1 主なOTUの分離率と接種試験での発芽阻害率(%)

OTU	分離率(%)				発芽	
	北演			帯広		
	低標高	高標高	Pg 林	As 林	Bp 林	(%)
1	25.8	49.7	56.3	54.5	37.5	100
2	46.5	3.3			6.3	100
3	0.6		9.4			100
5	0.6	3.3		3.0	21.9	100
27				18.2		未調査
全 OTU 数	14	18	5	7	6	

異なる木質基質に依存するシロアリ腸内微生物叢の解析

【目的】下等シロアリは後腸内に多様な原生生物とバク テリアを保有しており、これらがシロアリによる木材消 化に大きく貢献していることが知られている.木材の主 成分は主に植物の二次細胞壁であり、セルロース、ヘミ セルロース、リグニンから構成される.また、植物発生 の初期過程で合成される一次細胞壁はリグニンを欠いて いるが、ペクチンが多く含まれている、本研究では、下 等シロアリの一種であり、沖縄島の立枯樹に広く分布す るスギオシロアリにセルロース, ヘミセルロースの主成 分のひとつであるキシラン、リグニン、または一次細胞 壁の主成分であるペクチンを構成するポリガラクツロン 酸のいずれかを2週間摂食させることによって腸内微生 物叢を改変し、各基質に本質的に依存するシロアリの腸 内微生物叢の全容を解明することを当初の目的とした. 【方法】木材、セルロース、キシラン、ポリガラクツロ ン酸、またはリグニンのいずれかをスギオシロアリ (Neotermes sugioi (琉球大学内採集)) に2週間摂食させ た、各摂食処理区(以降、処理区と表記)のシロアリ後 腸内容物を4% PFAで固定し、血球計算盤を用いて腸内 の原生生物細胞数をカウントした。また、各処理区の後腸 からDNAを抽出し、16SrRNAまたは18SrRNA遺伝子 V3-V4 領域についてアンプリコン解析を行った. 16SrRNA 遺伝子については、qPCRによる定量も実施した. さら に、各処理区の後腸より抽出したトータル RNA より作 製した cDNA ライブラリーについて、サンプル当たり約 5000万リードの次世代シーケンスを実施した. Trinity に よる全リードのアセンブルの後, run dbcan Python パッ ケージを用いて処理区別に糖質修飾酵素の解析を行った. 【結果・考察】木材やセルロースを摂食した場合に比べ、 その他の基質を摂食した場合では原生生物細胞数が有意 に減少していた(図1A). また. 16S rRNA 遺伝子に対 する定量 PCRの結果,いずれの基質を摂食させた場合に おいてもrRNA 遺伝子のコピー数に有意差はなく、後腸 内バクテリアの絶対数に大きな変化はないことが示唆さ れた (図1B). 原生生物の 18SrRNA 遺伝子およびバクテ リアの16SrRNA遺伝子に対するアンプリコン解析の結果、 木材やセルロース食に比べて他の基質を摂食した場合に は、Devescovina 属や Foaina 属原生生物の相対量が減少 しており、それに伴い原生生物の共生バクテリアとして 知られる Armantifilum 属バクテリアの相対量も減少して いた. また, Bacteroidota 門のうち, Azobacteroidaceae 科 のバクテリアは木材やセルロース以外の基質を摂食させ

徳 田 岳

た場合に相対量が大きく減少しており、Spirochaetota 門 に属する Termitinemataceae 科のバクテリアは木材、セ ルロース、またはキシラン以外を摂食させた場合に、相 対量が減少する傾向にあった.



図1 各処理区における後腸内原生生物数(A)と16SrRNA 遺伝子のコピー数(B)(Turkey-Kramer p<0.01)

後腸内共生微生物が消化に果たす機能を明らかにする ため、各処理区においてメタトランスクリプトーム解析 を実施した.後腸微生物由来のリードを全てアセンブル した結果、合計約350万個の遺伝子に由来すると推定さ れる 500 万個の転写産物を得た. このうち糖質の修飾に 関わる転写産物は最低 43,000 個あると推定され, 糖質分 解に関与すると考えられたものは約27,000 個であった. このうち、Glycoside hydrolase ファミリー (GH)7 およ び GH45 セルラーゼや Carbohydrate-binding module ファミリー13は木材やセルロース摂食時に高発現して おり、原生生物の増減とよく似た挙動を示した. このこ とから、特定の原生生物がシロアリ腸内のセルロース消 化に重要な役割を果たしていることが示唆された.反対 にGH18キチナーゼはペクチンやリグニン摂食時に発現 量が増加していたことから、木質基質欠乏時にはキチン が重要な炭素源となっていることが示唆された(表1). また、ペクチナーゼ発現はペクチン摂食時に増加しており、 シロアリは二次細胞壁を主食とする反面、潜在的にはペク チンを分解する能力も併せ持っていることが示唆された.

表1 各処理区で発現する全GHに占める代表的なGHの 発現割合

Family	木材	セルロース	キシラン	ペクチン	リグニン
GH7	37.2%	40.1%	9.3%	6.8%	14.0%
GH18	3.2%	2.7%	8.6%	13.0%	20.2%
GH45	6.8%	7.3%	0.0%	0.0%	0.1%

細菌外膜の機能維持に関与するシャペロン/プロテアーゼの新規機能の解析

【目的】細菌外膜タンパク質は細胞質で合成された後、 内膜を透過し、ペリプラズム空間を経て BAM 複合体の 働きで外膜に組み込まれる。BepA はペリプラズム空間 に存在するプロテアーゼで、シャペロン様活性により外 膜タンパク質 LptD の生合成を助けるとともに、LptD の生合成が阻害された際はプロテアーゼ活性により LptDを分解することで、外膜機能の維持に寄与してい る. BepAを欠失する大腸菌は、エリスロマイシンなど 通常は外膜を透過しない抗生物質に対して感受性を示す ことから、外膜の透過障壁としての機能が低下している と考えられる.また,BepAとBAM 複合体の構成因子 である BamBを同時に欠失する株は SDS に対して高度 に感受性を示す. bepA 欠失株の外膜機能が低下する要 因としてはLptD の生合成阻害が考えられるが、LptD の生合成を促進する働きのある LptE を過剰発現しても、 bepA/bamB 欠失株の SDS 感受性は回復しない.本研究 では bebA/bamB 欠失株の SDS 感受性の原因を探ること で、BepAのLptD 生合成以外の新規機能を探究した.

【方法】大腸菌 Escherichia coli K-12 株の bepA/bamB 欠 失株から,SDS に対して耐性を示すようになった変異 株の選択を試みた.SDS 耐性株を選択するにあたり,1% SDS を含む LB 寒天培地に最終濃度 0.2% となるよう様々 な糖を加え,大腸菌培養液を塗布したところ,培地に加 えた糖によって SDS に対する感受性が変化した(図1). グルコースを加えた培地では SDS に対する感受性が軽 減されたのに対し,マルトースを加えた培地では SDS 感受性が亢進した.そこで,マルトースを含む培地を用 いて SDS 耐性株を選択し,全ゲノムシーケンシングに よって変異部位の特定を行った.



図1 SDSを含む培地における bepA/bamB 欠失株の生育

【結果・考察】変異部位を特定した2株のSDS耐性株は、 いずれもアデニル酸シクラーゼをコードする cyaA 遺伝 子に変異を有していた.野生株からPCRで増幅した野 生型 cyaAをクローン化したプラスミドを耐性株に導入 するとSDS 感受性を示すようになったことから、耐性株

成 田 新一郎

ではアデニル酸シクラーゼの機能が低下することで SDS に対して耐性を獲得していることが示唆された.また, cAMP 非依存性の CRP (I112L/T127I/A144T) 変異体を 発現させると,耐性株が SDS 感受性を示した.以上より, 耐性株では, cAMP-CRP 依存的な遺伝子の転写誘導が 抑えられることで, SDS に耐性化していると考えられた.

cAMP-CRPレギュロンには500以上の遺伝子が含ま れ、糖質代謝などに関わる多くのオペロンの転写が制御 される.本研究ではこのうち、外膜機能に直接関与する と考えられる遺伝子に着目し、これらの遺伝子を不活化 することで bepA/bamB 欠失株が SDS に耐性化するかど うかを検討した.その結果,fadL または lamBを欠失す れば、bepA/bamB 欠失株が SDS に対して耐性になるこ とがわかった(図2).FadL と LamB はそれぞれマルトー スと長鎖脂肪酸の取り込みに関与する外膜タンパク質で ある.今回単離した SDS 耐性株では FadL および LamB の発現量が低下していた.反対に、耐性株にプラスミド を導入して FadL や LamB を過剰発現させると、SDS 感 受性を示すようになった.



図2 SDSを含む培地における bepA/bamB 欠失株, SDS 耐性株, fadL 欠失株, lamB 欠失株の生育

以上の結果から、bepA/bamB欠失株のSDS 感受性は、 以下ような機序で顕れたものと考えられる.グルコース が枯渇すると、大腸菌はアデニル酸シクラーゼの活性化、 cAMP 濃度の上昇、cAMP-CRP 依存的な転写制御によっ て、炭素源とエネルギー源の欠乏に対応しようとする. この応答には FadL や LamB のような外膜タンパク質も 必要であるが、BepAや BamB がないとミスフォールド したこれらの外膜タンパク質が蓄積し、外膜機能の低下 を引き起こすと考えられる.したがって、BepAや BamB は、外膜機能の維持を介して、細菌が炭素源やエネル ギー源の変化に順応するのに貢献していると言える.

超好熱性アーキアにおける RNA 耐熱化機構の研究

【目的】(超) 好熱菌の場合,特定のtRNA修飾ヌクレオ シドが高温下の生育に必須であることが知られている. しかしながら,生育温度の上昇に従って,どのような tRNA修飾ヌクレオシドが増加し出現するかは分かって いない.アーキアに特有のアーケオシン(7-アミジン-7-デアザグアニン)は超好熱アーキアが93℃以上の高温下 で生育するのに必須因子であるが,詳細な合成機構は未 解明である.本研究では,超好熱アーキア Thermococcus kodakarensis(Tko)において,(1)生育温度依存的に誘 導される tRNA修飾ヌクレオシドの種類と量の変化を調 べ,(2)アーケオシン合成過程における最後の2段階反 応を担う tRNA修飾酵素複合体(ArcS-RaSEA)の基質 触媒機構を分子レベルで解明することを目的とした.

【方法】*Tko* KUW1株を70℃,85℃,93℃の各温度で培養後,各菌体から*Tko* tRNA^{Trp}を精製し,RNA分解酵素 によりフラグメント化後,修飾ヌクレオシドの存在量を質量 分析により調べた.次に,ArcS-RaSEA複合体,¹⁴C-Lys および各基質(アーケオシン前駆体 preQ₀(7-シアノ-7デ アザグアニン),preQ₀-tRNA^{Phe},preQ₀-21nt tRNA^{Phe}, 5P'-preQ₀,3P'-preQ₀)濃度を変化させた各基質混合液 を,基質が安定である60℃で反応させて反応速度論的解 析に用いた.また,大腸菌発現系で大量発現させたArcS およびArcS-RaSEAを精製後,ArcS はX線結晶構造解 析,ArcS-RaSEA はクライオ電子顕微鏡解析に用いた.

【結果・考察】温度上昇に依存して各修飾ヌクレオシド (Um20, m⁵C32, Gm42, m⁵C49, m⁵S²U54, ac⁴C64) が増加することが分かった(表1). ac⁴C64修飾は, 93℃でのみ出現し, それ以外の修飾ヌクレオシドは, 70℃から85℃の温度上昇で増加が見られ, 93℃ではさ らに増加した. おそらく, *Tko* は特定のtRNA修飾ヌク レオシド量を増加することにより, tRNA 自身を耐熱化

表1 生育温度上昇に従って増加した *Tko* tRNA^{Trp} 中の 修飾ヌクレオシドの存在量割合

	70° C	85° C	93°C
Um20	0.02	0.48	0.92
m⁵Cm32	0.01	0.03	0.17
Gm42	0.20	0.80	0.96
m⁵C49	0.005	0.03	0.035
m⁵s²U54	0.12	0.80	1.00
ac ⁴ C64	n.d.	0.01	0.80

平田 章

して高温下で生育できると示唆された.ArcS-RaSEAは preQ₀のシアノ基にLysを転移する活性とアミノ基のみ を残すためのC-N 結合切断活性を持つ二機能性酵素で ある.反応速度論的解析の結果、5P'-preQ₀の V_{max} 値が 一番大きく、preQ₀-21nt tRNAの K_m 値が一番低かった. したがって、ArcS-RaSEAは5P'-preQ₀を最小基質とし、 tRNAの全体構造がLys 転移反応の障害になることが判 明した.ArcSは単独でもLys 転移活性を持つため、ArcS のX線結晶構造を3.34Å分解能で決定した(図1A). ArcS 結晶の空間群は $P2_12_12_1$ で非対称単位当たり4分子 が含まれており、2個の二量体が存在していた(図1B). ArcS は4つのドメインから構成され、全体構造および ドメイン組成はアーケオシン tRNA グアニントランスグ リコシラーゼ(ArcTGT)と類似していた.さらに、



図1 ArcSのX線結晶構

ArcS構造を既知のArcTGT-tRNA 複合体構造と比較し た結果、ArcTGTと同様に二量体で機能し、活性中心を 含む基質認識部位の構造が類似していた.このことから, ArcSはArcTGTと同様の基質認識機構により、preQ₀15 を活性中心に固定し、活性中心付近に結合した Lys と転 移反応すると考えられた. ArcS-RaSEAの電子顕微鏡単 粒子解析における初期構造分子モデルにおいて、基質 preQ₀-tRNAが結合するクレフトを確認することに成功 した. 今後, 生育温度を下降させて, 高温下に増加した tRNA修飾ヌクレオシドの変動を調べることで、生育温 度に依存したtRNA 修飾ヌクレオシドの制御機構を解明 する. また, ArcS-Lys および ArcS-preQ₀ 複合体のX線 結晶構造とArcS-RaSEAの単粒子構造を高分解能で決定 し、ArcSによるリシン転移反応機構、さらに RaSEAの C-N 切断機構についても解明する予定である。本研究は 堀弘幸博士と鈴木健夫博士との共同研究で行った.

所属 德島大学大学院社会産業理工学研究部 E-mail: ahirata@tokushima-u.ac.jp

卵菌の温度に応答した形態形成制御に関わる因子の同定と機能解析

【目的】卵菌 Phytophthora infestans は、19世紀中頃にア イルランドでおきたジャガイモ飢饉の原因菌として単離 された.現在も P. infestans が引き起こすジャガイモ疫 病により、世界で年間数十億ドルにものぼる損害が出て いる. P. infestans の低温環境下(10°C程度)における 植物への感染は、雨露に濡れた遊走子嚢から放出された 遊走子が、植物表面で遊走子→シスト→付着器へと形態 を変化させることにより起きる(図1).申請者はこれ までに、P. infestans の遊走子形成阻害剤(未発表デー タ)、シスト発芽阻害剤(Sci. Rep. 2020:10(1):22326)を それぞれ同定した.本研究では、同定した化合物を用い た化学遺伝学により、温度に応答した形態形成を伴う植 物感染機構を分子レベルで解明することを目的とした.



図1 卵菌 Phytophthora infestans の生活環

【方法】申請者らが同定した遊走子形成阻害剤の dinactin 及びシスト発芽阻害剤のβ-rubromycinを用いた解析か ら,遊走子放出およびシスト発芽段階に関与する候補遺 伝子として推定トランスポーターとカルシウムシグナル 伝達関連因子 (Annexin)遺伝子をそれぞれ選択した.各 遺伝子のゲノム編集株をそれぞれ CRISPR-Cas12aシス テムを用いて作出し,低温に応答した形態形成を制御す る分子機構を体系的に理解することを目指した.

【結果・考察】申請者らは、アンモニウムイオノフォアと して知られる dinactin が, P. infestans の低温環境下にお ける遊走子放出を阻害することを発見した. この化合物 を用いた研究から, dinactin 存在下で遊走子嚢内のアンモ ニウムイオン濃度が増加することにより, 遊走子放出が 阻害されることが示唆された. これまでに, P. infestans の遊走子放出は, 低温かつ貧栄養条件下で起きると言わ れていたが, その条件の一つが窒素源であることが示唆 された (図 2 A). 次に, 遊走子嚢において発現しているア

谷 修治

ンモニウムトランスポーター (MEP) を一種同定し, その 遺伝子破壊株を作出して影響を評価することを試みたが, これまでのところ二倍体の P. infestans において, 対立遺 伝子の両方に変異が導入された株の取得には至っていない.

低温環境下でおきる形態分化の内,シストからの菌糸 の発芽を阻害するβ-rubromycinを用いた解析では, β-rubromycin存在下で遺伝子発現量が減少したAnnexin のゲノム編集株を作出した.一アミノ酸が欠失した Annexin生産株を二株取得し(図2B), Annexinが遊走 子嚢の形成,遊走子放出,シスト形成に関与することを 明らかにした(図2C-E).



図2 (A) 遊走子嚢内アンモニア濃度と遊走子放出率,
(B) Annexin 遺伝子のゲノム編集株の作出,ゲノム編集株における菌糸伸長(C),遊走子放出率
(D),シスト発芽率(E)

上述の変異株以外にも取得された変異株は、すべて同 一箇所で一アミノ酸欠損をおこしたAnnexinが生産され ていたこと、両対立遺伝子のAnnexinで一アミノ酸欠損 を引き起こす変異が導入された株の生育は著しく低下し たことから、Annexinが本菌の形態分化において重要な 役割を担っていることが示された.低温条件下では卵菌 の細胞膜の流動生が低下すること、この時に細胞内カル シウム濃度が増加することが形態分化の引き金となるこ とから、カルシウム依存的にリン脂質に結合するAnnexin を介して形態分化を誘導する可能性が示唆された.

植物病原糸状菌の新規病原性獲得機構に関する遺伝学的研究

宇佐見 俊 行

【目的】植物病害は植物に菌類などが感染することで発 生するが,これまで認められなかった新規病害が突然発 生することがある.子のう菌類 Berkeleyomyces rouxiae は多犯性の植物病原菌で、タバコやニンジンなどの病原 菌として古くから知られていた.一方,本菌によるレタ スの病害(レタス黒根病)は、2016年に日本で初めて 群馬県で発生し,その後国内各地の主要なレタス産地で 発生が確認された.本研究では、このような主要作物の 新規植物病害の発生に対応するために、レタス黒根病が 国内で突然発生した要因について遺伝学的側面から調査 した.

【方法】国内の主要なレタス産地(群馬県,長野県,静岡県,茨城県)でレタス黒根病を引き起こしたB. rouxiae の菌株と、レタス以外の罹病植物から分離されたB. rouxiaeの各菌株(非レタス分離株)を、レタスに接種 して病原性を調査した.また、レタスへの接種と再分離 を繰り返すことで、非レタス分離株のレタスへの病原力 が増強されるかを調査した.

B. rouxiaeのレタス分離株(レタス黒根病菌)である LT1と、パンジー分離株であるMAFF 245175 について、 全ゲノム配列のドラフト解析を行った.ソフトウエア Krait v1.3.3を用いて、菌の全ゲノムからマイクロサテ ライト(Microsatellite)を探索した.見出された配列 の前後にPCRプライマーをデザインし、B. rouxiaeの 様々な菌株から増幅を得てその塩基配列を比較し、マイ クロサテライトのリピート数に多型性のあるものを選抜 した.選抜されたマイクロサテライトマーカーを用いて、 国内および米国のレタスあるいはそれ以外の植物から分 離された B. rouxiaeの菌株におけるリピート数を調査 し、ソフトウエア Network v4を用いてネットワーク解 析を行い、遺伝的系統関係を調査した.

【結果・考察】国内各県で発生したレタス黒根病菌の罹病レタスから分離された B. rouxiae の分離株(レタス黒根病菌)と、パンジーやニンジンなどレタス以外からの分離株を、レタスに接種した.また、対照として同じ菌株をオクラに接種した.その結果、レタス分離株はレタスに激しい根腐症状を起こした.これに対して、非レタス分離株はオクラに病原性を示す一方で、レタスには病原性を示さなかった.この結果は、レタスへの接種と再分離を繰り返した非レタス分離株でも同様であった(図1).これは、B. rouxiae のレタスに対する病原性は菌

株ごとに分化し、先天的に決定されている可能性を示す.

また、本菌のゲノムよりマイクロサテライトを見出し、 各菌株の系統解析を行った.その結果、レタス黒根病菌 と非レタス分離株は遺伝的に明確に異なる系統に属した (図2).さらに、国内のレタス黒根病菌は、本病害が 2005年頃より発生している米国の分離株とも系統的に 大きく異なり、米国が伝染源である可能性は低いと考え られた.加えて、様々なレタス品種の黒根病感受性を調 査した結果、感受性の高いサリナス系品種が2000年以 降に多く、これも本病が顕在化した一因である可能性が 考えられた.







図2 マイクロサテライトマーカーを用いた国内産および 米国産 Berkeleyomyces rouxiae の系統解析の結果

原始的リボソームの構築と進化の考察

赤沼元気

【目的】原始的な生命は RNAで構成されていたと予想さ れており、リボソームの起源も RNAであると考えられ ているが、リボソームタンパク質(RP)が必須である と考えられてきたことなどから, in vivo でこれを検証し ようとする研究例は無い.しかし報告者は、枯草菌にお いて多くの RP 遺伝子が個別に欠失可能であることを発 見した. そこで本研究では、枯草菌を用いて複数の RP が欠損したリボソームを作製し、その表現型を観察する ことでリボソームの進化を考察することを目的とした. 枯草菌は外界からDNAを取り込んで組換えを引き起こ す自然形質転換能を持つことで知られているが、その頻 度は高くて0.1%程度である. そこでRP遺伝子の多重 欠損株作製を効率良く進めるため. まずは枯草菌の自然 形質転換能を極限まで高めた実験系の作製に取り組んだ. 【方法】Bacillus subtilis (枯草菌)の自然形質転換能を 極限まで高めるため、主に3つの改良を枯草菌ゲノムに 施した.一つ目は、プロファージ領域である PBSXと Spßを欠失させることで形質転換時の溶菌を抑制した. 二つ目は、自然形質転換の誘導に必要な遺伝子群の転写 を促進する転写因子である ComKと、ComKの安定化 に重要な ComS の発現を人為的に誘導するため、マンニ トール誘導プロモーターの制御下に置いた comK. comS 遺伝子をゲノムに導入した. 三つ目は組換えのために添 加する長鎖 DNAを効率良く枯草菌に取り込ませるため、 膜局在型 Nuclease である NucAを欠損させた. この様 な改良を施した株を用いて、LBで培養した枯草菌の形 質転換を試みた. また. 作製した自然形質転換実験系を 用いて、枯草菌 RP 遺伝子である rbl1 (L9), rblO (L15), rpmI (L35) の3 重欠損株の作製を試みた.

【結果・考察】枯草菌の自然形質転換能を極限まで高め るために施した3つの改良について、その効果を検証し た.まずはプロファージ領域を欠損させた効果を検証す るため、この株のトリプトファン要求性*trpC2*変異を、 野生型*trpC*遺伝子を含む PCR DNAを用いてトリプト ファン非要求に戻す形質転換を行ったところ、野生株の 2倍の形質転換効率が確認された.続いて ComK、ComS の発現誘導の効果を検証した.LB で対数増殖期まで培 養した後、マンニトールを添加して1時間、ComK、 ComS の発現を誘導した.この細胞に胞子形成誘導因子 Spo0Aをコードする遺伝子にストップコドンを導入した PCR DNAを加えて形質転換を行った結果、驚くべきこ とに 60%を超える形質転換効率が認められた(図1). 極めて高い頻度で形質転換を誘導することに成功したの を受け、マーカーを使わずに遺伝子破壊することを試み



図1 spo0Aへのストップコドン導入実験(A)
(B) 胞子を形成しない形質転換体の色の薄いコロニー (矢印)

た. 遺伝子破壊の可否を PCR で確認可能にするため, 31bpの短い領域の欠失を PCR DNAを用いて導入した. *spoOA*を対象に,この遺伝子破壊を試みたところ,14% という高い頻度で形質転換に成功した.さらに,87kb の領域を枯草菌ゲノムに導入する実験を実施し,長鎖 DNAの取り込みに対する NucA 欠損の効果を検証した. その結果,NucA 欠損を導入する前の株と比較して10倍 の形質転換効率の改善が認められた.

この様にして確立した実験系を活用し、RP 遺伝子の 多重欠損株作製に着手した.枯草菌 RPにはパラログタ ンパク質がゲノムにコードされているものも存在する が、基本的に常時リボソームに結合している L9、L15、 L35 の3 重欠損を試みた.rplI (L9) と rplO (L15) にはそ れぞれ薬剤耐性マーカー遺伝子を、rpmI (L35) には 35bpの欠失を導入した.作製した L9、L15 の2 重欠損 株と L9、L15、L35 の3 重欠損株の増殖速度は同程度だっ た (図2).L15の欠損株では、50S サブユニットのL15 近傍に位置する L35 もリボソームに結合できないこと が分かっており、リボソームの構成としては3 重欠損株 と同様になることが理由であると予想される.今後は、 この3 重欠損に加え、さらに RPを取り除いたリボソー ムの作製に取り組み、リボソームの進化について考察す る予定である.



図2 L15, L35のリボソームにおける位置と RP 欠損株の 増殖曲線 アスガルド古細菌から紐解く細胞形態の制御機構の分子進化

千住洋介

【目的】最近, 真核生物に近い系統と考えられている, アスガルドと命名された新規アーキアの分離・培養の成 功やメタゲノム解析によるゲノムの再構築から, 真核生 物に相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子がいく つか発見された (Imachi *et al.*, 2020). その中には, これ まで原核生物には存在しないとされてきたタンパク質の ホモログが含まれている.

 アスガルドアーキアに見出された新規タンパク質による細胞膜の形態形成機構が、真核生物のみならず原核 生物にも共通して保存されていることを示唆している。
例えば、アスガルドアーキアが宿主として、新規タンパ ク質を利用して真正細菌をファゴサイトーシス(食作用)により取り込んだのかもしれない。

② 真核生物が原核細胞からどのように生じたのかは今のところよく分かっていない.しかし、アスガルドアーキアが真核生物と同様な細胞機能をすでに獲得していたことが分かれば、真核生物と原核生物のミッシングリンクを埋める可能性を秘めている.

本研究課題を通して、細胞の形態形成に見られるタン パク質の機能が、進化の過程でどのように保存され、ま た発達してきたかを、アスガルドアーキアに見いだすこ とができる、そして、原核生物にも保存された真核生物 と同様な細胞機能を見いだしていくことで、生命の起源 の一端を解明する。

【方法】アスガルドアーキアに見出された新規タンパク 質の結晶構造を解き、機能を解明することで、細胞膜の 形態形成に代表される生命システムがどのように進化し てきたかを解明する.

【結果・考察】

アスガルドアーキアで見出された細胞膜の形態形成を 制御するタンパク質のX線結晶構造解析.

アスガルドアーキアのいくつかのタンパク質を人工遺 伝子合成し、タンパク質の発現・精製・結晶化に成功し た(図1). さらに、大型放射光施設 SPring-8のビームラ インを用いることにより、X線結晶構造解析を試みた. 得られたX線回折データから、1.9Åの分解能を得てい る(未発表). 正電荷に富んだアミノ酸残基が、負電荷 を帯びたリン脂質と結合していると考えられる. 真核生 物の相同タンパク質の立体構造と比較することで、脂質 膜に結合すると予想されるアミノ酸の進化的保存性を明 らかにした.



図1 アスガルドアーキアの新規タンパク質の結晶

次に,精製したアスガルドタンパク質を,巨大脂質膜 リポソーム (GUV: Giant Unilamellar Vesicle; Senju *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2017) に作用させることで,脂 質膜に結合することを明らかにした (未発表).

また,緑色蛍光タンパク質(GFP)などを融合したア スガルドアーキアの細胞膜の形態形成を制御するタンパ ク質をヒト細胞で発現させ,どのような細胞内構造に局 在するか明らかにし,機能発現を確認した(未発表).

さらに,光-電子相関顕微鏡法(CLEM)を用いて, 細胞膜の形態形成を制御するタンパク質の機能を蛍光顕 微鏡によって同定し,その形態や構造を電子顕微鏡で高 い空間分解能で微細観察した(図2).



図2 CLEMによるアスガルドアーキアの新規タンパク質 の微細観察 (未発表).

上記の一連の研究から,アスガルドアーキア由来タン パク質による細胞の形態形成が,進化の過程を通して生 命活動の維持に必須の機能であったか解明していく. コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物と一酸化窒素の生合成機構・生理的役割の解明

【目的】"フェアリーリング"とは、芝草が輪状に周囲 より色濃く繁茂し、時には枯死した後にキノコが発生す る現象のことで、我々はフェアリーリング形成菌コムラ サキシメジ(Lepista sordida)から原因物質であるAHX (2-azahypoxanthine) と ICA (imidazole-4-carboxamide) を発見した。米から AHX の代謝物として AOH (2-aza-8oxohypoxanthine) を得た. 私たちはこの3つの化合物 をフェアリー化合物(FCs)と名付けた(図1).特に コムラサキシメジでは、植物と同様にプリン代謝経路に よってAHX 及び ICA が生合成され、両化合物がプリン 代謝経路上のAICA (5-aminoimidazole-4-carboxamide) を共通の前駆体として生合成されることが証明された. AICAの骨格に一酸化窒素(NO)が重要な窒素源とし て FCs の生合成に関与していることが明らかになった. イネを含む植物ではAHX は速やかに代謝され。AOHと そのN-グルコシドに変換されるが. L. sordida はAHX を大量に蓄積し、AOH は菌体内に微量しか存在しない。 本研究では、L. sordida における FCs と NO の生合成機 構と生理的役割の解明を目指した.



図1 フェアリーリングの現象(A)とその原因物質である フェアリー化合物(B)

【方法】L. sordida(NBRC 112841)の菌糸体をポテト デキストロース寒天培地(PDA)、25℃で培養し様々な 実験を行った. AHXとICAの定量をRP-HPLCで行った. プリン骨格の形成に必須の化合物は¹³Cまたは¹⁵Nで標 識したアミノ酸の投与実験によりLC-MSで定量分析を 行った. 菌糸体を使用して, cDNAライブラリーを作成 し, これをテンプレートとして RT-PCRを行い, NOS 遺伝子を増幅させ pET21c(+)に導入しタンパク質発現 用の大腸菌形質転換体を大量培養した. 培養終了後, 菌 体を抽出し, 抽出液は Ni アフィニティーカラムクロマ

崔 宰 熏

トグラフィーに供し組み換え NOSを得て、酵素活性を 調べた. また, AOH 変換酵素で予測された XDO (xanthine dioxygenase)も組み換えXDOを作成し活性試験を行った. 【結果・考察】コムラサキシメジ菌糸体において、プリ ン骨格を形成するアミノ酸がAHX 及びICAの骨格にも 取り込まれることが明らかになった。また、L-Argのグ アニジノ基の窒素が AHX 及び ICA 骨格の全ての窒素源 になりうることが判明した、これらの結果は、コムラサ キシメジ菌糸体においても両化合物がプリン代謝経路に よって生合成されることを強く示した。NOは、様々な 生物学的プロセスにおいて多様な役割を果たす低分子の シグナル伝達物質である.一方,真菌類では(特に担子 菌)NOの生合成とその機能は研究されていない. コム ラサキシメジの全ゲノムおよび遺伝子発現解析により、 8個のNOS遺伝子を持つことが明らかになり、これほ ど多様な NOS 遺伝子を持つ生物はコムラサキシメジの みである。大腸菌で異種発現させた三つの組換え NOS を用いて、NOS活性試験を行った結果、全てNO生成活 性があることが明らかになった. 1,2,3-トリアジン生成の 鍵となる窒素源は、NOSによって産生される一酸化窒 素 NO から誘導される活性窒素種であることが明らかに なった. コムラサキシメジにおける FCs は化学合成経路 に類似した経路でAICAからFCsが生合成される(図2).



図2 プリン代謝を介するFCsの生合成・代謝経路

XDO 遺伝子もコムラサキシメジには7個存在することが 明らかになった. 組み換えタンパク質を得て,酵素活性を 測定すると弱い活性を示した. この結果は,*L. sordida*の AHXに比べてAOHの量が極端に少ないことを説明できる.

FCsを実用化するためには、より効率的で安価なFC 生産菌の菌糸体の培養方法の確立により、実用化を促進 するものと期待される.

所属 静岡大学グローバル共創科学部 E-mail: choi.jaehoon@shizuoka.ac.jp

ビブリオのステロイド誘導性自己凝集体形成機構の解析

松田重輝

【目的】細菌の環境での生存戦略の一つに、バイオフィル ムや凝集体のような集合体の形成が挙げられる.このよ うな集合体形成は単細胞である細菌の集団行動を可能に し、自然環境での適応のみならず、病原細菌の場合には 感染時の病原性発揮に重要な役割を果たしている.我々 は主要な食中毒原因細菌である*Vibrio parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ)が胆汁酸のようなステロイド骨格を有 する化合物の刺激によって液相中で速やかに自己凝集体 を形成することを見出した(図1).一方で、界面で形 成されるバイオフィルムに対し、液相中での凝集体形成 に関する理解は進んでいない.本研究ではこのビブリオ の液相中での凝集現象の生理的意義の理解に向けて、そ の集合体形成機構を明らかにすることを目的とした.

【方法】ビブリオを食塩濃度の改変したLB 培地で培養 し、光学顕微鏡で観察することで凝集体の形成を評価し た.また凝集体の沈降を利用して吸光度を測定すること で凝集体形成の程度を評価するアッセイ系を導入し、こ の系を用いてまず研究室で保有する腸炎ビブリオ分離株 の凝集体形成能を評価した.以降,腸炎ビブリオのリファ レンストレインである RIMD2210633 株及びその由来株 を対象とし、遺伝子変異株を作製して凝集体形成能を評 価することで、凝集体形成に必要となる遺伝子の同定を 試みた.また研究室で保有するビブリオ属の複数菌種の 分離株を培養し、同様に凝集体形成能を検討した。

【結果・考察】新たに導入した凝集体形成のアッセイ系 により,多検体の簡便な定量的解析が可能になった.研 究室保有の腸炎ビブリオ分離株24株について凝集体形 成能を評価したところ,病原株(供試菌株20株)の多 くで凝集体形成を生じたのに対し,非病原株(供試菌株 4株)では凝集体形成が観察されなかった(図2).腸炎 ビブリオ RIMD2210633 株を用いて,バイオフィルム形 成に必要となる菌体外多糖の合成遺伝子を欠失した変異 体を作製したところ,気液界面で形成されるバイオフィ





所属 大阪大学微生物病研究所 E-mail: matsudas@biken.osaka-u.jp

擬似有性生殖を介した植物共生菌および病原菌の進化機構の解明

【目的】真菌は,一般に無性生殖と有性生殖の2つの生活環を併せ持っている.一方,有性生殖能を失ったいわゆる不完全菌である種が多数知られているが,不完全菌が遺伝的多様性を増幅する機構は殆ど分かっていない.

イネ科牧草に共生する Epichloë 属エンドファイトは、 植物組織内で植物を病害虫から守る様々な生理活性物質 を産生する.自然界から分離される不完全菌エンドファ イトの生理活性物質の生産能は極めて多様である.有性 世代をもつ菌株と比較して,不完全菌エンドファイトの 染色体数が著しく多く,サイズも多様であったことから, 不完全菌が独特な機構を介して遺伝的多様性を高めてい ると推察された.2株のエンドファイトを貧栄養条件で 培養したところ,菌糸融合,核移行,核融合などが観察 され,いわゆる疑似有性生殖が誘導されることを見出し た.本研究では疑似有性生殖が不完全菌の進化に広く役 割を担っていることを証明することを目的とした. 【方法】1) エンドファイト Hybrid 菌株の表現型の解析

本研究で確立した E. festucae (E437 と Fl1 株)の人工 的な疑似有性生殖誘導により作出した複数の Hybrid 菌 株の生育,抗菌物質の生産能,形成された胞子のサイズ などを解析し, Hybrid 化の表現型への影響を調査した. 2) エンドファイト Hybrid 菌株のゲノム構造の解析

作出した複数のエンドファイト Hybrid 菌株のゲノム 構造の変化を明らかにするため、CHEF 電気泳動法をも ちいた染色体サイズの比較,NGS 解析による染色体の 倍化や組換えの検出など、ゲノム再編の詳細を調査した. 3) *Epichloë* 属異種間での Hybrid 菌の作出の試み

E. festucae および E. sylvatica に異なる色の蛍光タンパ ク質(および薬剤耐性遺伝子)を発現させ、人工的な疑 似有性生殖による Hybrid 菌株の作出を試みた.

4) Fusarium oxysporum の Hybrid 株の作出の試み

異なる植物に病原性を示す違う分化型の F. oxysporum 菌株の組み合わせでは一般に菌糸不和合であるが、低い 割合で擬似有性生殖が起こる. そこで、F. oxysporumの 異なる分化型間の Hybrid 菌株作出を試みた.

【結果・考察】*E. festucae* の基準菌株である Fl1 株および 高い抗菌性を示す E437 株に異なるそれぞれ DsRed (Hyg^R) ベクターおよび GFP(Gen^R) ベクターを導入し, 貧栄養培地上での疑似有性生殖により約 20 株の hybrid 菌株を作出した. これらのうち5 菌株について, 生育速 度, 胞子サイズ, 抗菌活性などの性質について詳細に調 査したところ, これらの性質に多様性が見られ (図1), 



図1 Hybrid 株表現型の多様性

た. 親株および Hybrid 菌株の染色体の分布を調査した ところ, Hybrid 菌株では親株の染色体がランダムに受 け継がれていた. また, CHEF 電気泳動法による解析, および Hybrid 菌株の全ゲノム解析を行なったところ, 染色体の組み換えや断片化, ミトコンドリア DNA の組み換 えなどが起こっていることが示唆され, 擬似有性生殖の過 程で多様なゲノム再構築が起こることが示された(図2).



 図2 Hybrid 株ゲノムの CHEF 電気泳動 (A) および NGS 解 析で明らかとなった染色体倍化 (B) と組み換え (C) の例

さらに E. festucae および E. sylvatica に異なる色の蛍 光タンパク質(GFPおよび DsRed)を発現させて対峙 培養したところ,菌糸融合の形成や2種類の蛍光が共発 現する菌糸が低頻度で観察され,これら異種間での Hybrid 菌株の単離に成功した.また異なる分化型の F. oxysporum に異なる薬剤耐性遺伝子を導入して同様の実 験を行なったところ,極めて低頻度であったが2つの薬 剤耐性を併せ持つ Hybrid 菌株が単離された.

これらの結果から,植物共生菌および病原菌の不完全 菌では,擬似有性生殖様の現象を介して多様な染色体数 や構造をもつ雑種が形成されることが示唆された.

土壌微生物に共通する腐植物質応答制御機構の解明

【目的】腐植物質とは動植物の死骸やフンが化学的かつ 生物学的に分解・宿重合した難分解性の有機化合物であ り、土壌や湖沼の底泥などの自然環境中に普遍的に存在 する物質である. 腐植物質は異なる pH における水への 溶解度の違いによって3種類に分類され、そのいずれも が電子伝達物質として機能し微生物代謝や異種微生物間 の電気共生へ影響を及ぼすことが報告されている. 可溶 性の腐植物質(フミン酸とフルボ酸)の電子伝達に関す る研究は1990年代から盛んに行われており、その電子 伝達機構に関しても理解が進んでいる.一方で、いかな る pH にも不溶な固体腐植物質(以下, ヒューミンと表 記)の電子伝達能は2015年に報告されて以降に研究が 進められてきたが、その詳細なメカニズムに関してはほ とんど明らかになっていない. これまでにヒューミンが 微生物による有機塩素化合物の脱塩素反応や脱窒反応な どを活性化させることが報告されており、ヒューミンを 用いた微生物浄化技術の開発が期待されている。これま でに、ヒューミンによる微生物代謝の活性化に関する研 究では代謝産物解析を中心に実施されてきたが、遺伝子 発現解析などの分子生物学的解析はほとんど行われてこ なかった. そのため、微生物がどのようにヒューミンに 応答しているのかは不明であった. そこで本研究は, ヒューミンから電子を授受できる微生物を利用した ヒューミン応答機構の解明を目的に実施した.

【方法】本研究ではヒューミンに応答して発現変動する 遺伝子の網羅解析を行うためRNA-Seqを行った.その 後,ヒューミンの存在条件で発現上昇した遺伝子の内, 硝酸還元反応の促進に関与する遺伝子,特に細胞外電子 伝達に関連すると考えられる遺伝子に着目し解析した.

具体的には、ヒューミンによる硝酸還元反応の促進が 報告されている Pseudomonas stutzeri JCM20778株をモ デルとしてヒューミンに対する遺伝子発現応答を解析し た. 培地は10mM 硝酸を最終電子受容体とした酢酸最 少培地を使用し、愛知県弥富市の水田土壌から抽出した ヒューミンを5g/Lになるように培地に加えた. 遺伝子 発現解析は硝酸還元が観察されて、さらに培養による代 謝物濃度や菌体量の影響を少ない培養初期(培養3時間) の菌体から抽出した RNAを用いて行った.

【結果・考察】初めに、本研究で使用するヒューミンが P. stutzeri の硝酸還元に利用されているか確認するため、 P. stutzeri を 10mM 硝酸を加えた酢酸最少培地にヒュー ミンを添加条件または無添加条件で硝酸還元培養を行っ

笠井拓哉

た. その結果, ヒューミン無添加条件では培養7日間で 約8mMの硝酸が還元された一方で, ヒューミン添加条 件では培地に加えた10mMの硝酸が約10時間で全て還 元された. このことから, 本研究で使用したヒューミン が*P. stutzeri*の硝酸還元を促進していることが示された.

次に, P. stutzeriのヒューミンへの応答機構を解析す るため、ヒューミン添加または無添加の酢酸最少培地を 用いた P. stutzeriの硝酸還元培養を行い、その時の遺伝 子発現応答を解析した.その結果、ヒューミン添加によ り発現量が2倍以上に上昇もしくは減少した遺伝子がそ れぞれ338個と466個検出されたが、硝酸還元に関連す る遺伝子に有意な発現上昇は見られなかった.

本研究では、発現上昇を示した遺伝子の中で細胞外電 子伝達に関連する遺伝子に着目したところ(表1),バ イオフィルム形成を制御する転写因子のbigR遺伝子が 84.5倍もの発現上昇を示した.さらに導電性シトクロム タンパク質をコードする遺伝子はゲノム内の34個中8 個の遺伝子で発現上昇が確認された.

表1 有意な発現上昇を示した細胞外電子伝達に関連する 遺伝子

Gene ID	Gene name	発現比	p-adj	Function
JCM20778_0891	bigR_1	84.5	1.67E-43	Biofilm growth-associated repressor
JCM20778_0094	ccoP2	6.95	5.71E-09	<i>cbb3</i> -type cytochrome <i>c</i> oxidase subunit CcoP2
JCM20778_00064	cydB_1	3.31	0.0232	Cytochrome bd-l ubiquinol oxidase subunit 2
JCM20778_00097	ccoN1_1	2.83	1.36E-06	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit CcoN1
JCM20778_00063	cydA_2	2.75	0.0084	Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 1
JCM20778_00100	ccoN1_2	2.54	0.0256	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit CcoN1
JCM20778_1_01547	petB	2.53	0.0264	Cytochrome b
JCM20778_1_02670	ctaE	2.24	0.0082	Cytochrome c oxidase subunit 3
JCM20778_1_02672	ctaD_2	2.01	3.70E-04	Cytochrome c oxidase subunit 1

BigRの転写活性はAgrobacteria 属細菌やXylella 属細 菌では硫黄化合物に応答することが知られている.本株 のBigRはXylella 属細菌のBigRの相同性が高いことか ら、本株のBigRも硫黄化合物を認識しており、ヒュー ミンに含まれる硫黄に応答したと考えられた.

導電性シトクロムタンパク質をコードする遺伝子では, ccoN1_1遺伝子や cydA_1遺伝子の上流配列に酸化還元電 位に応答する Arc 二成分制御系の推定結合配列が確認さ れた.このことから,本株はヒューミンの酸化還元電位 を認識して本遺伝子の発現制御が行われたと考えられた.

以上から, *P. stutzeri* JCM20778株はヒューミンの物質 的かつ電気化学的特徴をそれぞれ認識し,細胞外電子伝 達に関連した遺伝子の発現を制御していると考えられる.

所属 名古屋大学未来材料・システム研究所システム,現産業技術総合研究所 E-mail: tkasai.oct09@gmail.com

NADH酸化能を失った非ミトコンドリア型呼吸鎖複合体Iの生理機能

井 上 真 男

【目的】ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I (RC-I) は中央 代謝系と電子伝達系を繋ぎ,エネルギー代謝の根幹を担 う.解糖系やクエン酸回路で生じた NADH は RC-Iによっ て酸化され、キノンの還元および細胞膜を介したプロト ン勾配の形成と共役する(図1).この RC-Iの祖先と考 えられているのが [NiFe] ヒドロゲナーゼ (Hyd)であり, H₂の酸化および H^{*} の還元を触媒し,数多くの微生物に おいて呼吸の一旦を担う.しかしながら,始原的な Hyd の登場以降, RC-I に至る進化の途上において微生物祖 先がどのように呼吸を行っていたのか?については謎が 多い.本研究では,近年その存在が明らかになりつつあ る Nuo11 や Ehr といった NADH 酸化還元モジュールを 持たない祖先型 RC-I 様タンパク質群に着目した.これ らの分子進化と生理機能の解明を通して,微生物祖先が 有していた未知の呼吸機構を明らかにすることを試みた.



図1 RC-Iの進化モデルと祖先型酵素

【方法】NCBIデータベースを用いて、RC-Iや Hydのコ アサブユニットのアミノ酸配列をクエリとして相同性検 索を行った.得られた配列についてフィルタリングを 行ったのちに、多重配列アラインメント・最尤系統樹を 作成した.また、ゲノム情報に基づいて周辺遺伝子群の リストアップを行い、サブユニット構成や機能関連遺伝 子群を推定し、メタゲノム由来の配列については生物圈 情報を統合した.さらに、AlphaFold2を用いて複合体 の立体構造予測を行った.Nuo11とEhrの遺伝学的解 析については、それぞれ Geobacillus thermoglucosidasius NBRC 107763 株と Geobacter sulfurreducens PCA 株を用 いて、二段階相同組換えによるマーカーレス遺伝子欠損 株の構築を行った. 【結果・考察】RC-I スーパーファミリーの分子系統樹 は、RC-I、Hyd、Ehrの3つの大きな系統群とこれらの 根元付近から枝分かれした複数の小さな系統群に分かれ ていた(図2).RC-Iの系統群の根元にはNuo11などの NADH酸化還元モジュールを持たないグループからな る系統群が位置していた.立体構造予測の結果,Nuo11 は11個のサブユニットからなる複合体を形成し、電子 伝達およびイオン輸送モジュールなど呼吸酵素複合体と しての特徴が保存されていた.一方で,RC-IとHydに 次ぐ第3の系統群を形成するEhrはNiFe活性中心を欠 失しているが,Nuo11と同様に電子伝達およびイオン輸 送モジュールなど呼吸酵素複合体としての特徴が保存さ れていた.また,Ehrはアーキア門の70%,バクテリ ア門の60%に散在的に分布し、陸圏、水圏、ヒト腸内 などの様々な環境に存在することが分かった.



図2 RC-Iスーパーファミリーの分子系統樹

次に、Nuo11とEhrについてモデル微生物株を用いた 遣伝学的な解析を試みた.NBRC 107763株を用いた nuo11欠損株の構築については、一次相同組換えゲノム とnuo11欠損ゲノムが混在した単一コロニーを得るこ とができた.本株は著しい生育阻害を示したことから、 nuo11が生育に重要である可能性が示唆された.一方で、 PCA株についてはehr欠損株を得ることができたため、 本株を用いて複数の培養条件で表現型解析を行った.現 在のところ野生株と欠損株の間に増殖速度の顕著な違い は見られていないが、少なくとも本菌の生育にEhrが 必須でないことが分かった.

以上の研究成果は、HydとRC-Iの中間の系統的・構造的特徴を有するNuo11やEhrが原核生物ゲノムに幅広く存在することを示しており、新たな呼吸経路の存在を示唆している.本研究で構築した実験系はこれらの機能解明への足がかりとなるであろう.

出芽酵母前胞子膜のMCS再編成を介した伸長の分子機構解明

舘 川 宏 之

【目的】出芽酵母の胞子形成は、栄養源の枯渇を察知し てストレスに耐性の胞子をつくり出す環境応答・細胞分 化の過程である.この過程では、前胞子膜が細胞内に出 現し、減数分裂によって生じる娘核をオルガネラととも に細胞質ごと包み込み、胞子の前駆体となる.我々は、栄 養増殖時に様々なメンブレンコンタクトサイト(MCS) に局在する脂質輸送タンパク質 Vps13 が、前胞子膜形成 時には Spo71-Spo73 アダプターと SSV 複合体を形成し、 小胞体と前胞子膜の間の MCS に局在して前胞子膜の伸 長に寄与することを示した.また、小胞体 – 細胞膜間 MCS 形成因子である繋留タンパク質(Ist2, Ice2, Tcb1-3, Scs2,22)が、Vps13 に依存的に前胞子膜にリクルートさ れることを見出し、MCS の再編成が起きることを発見 している.

本研究ではMCSの再編成と、MCSに依存した前胞 子膜伸長の分子機構を明らかにすることを目指した.ま た. Vps13の他のタンパク質との相互作用及び機能を詳 細に知るため、各種変異型 Vps13 の作製を目的とした. 【方法】Saccharomyces cerevisiae AN120を親株とした酵 母を、胞子形成の解析に用いた. Vps13のFFATモチー フの配列に変異を導入(F1521A, F1522A)して, vps13破 壊株で発現させ、胞子形成能を調べた、7種の繋留タンパ ク質について細胞質ドメインに相当する配列をそれぞれ pGBKT7 に、また Vps13 については N 末端、中央、C 末端 に相当する配列をそれぞれ pGADT7 に連結し、AH109株 に導入して Two-hybrid 解析に用いた. 変異型 Vps13 は、 error prone PCR を用いて取得し, vps13 破壊株で発現さ せて胞子形成能を調べた.また、pRS316-MMM1を保 持した mmm1 vps13二重破壊株に変異型 Vps13 を発現さ せ、SC 5-FOA 培地上にスポットしてその生育を調べた. 【結果・考察】 繋留タンパク質の一つである Scs2 は, FFAT モチーフと呼ばれる配列を認識して結合すること が知られている. Vps13 にもそのモチーフが存在するこ とから、その配列に変異を導入した. しかしながら、変 異型 Vps13 を発現した酵母は胞子形成が可能であり、こ の配列がVps13の機能に重要でないことが示された.次 に、Vps13と各繋留タンパク質の相互作用をTwo-hybrid 法により調べた. Vps13はN末端, 中央, C末端の3つに 分けて、7種の繋留タンパク質については細胞質ドメインを 用いた. その結果,特異的な相互作用は見出されなかった. そこで、遺伝学的な相互作用を調べるためにVPS13

遺伝子に変異を導入してスクリーニングを行い. 複数の 温度感受性変異を取得することに成功した. これらの変 異遺伝子は. vbs13 破壊株に導入すると 30℃では胞子を 形成しないが、22°Cでは胞子を形成することが確認さ れた(図1A). また、これらの変異が栄養増殖時の Vps13の機能に及ぼす影響について調べた. Vps13は栄 養増殖時には液胞とミトコンドリアの間のvCLAMPに おける脂質の輸送に必要であり, vps13 欠損株において 小胞体とミトコンドリアの間で脂質を輸送する ERMES のサブユニット Mmm1 の遺伝子をさらに欠損させると 致死となることが報告されている. そこで, mmm1 vps13二重破壊株の致死性を変異型 vps13 が低温で回復 できるか調べた. その結果,野生型 VPS13 を発現した 場合は生育可能だが、変異型 vps13 は致死性を回復でき ず (図1B, 22℃), 前胞子膜形成と vCLAMP で, Vps13 の必要とされる機能が異なることが示唆された.



図1 温度感受性胞子形成変異を持つ Vps13を発現した株 の各温度における胞子形成率(A)並びにその栄養増 殖における機能性の解析(B)

本研究では、温度感受性胞子形成変異を持つVps13の シリーズの作製に成功した.これら変異株の解析により、 Vps13 依存的に局在する繁留タンパク質のみならず、 Vps13 の局在化に必要なタンパク質、脂質輸送に関連す るタンパク質と VPS13 の遺伝学的相互作用が明らかに なり(図2)、MCS 再編を介した膜伸長のさらなる理解 につながることが期待される.



図2 MCS 再編成時の Vps13の働きの作業仮説

所属 東京大学大学院農学生命科学研究科,現立教大学スポーツウエルネス学部 E-mail: h.tachi@rikkyo.ac.jp

細菌セルロース分泌システムの完全再構成によるバイオフィルム形成機構の解析

【目的】本研究の目的は、細菌バイオフィルムの主成分 であるセルロースの合成および分泌機構を分子レベルで 解明することである. グラム陰性細菌において, セルロー スの内膜上での合成から菌体外への分泌は、内膜、ペリ プラズム空間、外膜に局在するタンパク質群で形成され る Bcs (Bacterial cellulose synthesis)システムが担って いる (図1). 細菌セルロースは、ホスホエタノールアミ ン (pEtN)によって修飾されることで宿主細胞表面への 接着や病原性が向上するが、この修飾には BcsE および BcsF の相互作用が関与することが示唆されている.本 研究では、Bcsシステムを *in vitro* で再構築して解析を 行うことで、複合体として協働する各因子が担う役割を 明らかにすることを目的とし、セルロースの pEtN 修飾 に関わる重要な因子でありながら、構造や機能について 未解明な点が多い BcsE, BcsF に着目して研究を進めた.



図1 大腸菌における Bcs 複合体の模式図

【方法】*Escherichia coli* Shuffle T7 および BL21 (DE3) 株 を用いて, BcsE, BcsF をそれぞれ発現させ, アフィニ ティクロマトグラフィーによって精製した. これらの精 製因子を用いて, 結晶化スクリーニング, プルダウンアッ セイ, サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などを 行い, BcsE, BcsF の構造解析および相互作用解析を試 みた. また, 相互作用を高感度に検出するため, フルオ レセインイソチオシアネート (FITC) 標識した BcsF 合成ペプチドを用いて実験を行なった. BcsF 合成ペプ チドは, AlphaFold2 によって BcsE と相互作用する BcsF の部位を予測して作製した.

奥田 傑

【結果・考察】BcsE. BcsFともに全長タンパク質を精 製することに成功し、十分量が得られた BcsE について、 結晶化のスクリーニングを行なったが、構造が解析でき るほどの良質な結晶は得られず、構造解明には至らな かった.また.これらの精製因子を用いてプルダウンアッ セイや SEC による複合体形成の観察を試みたが、相互 作用が弱いまたは一過性であるためか、複合体を検出す ることはできなかった.そこで、蛍光標識した BcsFペ プチドを用いて精製BcsEとの相互作用解析を行なった. その結果. BcsEとBcsFは. $K_{\rm D}=5\mu$ M程度の弱い相互 作用で1:1の複合体を形成することが示唆された. BcsEは、サイクリックジグアニル酸 (cdGMP) 存在 下で二量体を形成することが報告されているが、その機 能への影響は明らかになっていない. そこで, cdGMP の BcsEF 複合体形成への影響を調べるため. cdGMP 存 在下で BcsE と 蛍光修飾 BcsF ペプチドを混ぜ合わせ. Blue-Native PAGE で解析したところ. cdGMP 非存在下 では BcsF ペプチドを加えることで BcsE 二量体が即座 に解離したのに対し、cdGMP存在下では、BcsE 二量体 の解離は起こらなかった.しかしながら、cdGMP存在 下においても、4℃で30分間反応後にはBcsE二量体は 解離してしまっていたため. cdGMPは長時間にわたって BcsEF 複合体を安定化させるわけではないと考えられる. 反応時間や cdGMP 濃度については、今後検討する必要 がある.これらの結果から、BcsF-BcsEの相互作用によ り BcsE-BcsE の相互作用が弱まること、また cdGMP 存在下でのみ、短時間ではあるがBcsEとBcsFの2:2 の複合体が形成される可能性が示唆された(図2).



図2 BcsEFの複合体形成機構モデル

本研究で得られた成果は、これまでに知られていなかった BcsEF 複合体形成への cdGMP の寄与についての新たな知見であり、今後、この複合体の構造解析や更なる機能解析によって、Bcs システムによるセルロース分泌機構の全容解明へとつながることが期待される.

薬剤耐性に寄与するパーシスターの生理および誘導機構の解明

【目的】クローン集団内の細胞は一般に同一の性質を持 つとされているが、可逆的な表現型の変動により、個々 の細胞間で性質に差異が生じることがある.特に、致死 的なストレス条件下での生存戦略として、ごく少数の細 胞がパーシスターとして長期間生存する現象が確認され ており、これらのパーシスター細胞は抗生物質耐性問題 の一因となっている.パーシスター細胞の生理や誘導機 構の解明が急務であり、これに基づいた高効率のパーシ スター誘導技術と簡便な判別法の開発が必要とされてい る(図1).そこで、本研究はパーシスターの生理を解 明することで、パーシスター誘導遺伝子を特定しパーシ スターの高効率調製技術を確立することを目的とした.



【方法】休眠細胞数の解析

パーシスター細胞の調製には、既知パーシスター因子で ある膜孔形成タンパク質、乳酸脱水素酵素およびキナー ゼの発現プラスミドで形質転換した大腸菌 MG1655を用 いた.LB 培地で O.D.₆₀₀=0.6~0.8まで37°C で振とう培 養した大腸菌に誘導剤としてアラビノースまたは IPTG を添加し、パーシスター細胞を誘導した.その後、アン ピシリンまたはオフロキサシンで3時間処理後の生菌数 を測定することでパーシスター細胞数を解析した.複数 のパーシスター因子の発現には origin が pBR322 で発現 誘導系がラクトースおよび origin が p15A で発現誘導系 がアラビノースのプラスミドを用いて実験を行なった. 【結果・考察】初めに、大腸菌でパーシスター因子とし て報告されている膜孔形成タンパク質 hokB、乳酸脱水

山口良弘

素酵素 ldhA およびキナーゼである hipA7を発現させて パーシスター細胞を誘導した. その結果, アンピシリン 処理後では hokB 過剰発現株のパーシスター誘導率は野 生型株の50倍であった.一方, hipA7 および ldhA 過剰 発現株では野生型株と差はなかった。また、オフロキサ シン処理後3時間では, hipA7および hokB 過剰発現株 のパーシスター誘導率はそれぞれ野生型株の17倍およ び50倍だった.以上の結果から. hokB および hibA7 に よるパーシスター誘導が確認できた. そこで、複数の パーシスター因子を共発現させ、パーシスター細胞を高 効率に誘導することを試みた. その結果, hipA7および hokB 共発現株のパーシスター誘導率は、オフロキサシ ン処理後3時間で野生型株の100倍であった. 複数のパー シスター因子の共発現は単一因子の発現よりも高効率に パーシスター細胞を誘導できたことから、複数のパーシ スター因子の共発現は高効率に休眠を誘導する手法とし て有効であることが示された.

表1 誘導遺伝子のパーシスター形成への影響

	過剰発現させた遺伝子			
	hipA7	hokB	hipA7 hokB	
アンピシリン	1倍	50 倍		
オフロキサシン	17 倍	50 倍	100 倍	

今回,高効率にパーシスター細胞を誘導し,その生理 機能の解析を計画したが,80~90%と高効率にパーシ スター細胞を誘導する方法を開発できなかった.今回使 用したパーシスター因子は非必須遺伝子であり,その遺 伝子欠損株においても野生型株と同程度のパーシスター 細胞が誘導される.おそらく大腸菌内では未知遺伝子を 含む複数の遺伝子がパーシスター形成に関与すると考え られる.これらの遺伝子のスクリーニングも本助成研究 で行なったが,原因遺伝子の同定には至っていない.

今後,今回の研究で得られた知見を基に,パーシスター 細胞の誘導率をさらに向上させ,パーシスター細胞の分 子機構を解明して行きたい.パーシスター細胞の全貌が 解明されることで抗生物質の使用における限界を克服 し、より持続可能な医療アプローチが可能となることを 期待している.

植物病原菌 Lasiodiplodia theobromae におけるジャスモン酸生合成経路 およびその生理機能の解明

【目的】ジャスモン酸は植物ホルモンの一つであり,ある種の植物病原糸状菌はジャスモン酸を生産することが知られている.しかし,なぜ糸状菌がジャスモン酸を生産するのか,またどのように生合成しているのかは未だわかっていない.これらの謎を明らかにすることを目的とする(図1).



図1 本研究目的の概略図

【方法】実験には、通常の研究室条件下での培養におい て大量のジャスモン酸 (JA)類を生産することで知られ る植物病原菌のLasiodiplodia theobromae IFO 31059を用 いた.はじめに本糸状菌のゲノム解読を行い、アノテー ションを行った.次いで植物におけるJA類の生合成遺 伝子のホモログを本糸状菌ゲノム中から探索した.L. thebromaeはPD培地における生育が最も良いが、PD培 地中にはポテト由来のJA類が含有しているため、PD 以外の培地を検討した.また、JA類の非もしくは低生 産培養条件を探索した.最後にUV照射によるJA非生 産株の作製を試みた.

【結果・考察】全長45Mbpのサイズで全ゲノムデータ が得られ,RNA-seqのデータを用いてアノテーション を行った.ジャスモン酸は、リノレン酸を出発物質とし て、LOX、AOS、AOCによって*cis*-OPDAへと生合成 される.その後、OPRにより還元され、3回のβ酸化を 受け、ジャスモンが生成する(図2A).シロイヌナズナ のAOSおよびAOCをクエリとして、本ゲノム中からホ モログの探索を行ったが、これら遺伝子は見出せなかっ た.一方で、相同性は高くはないもののOPRは候補遺 伝子が発見できたため、クローニングし、活性を確認し たが、活性は認められなかった.またジャスモン酸類生 産能を確認するために、培地の検討を行い、CD 培地(ス クロース)が最適であると確認した(図2B).先述した

佐藤道大

ように、植物の生合成遺伝子ホモログを手掛かりとして JA 生合成遺伝子を探索するのは困難であると判断し、 順遺伝学的なアプローチを進めることにした.まず培養 温度、振盪速度などJA 類の生産量が減少する培養条件 を検討し、産量に差が生じた条件で、RNA-seq 解析を 行った.現在解析を行っているが、今のところ、可能性 の高い遺伝子は見つかっていない.次に、UV による変 異導入を行い、JA 非生産株の作製を試みた.致死率 99%となるようにUVを照射し、得られたコロニーの JA 生産量を LC/MS にて解析した.現在までに 200 株程 の菌株の解析を行い、1~5の化合物生産が見られない JA 類非生産株 (M0004)の獲得に成功した (図 2 B).



図2 (A) 植物における JA 生合成経路 (B) L. theobromae 野 生株および M0004 の JA 類の LC/MS クロマトグラム

得られたJA類非生産株 M0004株は、すべてのJA類の 生合成が消失しており、AOCよりも上流の遺伝子もし くは転写因子などの制御遺伝子に変異が生じたと考えて いる.現在、変異導入個所を解析している.今後は、遺 伝子の解析を進めるとともに、M0004株の植物への再 感染を行っていき、JA類不含の植物病原菌に感染した 植物の遺伝子発現を解析する予定である.植物中のJA 類は、二重結合が異性化したものや還元したもの、種々 のアミノ酸とのコンジュゲート型JAなど構造多様性に 富む.本糸状菌は、植物と同様のJA類を生産するため、 これら異性体の生産に変化のある変異導入株を作出し、 JA類の生合成解析を行っていく.糸状菌の生産する植 物ホルモンの生合成を明らかにするとともに、その生理 的機能について解明を進める.

グロムス亜門菌類が異なる形態のアーバスキュラー菌根を形成する メカニズムとその生理的意義の解明

上中弘典

【目的】陸上植物の約7割と共生するグロムス亜門菌類 は、植物の根で共生器官であるアーバスキュラー菌根 (AM)を形成する.一般的に,植物の分類群に応じてAM の形態に違いが生じる.多くの作物種では,接種菌種に 関わらず内生菌糸が細胞間隙を伸長し,樹枝状体を形成 するアラム型AMが形成される.しかしナス科のトマト では、グロムス科の菌を接種するとアラム型AMが,ギ ガスポラ科の菌を接種すると内生菌糸が細胞を貫通し, 菌糸コイルを形成するパリス型AMが形成される(図1). 本研究では、同じ植物で異なるAMを形成できるトマト を用いて、グロムス亜門菌類が異なる形態のAMを形成 するメカニズムとその生理的意義の解明を試みた.



図1 異なるグロムス亜門菌類を接種したミヤコグサとトマトの根に形成されたアーバスキュラー菌根. 矢尻は内生菌糸,アステリスクは樹枝状体(黒)もしくは菌糸コイル(白)を示す.

【方法】供試植物としてはトマトとミヤコグサを,供 試菌としてはグロムス科の*Rhizophagus irregularis* DAOM197198とギガスポラ科の*Gigaspora margarita* K-1を用いた.川砂とバーミキュライトを2:1の割合で 混合した滅菌土壌に供試植物の実生を移植し,1/5 Hoagland 溶液(リン濃度20µM)を添加して,明期14 時間,暗期10時間,25℃の条件で5週間栽培を行った. その際,供試菌の胞子を土壌と混合することで植物に接 種した.栽培後の根を採取し,全RNA 抽出後にRNA-seq 用のライブラリーを作成し,DNBSEQによるシーケンス を実施した.植物はゲノム配列,菌は転写産物の配列を 参照配列として用い,得られたリード配列データから得 られたカウントデータを用い,各処理区における発現変 動遺伝子を同定した.菌の感染率は,根をトリパンブルー

染色後, McGonigle 法を用いて測定した. 生育度は、栽培 後の地上部について新鮮重量を測定することで評価した. 【結果・考察】RNA-seg によるトランスクリプトーム解 析を行った結果. 植物の遺伝子については全ての植物-菌の組み合わせにおいて共生関連の遺伝子が誘導されて いた.しかしながら、異なる形態型を示すトマトだけで なく、アラム型のみを形成するミヤコグサでも菌種に応 じて特異的な応答が認められた(図2A). それに対し て菌の遺伝子は、AMの形態型が変化するギガスポラ科 の菌でのみ、接種植物間で遺伝子発現プロファイルが大 きく変化した(図2B)、そのため、一般的にはAMの 形態型の決定因子は宿主植物側に存在すると考えられて いるが、菌側にも存在すると示唆される.パリス型AM では細胞を貫いてAM 菌が感染することから、発現量 が大きく変動した遺伝子がコードする転写因子、リン酸 化酵素、ペプチダーゼなどの機能は、宿主植物において 誘導された抵抗性の緩和に関与していると示唆される.

また,栽培時の光量を変えてトマトへの接種実験を 行った結果,ギガスポラ科の菌を接種した場合でのみ光 量依存的な感染が認められた.通常光条件では,グロム ス科の菌と比べてギガスポラ科の菌の接種により地上部 の生育が有意に促進された.同様の傾向がミヤコグサで も認められたため,植物側からの光合成産物の供給量は AMの形態型の決定には関与していないと結論づけた.



図2 比較トランスクリプトーム解析の結果: (A) 植物に おいて有意に発現変動した遺伝子数を示す. 上段が 上方制御,下段が下方制御された遺伝子数を示す. (B) グロムス亜門菌類において有意に上方制御され た遺伝子数を示す. (FDR<0.05)

分裂酵母における細胞間コミュニケーションを介した寿命決定機構の解明

山崎晴丈

【目的】発酵生産の観点からは、微生物の増殖期よりも 定常期の発酵力が重要である場合があり、経時寿命(栄 養源枯渇により分裂停止した状態での生存期間)の長さ は物質生産性とも密接に関係すると考えられる.しかし ながら酵母の経時寿命の延長機構については未解明な部 分が多い.我々は分裂酵母 Schizosaccharomyces pombe の長寿命変異株としてKK268を見出しているが、その 培養上清を野生型株(WT)に添加すると野生型株の経 時寿命が延長することから、KK268は培養液中に自他 の寿命を延長する物質を分泌し、細胞間コミュニケー ションを行うことで寿命を延長していると考えられてい る(図1).本申請研究では、KK268の寿命延長分子の 同定および寿命延長経路の解明を目的とした.

【方法】KK268.野生型株の培養上清を酢酸エチルで親 水性画分と疎水性画分に分画し、疎水性画分はさらに薄 層クロマトグラフィー(TLC)により展開後,KK268 に特異的なスポットに含まれる物質を核磁気共鳴分光法 (NMR) で構造解析を行った. また KK268, KK268の 長寿命性をもたらす mot1⁺ 遺伝子の変異を野生型株に導 入した mot1-1. WTの培養上清のメタボローム解析から 見出された寿命延長分子の候補物質を野生型株に添加し て, CFU (Colony Forming Unit) を指標に寿命延長活 性があるか検討した. さらに. KK268. mot1-1. WTの 全 RNA-seg 解析を行い, Mot1-1の下流で寿命延長分子 の分泌に関与する因子をコードする遺伝子.およびWT が寿命延長分子を受容して寿命を延長する経路に関与す る因子をコードする遺伝子を抽出した. また遺伝子の破 壊や変異の導入を簡便にする CRISPR/Cas9 システムの 改変を行った.

【結果・考察】KK268 が分泌する寿命延長分子の候補物 質の絞り込みを行った.KK268 の培養上清を酢酸エチ ルで分画した親水性画分および疎水性画分に寿命延長活 性が認められたことから,KK268 は2種類以上の寿命 延長分子を分泌していると考えられた.上記の疎水性画 分をTLC展開し,KK268 に特異的なスポットに含まれ る物質をNMRで解析したところ,この物質は2-(4-ヒ ドロキシフェニル)エタノール(チロソール)であると考 えられた.また,培養上清のメタボローム解析の結果, WTに比べてKK268 や mot1-1の培養上清に多く含まれ る物質として,親水性のピルビン酸とホモシステイン, 疎水性のチロソールを見出した.1µMのピルビン酸, 1µMのホモシステイン,および10µMのチロソールの 添加でWTの寿命が延長したことから、これらはKK268 が分泌する寿命延長分子であることが考えられた(図2).

次に RNA-seq 解析を行い, Mot1-1 経路で寿命延長物 質を合成・分泌するのに関与する因子をコードする遺伝 子として, WTよりも KK268 や mot1-1 で培養5日目に 8 倍以上高発現し, かつ KK268 や mot1-1 で培養3日目 より5日目の方が2 倍以上高発現している遺伝子を11 個 抽出した.また,寿命延長物質を受容し,寿命延長を実 行するのに関与する因子をコードする遺伝子として,培 養3日目の WT に KK268 や mot1-1 の培養5日目の上清 を添加し,その2日後に8 倍以上高発現するようになる 遺伝子を13 個抽出した(図1).現在,これらの遺伝子 の破壊株を作製し,経時寿命を測定している.

さらに上記遺伝子の破壊株の作製や mot1-1 の点変異 の導入をマーカーレスで高効率かつ高速に行うことを目 的として,既存の CRISPR/Cas9 系を改変した.

今後,見出された寿命延長関連遺伝子が高発現するこ とで寿命延長物質の分泌量が増加するか検討する.また これら遺伝子を高発現することや,寿命延長分子を添加 することによって,産業酵母でも経時寿命が延長し,発 酵生産性が向上するか検討を行っていく必要がある.



図1 本研究から予想された KK268 の寿命延長経路



新規立体構造に基づく大腸菌 S2P 膜内切断プロテアーゼの切断制御機構の 解明と薬剤スクリーニング系の開発

【目的】タンパク質の「膜内切断」現象は、生体膜中に おいて膜貫通タンパク質が脂質二重層内部で加水分解を 受けるという特殊なタンパク質分解反応であり、細胞分 化、ミトコンドリア機能制御、免疫応答等の生命に必須 な生体プロセスや、マラリア原虫等の病原性発揮や細菌 感染症にも関与する. 膜内切断は,「膜内切断プロテアー ゼ」によって触媒されるが、このうち Site-2 protease (S2P)ファミリー群は、脂質代謝制御や微生物病原性 発揮等に関わる.本研究では、大腸菌 S2Pホモログで ある RsePを材料として基質切断の制御機構の解明や新 規生理基質の同定を試み、細菌 S2Pプロテアーゼが関 わる疾病や感染症治療薬等の開発基盤を構築することを 目指した.

【方法】本研究では以下の2つの研究を実施した.(1)X 線結晶構造解析により大腸菌 K-12 株の RseP 及び海洋性 細菌 Kangiella koreencis DSM 16069株のRsePホモログ (*Kk*RseP) それぞれとペプチド性阻害剤 batimastat (BAT) との複合体構造を決定し、その構造情報を基に RseP 変異体の in vivo 基質切断解析. 部位特異的架橋や 修飾法による相互作用解析等を行うことで, RsePによる 基質取り込み・切断制御機構の解明を試みた。(2) 大腸 菌 RsePは、表層ストレス応答や鉄取り込みに関わる遺 伝子発現制御や、生体膜の品質管理を行う必須の酵素で ある. RsePの新規基質及びさらなる生理機能を探索する ため、低分子膜タンパク質(SMPs)を対象に基質切断 スクリーニングを行った. また, そこで得られた基質候 補に対し機能解析及び RseP 発現による機能への影響を 評価することで、基質切断の生理的意義の解明を試みた. 【結果・考察】構造決定された大腸菌 RseP 及び KkRseP との構造比較から、保存されたプロテアーゼコアドメイ ンに対し、C 末端のTM4 及び膜近傍に位置する α ヘリッ クス領域(PCT-H2)等が可動性を持つことが推測され た. そこで,系統的変異体機能解析やシステイン修飾試 薬を用いた修飾アッセイを行い, TM4上で高度に保存 されたAsp-446残基を介してTM4とPCT-H2が静電的 に連結することが切断活性に必須であること、そしてこ れらの領域が膜中でゲート構造を形成することが示唆さ れた. このゲート構造の可動性を制限するようにドメイ ン間で架橋すると切断活性が低下したことから、ゲート 構造の構造変化が効率的な基質切断に必要であることが

檜 作 洋 平

示唆された(図1). これらの結果から, PCT-H2, TM4 領域が基質を取り込むためのゲートを形成し, このゲー トの開閉という構造変化を介して効率的な基質の取り込 みと切断を行うという基質切断制御モデルを提案した (図2,上).また,構造を基にした阻害剤 BATの感受性 解析により, BAT が基質結合状態をミミックした結合様 式をとることを示し,基質となる膜タンパク質の結合様 式についても明らかにした.これらの成果は RseP 特異的 阻害剤デザインにおいて重要な知見を与えるものである.





次に、SMPsを対象にした RseP の基質切断スクリーニ ングから、14種の SMPsを新規基質として同定した. そのうち細胞のパーシスター化(休眠)に関わる内在性 トキシンである HokBを RseP が切断・分解することで その細胞毒性を抑制することを示した(図2,下). RseP による HokB の切断は休眠からの覚醒に関わる可能性が ある.細菌のパーシスター化は感染時の病原性発揮や難 治療化と密接に関わるため、感染症治療に向けた RseP 阻害剤開発の重要性をより強く支持するものである.




酵母において空間的制御を受ける発酵経路酵素による解糖系調節機構の解明

【目的】出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)のピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)は、アルコール発酵 経路において、ピルビン酸をアセトアルデヒドへと脱炭 酸する初発反応を触媒する酵素である.一般に解糖系の 酵素群は細胞質に局在するのに対して、意外なことに、 蛍光タンパク質を付加した Pdc1 は主として核内に観察 される.しかしながら、Pdc1の核局在に関する生理的・ 機能的な意義はよく分かっていない.それに対して我々 は、Pdc1のC末端領域が核局在性に関与すること、さ らに Pdc1欠損株の新規な表現型として、解糖系阻害活 性を有する2-デオキシグルコース(2-DG)に対する高 い感受性を見出した.本研究では、Pdc1について核局 在性の制御と2-DG 感受性との関連に着目することで、 Pdc1の新規な調節機構の解明と解糖系との関わりにつ いての知見の獲得を目的とした.

【方法】本研究では, Saccharomyces cerevisiae の BY4741 株を使用した. Pdc1 の細胞内局在性の観察には, Pdc1 のC末端に蛍光タンパク質 mCherry を融合発現する菌 株を作製し, Pdc1-mCherry の細胞内局在について蛍光 顕微鏡により観察した.

【結果・考察】核内へのタンパク質輸送に働く核移行シ グナル(NLS)の予測プログラムを利用し、Pdc1のC 末端領域(529-559 a.a.)を推定NLSとして見出した. Pdc1のC末端欠損変異体Pdc1^{ム529-559}-mCherryは、野生 型Pdc1-mCherryに比べて細胞質局在が増加した(図1). このことは、Pdc1のC末端領域がNLSとして機能する 可能性を示唆したが、C末端領域のみにmCherryを付 加した融合タンパク質の核局在性は認められなかった. これらのことは、Pdc1のC末端領域は核局在性に関与 するものの、NLSとして機能しているのではないこと を示唆していると考えられた.



図1 Pdc1のC末端領域が細胞内局在性に及ぼす影響

野村 亘

Pdc1の核局在性に及ぼす 2-DGの影響について検討 を行った.その結果,2-DG存在下においてPdc1の核 局在性の顕著な変化は観察されず,2-DG感受性とPdc1 の細胞内局在性との間における関連性は低いと考えられ た.その一方,環境ストレスがPdc1局在に及ぼす影響 についての検討を実施した結果,窒素源枯渇条件下にお いてPdc1の核局在が減少し,細胞質局在が増加するこ とを発見した.また,Pdc1欠損株は窒素源を感知する 栄養シグナルであるTOR(target of rapamycin)の阻害 剤ラパマイシンに対して感受性を示した.さらに、ラパ マイシン処理によりPdc1の核局在性は減弱し,細胞質 局在が増加することを見出した(図2).



図2 Pdc1の核局在性に対するTORシグナルの関与

また、Pdc1欠損株が示す 2-DG 感受性の原因につい ての知見を獲得するため、Pdc1欠損株の 2-DG 感受性 を抑圧するマルチコピーサプレッサーの探索を実施し た.その結果、最終的に PDC1 やこれまでに 2-DG の細 胞毒性の回避に関与することが報告されている DOG1/2 に加えて、転写因子 PDC2、プリンヌクレオチド生合成 に関与する核酸代謝酵素 ADE16、ならびに RNA 結合タ ンパク質 NRP1 の5つの抑圧遺伝子の同定に成功した.

本研究において、申請当初に期待した Pdc1 の細胞内 局在性と 2-DG 感受性との明確な関連性は認められな かったが、環境ストレスに着目した解析から Pdc1 局在 と窒素源枯渇との関連が見出され、Pdc1 の細胞内局在 性の制御機構に栄養シグナルである TOR シグナルの関 与が示唆された.また、Pdc1 欠損株が示す 2-DG 感受 性を指標としたマルチコピーサプレッサー解析により、 転写因子や核酸代謝酵素などが抑圧遺伝子として取得さ れたことは、Pdc1 制御機構に関する新規な知見の獲得 に繋がることが期待される.

遺伝子の発現抑制最適化による高収率物質生産技術の開発

【目的】持続可能な社会の構築に向けて,酵母 Saccharomyces cerevisiaeによる有用物質生産技術が期待 されている.しかし,酵母による有用物質生産の産業化 には,その生産物収率の向上が課題となっている.

一般に,酵母の生産物収率の向上には,副産物の生成 に寄与する酵素遺伝子の破壊や発現抑制等の方法が有効 である.中でもRNA干渉(RNAi)は,簡便な方法で 生育必須遺伝子を含む標的酵素遺伝子の発現を抑制でき るという利点を持つ.しかし,酵母には目的物質の生成 に関わる代謝酵素遺伝子が膨大に存在するため,どの遺 伝子の発現を抑制すべきかを知ることは容易ではない.

既往の研究において、多数の遺伝子の発現を同時に強 化して調節し、発現量が最適な酵母株を構築するグロー バル代謝工学(GME)が開発された.このGMEを、 RNAiに必要な2本鎖RNAの発現に応用し、多数の酵素 遺伝子の発現を種々の強度で抑制して最適化することで、 目的物質を高収率で生産する技術の開発が期待できる.

本研究では、RNAiとGMEを組み合わせることで、 同時に複数の酵素遺伝子の発現を抑制して最適化する新 規技術を開発し、酵母によるβ-カロテン(有用カロテ ノイド)生産性を向上させることを目指した.

【方法】酵母 S. cerevisiae にβ-カロテン生産能を付与する ためのプラスミド pEU20-Beta3 を構築した. また,β-カ ロテン生産の阻害に寄与する 10 種類の酵素遺伝子の発現 を RNAi により抑制するためのプラスミド pδL-Conlib-* (*; DPP1, LPP1, PAH1, ERG9, EXG1, FLD1, MNN9, ROX1, DOS2, YJL064W) および RNAi に必要な Dicer, Argonaute を発現するプラスミド pEW-AGO-DCR を構 築した.

β-カロテン測定は, β-カロテンをアセトンに抽出した 後に比色法により行った. 遺伝子転写量の測定は, 72 時間培養後の細胞から全 RNAを抽出し, リアルタイム PCR 法により行った.

【結果・考察】酵母 S. cerevisiae YPH499 に pEU20-Beta3 を導入し, β-カロテン生産酵母 YPH499/Beta3 を作製し た. さらに, YPH499/Beta3 に pδL-Conlib-* および pEW-AGO-DCRを導入することで, 10 種類の酵素遺伝子を同 時に RNAi の標的とした酵母ライブラリー YPH499/Beta3/ i-10_* (*; 1-181) を作製した.

YPH499/Beta3/i-10*の中で,最も高いβ-カロテン生 産量を示した株はYPH499/Beta3/i-10_176であった.そ こで, YPH499/Beta3/i-10_176 およびその親株 YPH499/ Beta3 を培養し, グルコース濃度およびβ-カロテン生産 量を測定した(図1). YPH499/Beta3/i-10_176 は培養 120 時間後に最大のβ-カロテン生産量 14.1 mg/Lを示し, YPH499/Beta3 (9.4 mg/L)と比較して 1.6 倍に向上した.

山田亮祐

次に, YPH499/Beta3/i-10_176において RNAi の標的 とした 10 種類の酵素遺伝子の転写量を測定した(図2). *EXG1*(β-グルカナーゼ)および YJL064W(機能未知遺 伝子)を除く8種類の遺伝子の相対転写量は0.15-0.71 倍に有意に低下した.従って, YPH499/Beta3/i-10_176 では,8種類の酵素遺伝子の発現が種々の強度で抑制さ れたことによりβ-カロテン生産量が向上したと示唆さ れた.

本研究では, RNAiとGMEを組み合わせ, 同時に複 数の酵素遺伝子の発現を抑制して最適化することができ る新規技術を開発し, 酵母によるβ-カロテンの生産性 を向上させることに成功した.



図1 10遺伝子発現同時抑制株のカロテノイド生産量



図2 10遺伝子発現同時抑制株の遺伝子転写量

所属 大阪府立大学大学院工学研究科, 現大阪公立大学大学院工学研究科 E-mail: ryamada@omu.ac.jp

植物関連放線菌が生産する二次代謝産物の解析よびその作用

中島琢自

【目的】根粒菌に代表されるように、ある種の微生物は 植物と共生関係にあることが知られている.植物から分 離される放線菌は*Streptomyces*属以外の多様な希少放線 菌が多く分離され、何らかの共生関係が考えられる.放 線菌は高い物質生産能力を有しており、植物と放線菌と の相互作用を化合物中心に理解することで、植物と放線 菌の相互関係を明らかにすることを目的とした.本研究 は、植物内生放線菌が生産するトレハンジェリンを用い て植物に対する影響について調べた.

【方法】トレハンジェリンは西表島に自生していたキンギ ン草の根より分離された Polymorphospora rubra K07-0510 が生産するトレハロース類縁体である。トレハンジェリ ンは細胞保護、脂質代謝改善効果など様々な生物活性を 示し、なかでも角質バリア機能強化作用が見いだされ化 粧品原料として開発された.本研究はダイズ生育初期に おけるトレハンジェリンの影響について調べた. ダイズ の種子(極早生、サカタのタネ)を70%エタノールお よび3%次亜塩素酸で表面殺菌し、蒸留水で洗浄した. 滅菌蒸留水で湿らせたキムタオルを敷いたシャーレに種 子を置き、30℃で3日間インキュベートし、ダイズを発 芽させた. 試験管に1mlのムラシゲ・スクーグ基礎塩 混合物溶液を分注し.発芽させたダイズの根が浸るよ うに設置した. トレハンジェリンは終濃度として 0, 1, 5mg/mlを添加した.明暗環境下30℃で3日間インキュ ベート後、ダイズを回収し、水洗後、ダイズの全長およ び湿重量を測定した. その後, 破砕機でホモジネートし た試料を用いてメタノールでダイズ成分を抽出した. そ の抽出物をLC/MSを用いてイソフラボンやフェオホル バイド類などダイズ成分を分析した.分析条件は、アセ トニトリル水溶液(含0.5%ギ酸)の5%-100%グラジ エント溶離で、各成分を分離し解析した.

【結果・考察】トレハンジェリンを添加することで濃度 依存的にダイズ全長および湿重量の増加が認められた (図1). 大豆イソフラボンは、ゲニステイン、ダイゼイ ン、グリステインの3種のアグリコン、それぞれの配糖 体およびマロニル化配糖体が知られている. 今回用いた ダイズからも9種類のイソフラボン関連化合物が検出で きた. ダイズ初期生育におけるイソフラボンの経時的変 化は、胚軸が伸び、初生葉が出る時期になるとイソフラ ボン量は著しく増加した. その種類は、マロニルダイジ ンが最も多く検出され、次いでマロニルゲニスチンで



図1 ダイズ生育初期におけるトレハンジェリンの効果

あった (図2).

トレハンジェリンを投与することにより,総イソフラ ボン量,特にマロニルダイジンとマロニルゲニスチンの 量は,濃度依存的に低下した(図2).ダイズは,マロ ニル体や配糖体をイソフラボングルコシダーゼによりア グリコンに変換し,その後根外に分泌する.分泌したイ ソフラボンは微生物誘引物質として働き,根圏微生物叢 を形成する.トレハンジェリンを添加した群はコント ロールに比べ成長が早く,マロニル体からアグリコンに 変換を促進し,根外分泌を促進させた結果,ダイズ内イ ソフラボン濃度が低下した可能性がある.また,トレハ ンジェリンは,クロロフィル類の代謝活性を高め,ダイ ズ初期生育において,成長を促進することが示唆された. 今後,圃場での実試験を実施することで,新たな農業用 資材としての活用が期待できる.



【目的】 微生物や植物が生産する天然有機化合物(以降. 天然物)は、医薬品、農薬、香料などとして利用されて いる有用な化合物資源である。そのため、天然物は今ま さに国家プロジェクトとして進められているスマートセ ルを活用した生物合成の対象物質として注目を集めてい る.しかしながら、天然物合成には10以上の化学反応 が関与するため、一つの天然物の生物合成を達成するだ けでも多くの時間と労力を要するのが現状である。この 状況を打開して所望の天然物を標的とした生物合成を実 現するためには、天然物の生合成経路を合理的に推定す る手法が必須である.本研究課題では、「生物が進化の 過程で新たに獲得した遺伝子は、天然物生合成の後期修 飾反応に関与する」という仮定のもと、インドールアル カロイド(IA)を研究対象として選択し、申請者が提 案する化学情報統合型インフォマティクス解析を基盤と する生合成経路の推定と推定経路の実験的検証を行う.

【方法】本研究では、上述した仮説を立証するため、以下に示す方法で実験を進めた.これにより、IAの構造 多様化に関わる修飾酵素を明確にし、多様性構築機構に 対する知見を得た.

方法1) 生合成遺伝子群(BGC)の網羅的解析に基づ く経路の推定:特徴的な骨格構築酵素をクエリーとして 公開データベースに登録されているBGCを網羅的に取 得した.次いで,各BGCにある修飾酵素遺伝子を抽出 した後,その保存性に着目してA,B,C群に分類した. それぞれ,生合成前期,中期,後期に作用すると予想さ れた(図1).





方法2) 推定経路の実験的検証:BGC が報告されている nodulisporic acid を対象として,方法1で提唱した生合 成経路の妥当性を実験的に検証した.具体的には,①A群

南 篤 志

に分類される遺伝子の麹菌を宿主とした異種宿主発現と 鍵中間体1の抽出・カラムによる精製・核磁気共鳴スペ クトル測定 (NMR) による構造決定. ② B 群遺伝子導入 株の作製による鍵中間体2の取得。③C群遺伝子導入株 の作製による天然物の取得を検討した。また、興味深い 反応を触媒するフラビン依存性酸化酵素の解析も行った. 【結果・考察】BGC 情報と天然物の化学構造情報を詳細 に比較することで、A~C群に分類される酵素を特定し た. 異種宿主発現による解析の結果, A 群に分類された 3種の酵素は emindole SB. B 群に分類された3種の酵 素は nodulisporic acid D4の構築に関与することを解明 した. このプロセスにおけるハイライトは. フラビン依 存性酸化酵素 NodO による A/B 環の構築である (図2). 類似した A/B 環は shearinine にもみられ、やはり、フ ラビン依存性酸化酵素 JanO により構築される。両酵素 の機能的な相違点を理解するために基質特異性を検討し たところ、NodOは3環性IAのみを受容するのに対して、 IanOは3環性・4環性IAを受容することを突きとめた. 後期生合成についても検証したところ、チトクローム P450 である NodJ が側鎖の酸化反応を触媒することを解 明した. Nodulisporic acid は側鎖構造の違いにより4つ のタイプに分類されているが、上述した実験により、 NodJが経路の分岐に関わる鍵酵素であることを証明し た. 本成果は. Tetrahedron Letters 誌に受理された.

また,提案した経路予測法の一般性を検証するため,セ スキテルペンである PR-toxin の経路予測と実験的な検証 も行った.期待通り,A~C群に分類される酵素を特定 し,異種宿主発現により,生合成経路の全容解明に成功 した.本成果は,ACS Chemical Biology 誌に受理された. その他,総説(3誌)と書籍(1冊:分担執筆)を執筆した.



図2 Nodulisporic acid 生合成における鍵反応(中期: NodOによる A/B 環の構築,後期: NodJ による 側鎖の酸化) 酵母由来再構築型生体外タンパク質合成系を利用した非天然アミノ酸導入システムの確立

【目的】本研究では、申請者が開発した再構成型酵母翻 訳系 (Abe, 2020)を発展させ、非天然アミノ酸 (ncAA)を タンパク質に導入するシステムを確立することとした. 全tRNAを試験管内転写tRNA (iVTtRNA)で再構成した 翻訳系を利用して遺伝暗号を拡張し、複数種類の ncAA をタンパク質に導入できる系を目指した.抗体に低分子 薬剤を位置選択的に化学的に結合させる Antibody-Drug Conjugate (ADC) など、次世代の高分子医薬品の開発に 資することを目指している.



図1 iVT tRNAで再構成した酵母翻訳系

【方法】はじめに再構成型酵母翻訳系 (Abe, 2020) を基盤 として, 系内の全tRNAを21種類のiVT tRNAで再構成 した(図1). 当該翻訳系は、終止コドンの他、計34種の センスコドンがアミノ酸を指定しない空コドンとなる. 従来の生体外タンパク質合成系を利用した ncAAの導入 では、終止コドンにncAAを割り当てるため、導入でき る ncAAの種類に制限があった。更に系から翻訳終結因 子 eRF1 を除く必要があるため翻訳が適切に終結しな い. 当該翻訳系では、空コドンにncAAを割り当てるこ とにより、複数種類のncAAをeRF1存在下でタンパク 質に導入できる筈である. ■次に当該翻訳系を利用し, モデルタンパク質ナノルシフェラーゼに (nLuc), 空コ ドンを介してD型アミノ酸や Click ケミストリーアミノ 酸を導入することを検討した. D型アミノ酸 (D-Phe) は 人工 RNA 触媒フレキシザイムにより、Click ケミスト リーアミノ酸 (TCO*Lvs や PocLvs) はメタン生成古細菌 由来 Pvrrolvsine-tRNA 合成酵素変異体を利用して、iVT tRNAにチャージさせた. ■更にADCの開発を指向し, ラクダ科動物重鎖抗体由来抗原結合ドメインVHHに Click ケミストリーアミノ酸を導入することとした. VHH (分子量約15kDa)は、エピトープの多様性が大きい、 安定性に優れている、等の性質から、近年低分子化抗体 医薬として開発が活性化している. VHHのFR領域に

富田野乃

Click ケミストリーアミノ酸を導入すれば、Click ケミス トリーにより抗ガン剤等の化合物を更に結合できる筈で ある. そこで iVTtRNA によって再構成した酵母翻訳系 による VHH の合成を試みた.

【結果・考察】iVT tRNA によって再構成した酵母翻訳 系を利用し、はじめに3種の空コドン(AGC, AGG, UUG)を介して nLuc に ncAAを導入した(図2). その結 果、AGG コドンで ncAA が高効率で導入された.一方, AGCと UUG コドンでは、本来それらのコドンに対応し ない iVTtRNA による誤読が起き、何らかの天然アミノ 酸が誤導入される可能性が示された. 同様な解析を全て の空コドンについて行い、最終的に AGG と AGA の 2つ の空コドンにおいて、eRF1 存在下で ncAAを適切に導 入できることを明らかにした (データ示さず).

次に、モデルVHHとして抗 ALFAペプチドVHHを選 定し、HiBiTタグを付加した抗 ALFA-VHHの合成を試み た。HiBiTタグは LgBiT 存在下で nLuc を形成し、発光活 性を持つ。LgBiT 存在下で合成したVHHに ALFAタグを 付加した Haloタンパク質を添加したところ、 nLuc と Halo タンパク質の間で BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)が検出された。以上より iVT tRNA に よって再構成した酵母翻訳系により、抗原結合能を有する VHH の合成に成功した。また迅速で高感度な VHH の合 成効率および機能の評価システムを確立できた。今後、 AGG 及び AGA の空コドンを利用して抗 ALFA-VHH の FR 領域に Click ケミストリーアミノ酸を導入する予定である。



における非天然アミノ酸 (D-Phe)の導入

微生物によるリン酸セメントの生産技術開発

黒 田 章 夫

【目的】 微生物は、リン酸が複数つながったポリリン酸 を作る.面白いことに、ポリリン酸を取り出してカルシ ウムを加えると、濃縮したコロイドゾルになり、接着性 を示した(図1).現在、骨の接合などに使われる PMMA(ポリメチルメタクリレート)骨セメントは主に 2つの問題点が挙げられている.1つ目は、生体への吸 収性がないことである、骨そのものに置き換わることが ないため、周囲の骨から剥離してゆるみが生じやすくな る.2つ目は、このセメントに含まれるモノマー成分が 持つ毒性である.重合後に残留した未反応モノマーが細 胞毒性および組織毒性を示し、生体に悪影響を及ぼす可 能性が懸念されている.

一方, ポリリン酸カルシウムは, リンとカルシウムのみか らなるため生体毒性は低く, さらにリン酸ジエステル結合 の分解によってヒドロキシアパタイト(Ca₁₀[PO₄]₆[OH]₂) として, 歯や骨そのものに置き換わる可能性のある新し い無機材料と考えられる. すなわち, ポリリン酸カルシ ウムは, PMMA骨セメントに代わる新しい接着剤になる 可能性がある. もし, ポリリン酸カルシウムのアパタイ ト化を自由に制御することができれば, 歯の修復や人工 骨の新しいバインダー(リン酸セメント) としての応用 が期待できる. 本研究では, リン酸セメントにおけるポ リリン酸の鎖長の影響や接着力について詳しく検討した.



図1 Pseudomonas putida ポリリン酸蓄積変異株の蛍光顕 微鏡画像(左)とポリリン酸カルシウム(右).

【方法】 P. putida の培養は酢酸ペプトン培地で行った (JBB, 95, 637, 2003). 1Mに調製した短鎖ポリリン酸(鎖 長10-30 程度), 中鎖ポリリン酸(鎖長 100-150 程度), 長鎖ポリリン酸(鎖長 700 以上) 10mLを調整し, それ ぞれ1M CaCl₂ 25mLと混合し, ポリリン酸カルシウム を作って性状や接着性の違いを比較した. 二つの人工骨 をポリリン酸カルシウムで接合後, 片方のみプラスチッ クに埋め込んで卓上型引張圧縮試験機に固定し, 上から 力をかけて人工骨の接合部が外れるときにかかる荷重の 大きさから接着力を測定した(図2A).

【結果・考察】短鎖, 中鎖, 長鎖のポリリン酸カルシウム の接着力を測定したところ、中鎖ポリリン酸カルシウム が最も強い接着性を示した、このことから、中鎖ポリリ ン酸カルシウムをリン酸セメントとして活用することと した. また, 短鎖と長鎖のポリリン酸カルシウムには接 着性はなかったが、伸ばしてみると短鎖はすぐ切れてし まうのに対し、長鎖は延性があることがわかった.この 延性を利用すると細長い繊維(長鎖ポリリン酸カルシウ ムファイバー)が作れることもわかった.面白いことに. 中鎖ポリリン酸カルシウムからなるリン酸セメントに長 鎖ポリリン酸カルシウムファイバーを混合することで接 着力が向上することがわかった。おそらく繊維を分散さ せることで、せん断耐力の向上やひび割れの抑制の効果 が得られたと考えられた. リン酸セメントの人工骨に対 する接着力は12N/cm².リン酸セメントに繊維を混合し た場合最大で31N/cm²まで向上した。医療用接着剤で ある CoSEAL® (4.91~9.03 N/cm²) より接着力が高く、 Evicel® (14.0~27.5N/cm²) に相当することがわかった (図2B). 今後の展開としては、歯の知覚過敏の修復や、 3D 骨プリンターにおける微細アパタイトの接着剤とし て利用し、テーラーメイドな骨の造形などに利用したい.



図2 リン酸セメントの接着力試験.(A) 圧縮試験機によ る接着力試験.(B) リン酸セメントの接着力の比較

所属 広島大学大学院統合生命科学研究科 E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp

農耕生態系における共微生物叢の包括的把握と作物強靭化に関わる作用機序の解明

【目的】国内における飼料用トウモロコシの生産性の向 上が注目されている一方,トウモロコシ栽培における省 耕起栽培の普及が進んでいない.耕起管理は作物の生産 性だけでなく,土壌の生産性と持続可能性に寄与してい る.土壌が耕うんされることにより,土壌微生物の1種 であるアーバスキュラー菌根菌(AM菌)を含めた土壌 微生物の群集構造や多様性も変化し,その違いが土壌生 産性にも影響を及ぼす可能性がある.そこで,本研究で は微生物叢を基盤とするトウモロコシの省力型栽培技術 の開発を目指し,異なる耕起処理で栽培されたトウモロ コシの根内と根圏土壌を対象に,生育促進効果に秀でた 土壌微生物集団(叢)を探索することを目的とした.

【方法】本研究では日本大学生物資源科学部付属農場(黒 ボク土) にて,15mx9mの区画に慣行耕起(ロータリ耕, ボトムプラウ耕)と省耕起(ディスク耕,不耕起)でト ウモロコシを栽培する試験区を5反復設けた. 土壌試料 の採取は2022年6月と2023年5月の耕起処理後、トウ モロコシ根の採取は播種後5週目に行った。2022年と 2023 年の根採取までの気象データは平均気温が 25.2℃と 22.3℃, 積算降水量は89mmと321.5mm, 積算日射量 は174.4hと162.8hであった. 土壌と根からのDNA抽 出は NucleoSpin Soil と NucleoSpin Plant II キットを用 いた. 細菌, 真菌とAM 菌の PCR 増幅には 515F parada/ 806R Apprill, fITS7/ITS4, AMVNF4.5/AMDGR プライ マーセットをそれぞれ用いた. PCR 増幅. ライブラリー 精製後, MiSeq (イルミナ社) にてアンプリコンシーク エンス解析を実施し、得られたデータを用い群集構造・ 多様性の解析を行った.

【結果・考察】本研究では異なる土壌攪乱強度で栽培し たトウモロコシの生育・収量と、土壌・根内の微生物叢 に及ぼす影響について調査した.2か年に渡る圃場研究 から、耕起強度が強く、土壌が軟らかいロータリ区が栄 養生長期における生育面で耕起強度の低い区と比べ有意 に高い値を示し、ロータリ区が最も高い傾向がみられた. 収量面においてもロータリ区が耕起強度の低い区と比べ 有意に高い値を示した為、耕起強度が強い区ほど生育・ 収量において有利であると考えられる.また、養分吸収 量の面においても耕起強度が強いロータリ区が他の区と 比べ高い傾向がみられたことから、耕起強度が強い区で は発根や根の伸長に有利であり、より多くの養分が吸収 できる可能性が示唆され、生育初期、後期に有利な影響

肥後昌男

を及ぼすことが考えられる.本研究で土壌深度0-10cm の土壌貫入抵抗値は不耕起≒ディスク>ボトムプラウ> ロータリ区の順で高かった.以上のことから,土壌化学 性の違いよりもむしろ土壌硬度が高くなることでトウモ ロコシ根の伸長の抑制から養分吸収が制限され,ディス ク区や不耕起区で生育が抑制されたと考えられる.また, 土壌とトウモロコシ根内の微生物群集構造の違いを明ら かにするため,主座標分析 (PCoA)を行った結果,土 壌,根内の微生物叢 (AM 菌,細菌,真菌)は耕起処理で 異なることが判明した (図1).ただし,耕起処理だけで なくトウモロコシ側の作物遺伝子や環境条件も含めて微 生物叢が制御されている可能性がある.さらなる発展を 目指し,今後は環境条件を制御したポット試験から微生 物叢を制御する植物側の因子の探索を試みる必要がある.



図1 攪乱強度の違いによる土壌とトウモロコシ根内の 微生物叢の分布(2023年度)

腸内細菌に対するヒトモノクローナル抗体の探索と抗原分子の解析

中野秀雄

【目的】腸内細菌叢の形成は、誕生直後から始まり、乳 幼児に形成されたものは、生涯影響を与える一方で、プ ロバイオティクスは、数日しか体内に存在できないこと から、乳児期に定着した腸内細菌叢は、免疫系から「自 己」と認識されていると考えられている.しかしながら その分子的なメカニズムについては、ほとんど明かされ てない.また、母親から乳児への腸内細菌が垂直伝播す ることを考えると、免疫記憶も母子の間で引き継ぐシス テムがあると想定されるが、もし腸内細菌特異的 Ig が 母乳を介して乳児に移ることで、有益な微生物の定着を 助けている可能性を検証できれば、ヒト免疫が確立され ていく長いプロセスの初発状態を分子レベルで明らかに できると想起した.

そこでまずウサギを対象として実験系を確立し、次に ヒト腸内細菌に対するヒトモノクローナル抗体(hMab) を取得し、さらにその標的分子を明らかにすることを目 的として研究を行った.

【方法】ハイスループットかつ安価に抗腸内細菌 Mab を 取得するため、申請者らが開発した単一B細胞からの Mab 取得技術である Ecobody 法を用いて、免疫してい ないウサギ末梢血中の単一B細胞より、ウサギ糞便中に 存在が確認された Bacteroides cellulosilyticus に対するウ サギ Mab の取得を試みた.次に得られた Mab の様々な 腸内細菌に対する結合特異性を幅広い腸内細菌に結合す るウサギモノクローナル抗体 (rMab)をスクリーニング し、Brevibacillus を用い Fab として分泌生産・精製した. ELISA により Fab の各種腸内細菌に対する結合選択性 を調べ、バイオレヤー干渉法により親和性を測定した.

NITEより提供されたヒト糞便由来腸内細菌 (Acidaminococcus sp., Christensenella sp., Parasutterella sp., Parabacteroides sp., Clostridium sp., Faecalicoccus sp., Flavonifractor sp., Intestinimonas butyriciproducens sp.) に結合する EBウィルス不死化 B 細胞 (HEV) を濃 縮し, mRNA 抽出後に逆転写反応と PCR で scFab の形 に合成した. 続いてリボソームディスプレイ法により上 記腸内細菌に結合する hMab を濃縮後, 大腸菌にクロー ニングした.

【結果・考察】ウサギ糞便中より単離された B. cellulosilyticus に対して高い結合性を示したウサギモノクローナル抗 体遺伝子を、N末端に signal3 (pBIC3) および signal4 (pBIC4) と融合、さらにC末に 6xHis タグ配列と融合さ せて、pNCMO2ベクターに挿入した.構築した発現プ

ラスミドを Brevibacillus choshinensis に導入し, Fab と して分泌発現させた培養上清より Ni アガロースとゲル ろ過により精製した。得られた Fab 抗体は、グラム陰性 の腸内細菌である Parabacteriodes sp., Christensenella sp., Parasutterella sp. に反応するだけでなく、グラム陽 性の腸内細菌である Catabacter sp., Clostridium sp., Flavonifractor sp., Intestinimonas sp., Peptoniphilus sp., Faecalicoccus sp., Mediterraneibacter sp. に結合活性を示 した. しかしながら酵母や HEK 細胞にはほとんど結合 しなかったことから、細菌の膜にグラム陰性細菌と陽性 細菌共通に存在する分子に結合していることが予想され た. さらに, B. cellulosilyticus の LPS 画分に対する親和 性をバイオレヤー干渉法により測定したところ、2.41nM という Kd 値が得られた (図1). 免疫を行っていないウ サギ血液より、このように幅広く細菌に対して強い親和 性を示す抗体が得られたということは、腸内細菌と獲得 免疫系との相互作用を考える上で興味深い.



図1 バイオレヤー干渉法によるウサギ Fab 親和性測定 (グラフは各 Fab 濃度でのシグナルを表す)

ヒト糞便由来腸内細菌混合物に結合したHEV細胞より, リボソームディスプレイ法により得られたscFab各ク ローンから,PCR増幅,無細胞タンパク質合成系によ りscFabを合成し,ELISAを行ったところ,約半数のク ローンが上記菌体混合物に対して結合活性を示した.そ のうち一つのクローンに着目して研究を進めたところ, 調べた限りのグラム陽性細菌に強く結合性していた.し かしグラム陰性細菌に対しての結合は弱く,酵母や HEK細胞にはほとんど結合しなかった.

以上の結果より,本手法は腸内細菌に対する効率的な hMab 取得,配列解析,性質決定法として極めて有効で あり,また血液中にも腸内細菌に対する抗体が存在して いる可能性が示唆された. 多様化するカンジダ症原因菌の病原因子および抗真菌薬感受性と分子系統分類との関連性

【目的】侵襲性カンジダ症は死亡率が高く早急かつ適切 な抗真菌薬投与を要するが、起因菌が病原性の報告のな い菌種であり有効な治療薬が不明で治療が難法する例が ある.この問題を解決するには、新規病原性菌種を予め 特定する方法、あるいは薬剤感受性不明の新規病原性菌 に有効な抗真菌薬を推定する方法の開発が切望される. しかしながら、病原因子や薬剤感受性に関する研究は *Candida albicans*をはじめとする主要病原性カンジダ菌 数種に限られる.本研究では千葉大学真菌医学研究セン ター(IFM)に保存される臨床検体由来広義カンジダ菌 32種74株に共通する病原因子、および抗真菌薬感受性 と分子系統分類との関連を検討した.

【方法】分子系統関係は26S rDNA-D1/D2 に基づき,必 要に応じ ITS 領域を解析した.感染成立に必要とされ る病原因子は組織破壊・分解に関与する菌体外酵素産生 能(プロテアーゼ,ホスホリパーゼなど6種類)を培養 法により評価した. 宿主免疫応答に関与する菌糸形成は 菌糸誘導物質である N-アセチルグルコサミン、メチオ ニン,血清などを含む5種の培地におけるコロニー形態 に基づき判断した。宿主組織内環境へ適応し発育する能 力は生育上限温度,アネロパック®を使用した微好気・嫌 気条件における生育性を試験した. さらに、留置カテー テルを介した血流感染が臨床で問題となることから、浸 透圧比4の高カロリー輸液における生育性を試験した. 抗真菌薬6剤(図1)の最小発育阻止濃度はCLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute, USA)の方法 に準拠し微量液体希釈法で決定した. 感性・耐性の判断 は CLSI が定めるブレイクポイントに従った.

【結果・考察】菌体外酵素産生能および菌糸形成能は共通する病原因子ではなく、分子系統分類との関連性も不明であった.一方、宿主細胞内環境に適応し発育する能力とし、35℃以上の生育上限温度、微好気条件(酸素濃度6~12%、二酸化炭素濃度5~8%)における生育能が共通の病原因子であった.つまり、35℃および微好気条件で生育する菌種は感染症を引き起こす可能性を明らかにした.感染リスクの点で、C. auris 1株を除く全株は高カロリー輪液において生育可能であり、菌体外酵素を産生しない菌種も輸液を介し容易に血管内に混入し、死亡率の高い菌血症を引き起こす可能性を明らかにした.

薬剤耐性は獲得耐性と自然耐性を考慮し,可能な限り 同一種複数株の抗真菌薬感受性プロファイルを比較した. その結果,一部の種では多型を示し獲得耐性が示唆され

永塚由佳

たものの、同一種複数株で概ね類似した. 症例報告のない Blastobotrys mokoenaii および Starmerella sorbosivoranas は複数の抗真菌薬に耐性傾向で、効果を期待できる治療 薬が限られた. Blastobotrys/Trichomonascus クレードに 帰属する3種4株は共通する複数の薬剤に耐性であり、抗 真菌薬感受性と分子系統分類との関連性が示唆された. また、本クレードでは第一選択薬の候補としてミカファ ンギンが挙げられた. 今後、病原性の報告のない菌種を 含め更なる検討を行うことで、各薬剤に感性・自然耐性 の進化的分岐点を特定し、「分子系統学的位置に基づいた 治療に有効な抗真菌薬選択法」を確立し救命に繋げたい.



図1 カンジダ菌32種の系統と病原因子・薬剤感受性

リン酸化ネットワークを介したワックスエステル発酵制御機構の解明

石川孝博

【目的】 微細藻類ユーグレナ (Euglena gracilis) は, 好気 条件下で貯蔵多糖パラミロン(B-1,3-グルカン)を合成・ 蓄積する、低酸素状態になるとユーグレナは、パラミロ ンをグルコース単位に分解した後、"ワックスエステル 発酵"と呼ばれるユーグレナ独自の代謝経路により、ミ リスチルミリスチン酸(C28)を主成分とする貯蔵脂質 ワックスエステルへと代謝変換する.研究代表者らはこ れまでに、低酸素状態に応答したワックスエステル発酵 経路の活性化にはタンパク質のリン酸化による翻訳後修 飾が重要であること、その制御にはWSRK (Wax ester Synthesis Regulation Kinase)と命名した新奇タンパク質 キナーゼが鍵因子として関与していることを明らかにし てきた. しかし、ユーグレナがWSRKを介してどのよ うにワックスエステル発酵経路を活性化しているのか, その詳細は不明である、本研究では、WSRKの特性と、 その下流の標的因子を探索・同定することでリン酸化 ネットワークを明らかにし、嫌気条件に応答したワック スエステル発酵調節の分子機構解明を目的としている.

【方法】ユーグレナはSM-ZK株を使用した. 培養は常 法にしたがってKH培地を用い、26℃のインキュベー ターで振とう培養を行った. 組換え体 WSRK は, pCold ベクターを用いて大腸菌 BL-21 株で発現させ、Ni-親和 性カラムで精製した標品を用いた.キナーゼ活性は常法 にしたがって[v-³²P]ATPを用い*in vitro*で反応後. SDS-PAGE でタンパク質を分離し、オートラジオグラ フィーにより評価した. WSRK発現抑制ユーグレナ (WSRK KD) は、合成した WSRK の部分二本鎖 RNA を電気穿孔法により細胞導入して調製した. イムノブ ロットは常法にしたがって実施し、WSRK 抗体、ピル ビン酸 NADP⁺オキシドレダクターゼ (PNO) 抗体およ び PNO リン酸化特異抗体は、合成ペプチドを抗原にポ リクローナル抗体を作製して使用した、ピルビン酸脱水 素酵素複合体(PDH)αサブユニット抗体は市販品を 用いた.

【結果・考察】はじめに組換え体野生型 WSRK および, リン酸化が予測される Thr186/Tyr188 を Asp 置換した 変異型 WSRK を作製し,キナーゼ活性の評価を実施し た.野生型 WSRK では強い自己リン酸化活性が認めら れたのに対し,変異型 WSRK はその活性が顕著に低下し たことから,WSRKの活性発現には脱リン酸化の必要が 強く示唆された.次に,WSRKの標的となる下流因子を 調べるために、合成二本鎖 RNA 導入により WSRK_KD を調製し、リン酸化プロテオームおよびメタボローム解 析を実施した.その結果、ワックスエステル代謝関連酵 素のうち、ピルビン酸からアセチル CoAへの触媒を担 うユーグレナ独自の酵素 PNO がその候補の一つである 可能性が示唆された.PNO 抗体および PNO リン酸化特 異抗体を用いたイムノブロット解析の結果より、コント ロール細胞では低酸素処理後に経時的な PNO リン酸化 レベルの増加が観察されたが、WSRK_KDでは PNO リ ン酸化が観察されなかった.また、WSRK_KDでは、 コントロール細胞に較べ低酸素処理後の PNO 活性が有 意に抑制されていた.一方、通常の好気条件下で機能す る PDHα サブユニットのリン酸化は、WSRK 発現抑制 の影響を受けなかった.

以上の結果より、WSRKを介したリン酸化によるワッ クスエステル代謝調節機構について考察した.通常の好 気条件下では、WSRKはリン酸化修飾を受けて不活性 化されており、PNO 活性も抑制されている.ピルビン 酸からアセチル CoAへの変換は、既知の PDH が機能し てエネルギーを獲得している.一方、低酸素状態になる と、PDH は PDH キナーゼによって活性抑制される (図1).この時、WSRKは脱リン酸化されることで活性 化し、その結果として下流の標的因子である PNO がリ ン酸化を受けて活性化されることで、PDH に代わって ピルビン酸からアセチル CoAへの反応を触媒し、ワッ クスエステル合成に寄与していると考えられる(図1).



図1 ユーグレナにおいて推測される WSRKを介した ワックスエステル代謝調節機構の概略.

宿主環境に最適化された抗菌治療薬探索法の確立

浜本 洋

【目的】従来,血清中のアルブミンなどの宿主因子は, 抗菌化合物と結合し,化合物の血中遊離濃度を低下させ ることによって,抗菌活性の発揮を阻害する因子として 考えられていた.最近,私達が同定したライソシンEの 抗菌活性が,血清中のアポリポプロテインA-I (ApoA-I), 及び,肺サーファクタントによって上昇することを見出 した.また,ApoA-Iの作用が治療効果にも貢献してい ることを見出している.そこで,本研究では宿主因子に よって,抗菌活性が上昇する化合物群を網羅的に検討し, その傾向を明らかにした.また,肺サーファクタント中 の活性化因子の同定,及び,宿主因子によって活性化さ れる抗菌薬の探索法を確立することを目的とした.

【方法】宿主因子を所定の濃度で添加したMuller Hinton 培地 (MHB) と加えていない MHBを用いて, *Staphylococcus aureus* RN4220株に対する抗菌活性を微 量希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC:µg/mL)を測 定した. 肺サーファクタントからのライソシンEの活 性化成分の同定は,以下の方法により行った.ウシ肺肺 サーファクタントの懸濁液から,ブタノールの二層分配 により活性を示したブタノール層を分取し,エバポレー ションにより濃縮乾固した.そのサンプルについて, AQUASIL SP-100 (センシュー科学,4.6mm×250mm, hexane/2-propanol gradient,1mL/min)を用いて HPLC により精製を行った.最も活性が高い画分について, TLC により各種脂質と移動度の比較を行った.

【結果・考察】黄色ブドウ球菌において、ApoA-Iによっ て活性が上昇する既知抗菌化合物の同定を行った. その 結果、ライソシンEおよびナイシン、ラモプラニンの 抗菌活性がApoA-Iによって促進されることがわかった (表1). これらの化合物はいずれも lipid II と相互作用す る殺菌性の性質を示すことから、ライソシンEと同様の 機序で活性が上昇すると考えられる.一方, ApoA-Iの 効果はこれらの抗菌薬に限られたものであった.そこで、 他の宿主因子の検討も行った(表1). その結果. ライソ シンEとラモプラニンが、血清、肺サーファクタントお よび胆汁によって抗菌活性が上昇することを見出した. また、アミノグリコシド系抗菌薬が胆汁により、マクロ ライド系抗菌薬の大部分が血清の添加によって抗菌活性 の上昇が認められた.一方、同じマクロライド系のフィ ダキソマイシンは血清では活性化せず、ムチン、肺サー ファクタントにより活性化した. これらの結果は、種々 の宿主因子にも, 抗菌化合物と相互作用し, その活性を上 昇させることがあることを示している.抗菌活性を促進す るという観点により、宿主因子を横断的に、かつ抗菌化合 物を網羅的に検討した例はなく、本結果は宿主と微生物お よび抗菌化合物の三者間の相互作用や、抗菌薬の適正使用 法をあきらかにする上で、重要な基礎データとなっている.

表1 宿主因子の添加による抗菌活性の変化(MIC:µg/mL)

抗菌薬	クラス	Control	血清		胆汁	ムチン	肺サーファク	
				ApoA-I			タント	PE
アルベカシン		0.5	0.25	0.5	0.0078	0.25	0.5	ND
アミカシン		1	1	1	0.063	1	1	8
ゲンタマイシン	アミノグリコシド	0.25	0.25	0.25	0.0078	0.25	0.25	0.5
ストレプトマイシン		4	4	4	0.5	4	4	ND
リポスタマイシン		2	8	2	0.25	4	8	ND
ラモプラニン	グリコリポデプシ ペプチド	2	0.063	<0.078	0.13	2	0.25	0.063
ダプトマイシン	11-12-10-27-10	0.13	0.13	ND	0.13	0.5	2	1
ライソシンE	リルヘノナト	4	0.13	0.25	0.25	8	1	0.25
ナイシン	ペプチド	8	2	2	16	ND	ND	4
アジスロマイシン		0.5	0.13	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
クラリスロマイシン		0.13	0.031	0.13	0.063	0.13	0.063	0.13
エリスロマイシン	20001F	0.25	0.063	ND	0.13	0.25	0.25	0.25
フィダキソマイシン		4	4	ND	2	1	1	ND

次に肺サーファクタントからライソシンEの活性化を 引き起こす因子の精製を試みた.その結果,リン脂質で あるホスファチジルエタノールアミン(PE)が同定され た(図1). PEは、ラモプラニンの抗菌活性も促進したが、 ナイシンの抗菌活性は促進しなかった(表1).従って、 これらの間では異なる作用機序が存在すると考えられる. さらに土壌細菌の培養上清から、ApoA-I、PEによって抗 菌活性が促進する因子の探索法の確立を試みた.沖縄の 土壌由来のライソシンE生産株Lysobacter sp. RH2180-5 の培養上清において、抗菌活性の促進が確認できたこと から、本アッセイ系を用いて宿主因子により抗菌活性が 促進される抗菌化合物を生産する株の同定が可能である と考えられる.



 図1 RP-HPLCカラムにおけるライソシンE抗菌活性 促進因子の溶出パターン F3が最も活性が高く、 本画分にPEが検出された

合成生物学的手法による液体燃料の自在合成基盤の確立

【目的】持続可能な社会を実現するため二酸化炭素 (CO₂)削減に向けた動きが世界で活発化している.輸送 セクターに関してはガソリン車販売禁止の流れが欧米だ けではなくアジアにも広がり、2030~2035年にガソリ ン車の販売禁止を掲げる国はアメリカ、イギリス、ドイ ツ、中国など主要先進国を含む、この流れを受け近年電 気自動車が注目されているが、高額な購入価格、充電ス テーション不足、長距離移動に向かないなど課題も多い、 実際、ドイツやスコットランドがガソリン車販売禁止に 関して昨年から抵抗・延期するなど世界の足並みは揃っ ていない.我が国も例外ではなく,欧米とは異なり電気 自動車の定義にハイブリッド車も含むなど当該政策に抵 抗が見られる. すなわち, 国内では 2035 年以降もガソリ ンの需要が大幅に減らず、我が国のCO。削減速度はそれ ほど加速しないと考えている. そこで本研究では、ガソ リンを化石燃料ではなく CO2 から生産する戦略により上 記課題の根本的な解決を可能とする新技術の確立を目指 す. 具体的には、植物バイオマスなど再生可能資源を半 人工微生物によってガソリン代替物に変換し、カーボン ニュートラルな液体燃料を製造する手法の確立を目指す.



【方法】過去に米国で実施した研究では、とうもろこしの不可食部分をガソリン代替物である2-メチル-3-ペンタノンに変換する Streptomyces albidoflavus J1074株の開発に成功している.2-メチル-3-ペンタノンは、2種類のオクタン価に関して、理想ガソリンである2,4,4-トリメチルペンタンと同一の値を示す.さらには、発熱量(予測)や水に対する不溶性が高く次世代ガソリンとして有望であると考えている.一方で社会実装するには少なくとも現在の数十倍の収量を達成する必要がある.そこで本研究では、S. albidoflavus の野生株(J1074)及び各種生合成遺伝子クラスターのノックアウト株(Del14, B2P1, B4)の計4種類の株、過去の研究で使用した

湯澤 賢

Eggerthella lenta 由来の gapdh プロモーター (Ga) に加 えて tet*RBS3 プロモーター (Te), stnY プロモーター (St) の計3種類のプロモーターを用いて従来株の改良 を試みた (図1). また, 2-メチル-3-ペンタノンに関し て燃料試験を追加で実施した.

【結果・考察】過去の研究では、S. albidoflavusの J1074 株に我々が開発した2-メチル-3-ペンタノンを生合成す る人工遺伝子をGaプロモーターの制御下に置くことで M042 培地において 106mg/Lの2-メチル-3-ペンタノン の生産を報告している (J1074 Ga). 本研究では、従来 株を含め計12株の作製を目指した(4種類の株x3種類 のプロモーター=12株). 現時点で10株の構築に成功 しており、それらのM042倍地における2-メチル-3-ペ ンタノンの生産能をLC-MS解析によって定量した. 今 回国内で作製したM042培地ではより安価なサプライ ヤーの原料を一部使用したが、生産量はそれほど変わら ず 80 mg/Lであった (図 2). また、J1074 株に関してプ ロモーターを変更した場合,同様のプロモーターを Del14株で試験した場合には収量の改善は見られなかっ た(図2).一方で、B2P1とB4関連の株では収量が約 20-40%向上した(図2). Del14, B2P1, B4株の違い は標的 DNAの導入サイトのゲノム上の数であり、実際 に複数の遺伝子がゲノムに導入されていることをゲノム の配列解析によって確認した。燃料試験に関しては、2-メチル-3-ペンタノンの発熱量(実測),蒸気圧,酸化安 定性,沸点,残留物,損失,銅の腐食を追加で試験した. これらのうち酸化安定性以外に関しては2.4.4-トリメチ ルペンタンと遜色無い値を示した.酸化安定性のみガソ リンとしての基準に及ばず(240min以上が求められる が、33min)、単独使用ではなくブレンド仕様が推奨さ れる結果となった.



図2 各プロモーター・各 albidoflavus 株における 2-メチル -3-ペンタノンの生産

所属 慶應義塾大学先端生命科学研究所 E-mail: syuzawa@ttck.keio.ac.jp

穿孔貝の共生微生物の生存戦略

沖 野 龍 文

【目的】海洋天然物の中でも、とりわけ無脊椎動物から 得られた重要な天然物の多くが、共生微生物によって生 産されることはよく知られる.共生微生物の存在が知ら れている穿孔性の二枚貝のフナクイムシに我々は注目し た.フナクイムシは、流木・沈木、木造船などに孔をあ けて生息する.共生微生物が木のリグノセルロースを分 解して栄養分とする.自らが作り出した富栄養環境にお いて,他の微生物に負けないための生存戦略として、抗 生物質を分泌したり、シデロフォアにより鉄を効果的に 取り込むと考えられている.さらに窒素固定能を有する. これらの生存戦略に重要な役割を果たしているであろう 二次代謝産物を明らかにすることを目的とした.



図1 キタオオフナクイムシ Bankia setacea 上) 個体全体 下) パレット

【方法】北海道内の海岸に漂着している流木を大学に持ち帰り、木を割ってフナクイムシを取り出した.フナク イムシを得ることができた採集地は、石狩市、余市町、 苫小牧市、函館市、えりも町、紋別市、別海町であった. 計測、写真撮影すると共に、パレット(尾栓)を保存し た.分類は、パレットの形態により行った.

新鮮なフナクイムシの鰓を顕微鏡下で切り出し,滅菌 海水により懸濁させたものを、セルロースを唯一の炭素 源とする培地に播種した.セルロースを分解した株の単 離を寒天培地上で実施した.得られた単離株について, 16SrRNA解析を行うと共に大量培養を実施した.

大量培養菌株および培養ろ液から、メタノール抽出、 ODSカラムクロマトグラフィーによる分離を経て、 LC/MSを指標にHPLCで二次代謝産物の単離を試みた. 【結果・考察】北海道沿岸の漂着物調査の記録などを参 考に採集地を選定し、初夏に生まれた個体が十分に成長 したと思われる時期9月~11月に採集を行った. その 結果、フナクイムシ Teredo navalis、ヤツフナクイムシ Lyrodus pedicellatus、キタオオフナクイムシ Bankia setacea に加えて、北海道内での文献記録のないクロヌマオオフ ナクイムシ B. carinata, キンギョクオオフナクイムシ B. bipennata, ウチワフナクイムシ Psiloteredo pentagonalis が得られた.限られた採集機会にもかかわらず,国内の 主要 13種のうち6種を採集できた.これらから13種の 共生微生物を単離した.これまでフナクイムシの共生微 生物の天然物化学研究は、ほぼ1グループにより実施さ れてきており、特有の微生物 Teredinibacter turnerae に 集中していた.我々も同種を得られると考えていたが、実際には1株も得ることができず、多種多様なバクテリ アが得られた.



図2 O2213-2株から得られた二次代謝産物1-3の構造

冷水性のフナクイムシである *B. setacea*(図1)に共 生していた O2213-2 株は *Alteromonas* sp. と同定された. 同株から単離された化合物を LC/MS および NMR で分 析したところ図2に示す既知の抗菌物質 tartrolon D (1), teredinibactin A (2),銅,鉄,モリブデンと結合する turnercyclamycin A (3) および新規 teredinibactin 類であ ることがわかった.上記のうち既知化合物は *T. turnerae* か ら報告されていた化合物で,今回 *Alteromonas* sp. から発 見されたことは興味深い.新規物質の活性は検討中である.

天然物化学者に着目されている海洋無脊椎動物の共生 細菌は培養困難であることが多いが、フナクイムシ類の 共生細菌は培養により得られる新規二次代謝産物のソー スとして期待される.分類学的に大きく異なる細菌が、 生存に必要な機能を有する同じ化合物を生産するように 進化してきたのか、遺伝子解析も含めて今後の精査が必 要である.

病原性関連因子を分解代謝する微生物による植物病害防除

【目的】2'-deoxyuridine (dU) はイネいもち病菌 Pyricularia oryzae が宿主植物体へ侵入する際に,自ら産生する感染 促進物質であることが知られている.したがって,dU を分解する微生物はいもち病菌のイネでの発生の防除に 役立つと考えられる(図1).本研究では,①これまで にイネ栽培環境より分離したdU分解微生物から,dU 代謝酵素を精製し,その機能を解析することで病原菌の 産生する病原性関連物質を分解する微生物の有用性を明 らかにする.さらに,②dUによるいもち病菌感染促進 の作用機構の解明を目指し,得られたdU代謝酵素を dU消去剤として用いることで,いもち病菌におけるdU の果たす役割も明らかにすることを目指した.



図1 dUを介した宿主-病原菌-dU分解菌の相互作用 いもち病菌はdUを生産しながら宿主細胞で感染拡 大を起こすが(上), dU分解菌存在下では感染拡大 が抑制される(下)と考えられる.

【方法】①高いdU分解活性および発病抑制能をもつ Burkholderia sp. HMS65株から細胞抽出液を調製した. イオン交換・疎水性・ゲル濾過クロマトグラフィーを用 いて精製を試みた.得られた部分精製標品を用いて酵素 化学的性質の調査および,イネ・オオムギでの発病抑制 効果の検証を行った.②また,dU自体のいもち病菌で の機能の検証のため,プラスティックカバーグラスを用 いて,病原性に関与する付着器形成率,形成胞子から付 着器までのグリコーゲンの転移量(オートファジー・付 着器内膨圧の形成)を調査した.

【結果・考察】Burkholderia sp. HMS65株の培養ろ液と 細胞抽出液のdU代謝活性を測定したところ,9割以上 の活性は細胞抽出液に局在していた.各種クロマトグラ フィーによる酵素の精製を試み,精製度44.3倍,回収 率6.31%,比活性127µmol/h/mgの部分精製標品を

佐藤育男

0.24 mg 得ることができた. 精製標品の酵素化学的性質 を調べたところ, dUに対する Km 値は 0.52 μM であった. 本酵素の dUに対する Km 値は既知のヌクレオシド代謝 酵素のそれに比べ 100 倍以上低く dU に特化した酵素で あることが示唆された. 得られた部分精製標品はイネお よびオオムギの切断葉における発病抑制効果を示したこ とから, dU の除去により, いもち病菌の感染が抑制さ れたことが示唆された (図 2).

いもち病菌における dU の機能解析について、プラス ティック上で、胞子懸濁液に dU を処理したところ付着 形成率が上昇することが示された(図3).また、胞子 のオートファジーが誘発され胞子から付着器へのグリ コーゲンの転移が増加し、付着器内膨圧の形成を加速す ることが示唆された(図4).高膨圧の付着器は表皮細 胞に貫通しやすく、病原性に直接関連することが考えら れる.このことから、dU が胞子のオートファジーを促 進し、付着器および侵入菌糸に栄養分を移行することで 病原性を増加させることが示唆された.



図2 dU代謝酵素によ る発病抑制効果 上部の写真はオオムギ切 断葉上での病斑形成(褐 変部)を示す.病斑の大き さによりDisease severity

を算出した.*はt-test によりp<0.05で対照区 と有意差あり.エラーバー は標準偏差を示す.



図3 いもち病菌における dUの機能 (A)付着器形成率,(B)胞子から付着器へのグリコー ゲン転移率.右側の写真の色の濃い部位はグリコー ゲンの染色部位を示す.上部の時間は胞子懸濁液へ の dU 添加後の経過時間を示す.*はt-test により p<0.05で Control との間で有意差あり.エラーバー は標準偏差を示す.

好冷性放線菌のラッカーゼを用いた新規タンパク質架橋酵素の創出

時 下 進 一

【目的】ラッカーゼは酸素の還元反応を伴い多くの芳香 環をもつ有機物や誘導体を酸化することができる.その 基質特異性は低く,架橋メディエーターと呼ばれる低分 子フェノール化合物の存在下でタンパク質中のチロシン 残基の酸化によりタンパク質の分子内,分子間架橋を触 媒する.ラッカーゼは食品加工に用いられる微生物由来 のトランスグルタミナーゼとは異なるアミノ酸を架橋す るため、タンパク質架橋酵素として,筋原繊維タンパク 質やカゼインの架橋研究が行われている.これらの研究 では,真菌のラッカーゼが用いられており,中性付近の pH,中温から高温で酵素反応が行われる.一方,極限 微生物のラッカーゼは広範なpHと温度帯で活性を有す る.低温での食品加工では,低温で十分な活性を有する 酵素の需要は高いが,高温活性酵素に比べて低温活性酵 素に関する研究は例が少ない.

本研究では好冷性放線菌(至適生育温度約10℃)の ラッカーゼを異種発現させ、精製したのち、酵素特性の 解明とタンパク質架橋酵素としての評価を行なった.

【方法】 好冷性放線菌はゲノム解析の結果, Cryobacterium 属に分類された. アノテーションにより, 染色体上に2つ のラッカーゼ遺伝子(LacCR1, LacCR2)を見出した. 大腸菌 BL21 (DE3) 株を宿主として Overnight Express Autoinduction System を用いて, 硫酸銅存在下で 18℃, 48時間の培養で、チオレドキシン(Trx)との融合タ ンパク質 (Trx-LacCR1, Trx-LacCR2) として発現させ た. 菌体を溶解後, 可溶性画分からアフィニティーカラ ムにより精製し、エンテロキナーゼ切断により Trx と His タグを除去し, LacCR1, LacCR2を精製した. ラッ カーゼ活性の基質は2.2'-アジノビスエチルベンゾチア ゾリン-6-スルホン酸を用いた.LacCR1,LacCR2によ る卵白タンパク質の架橋解析は、架橋メディエータとし てフェルラ酸(FA)およびコーヒー酸(CA)を用い. タンパク質架橋高分子化はSDS-PAGEで解析した.チ ロシン二量体は抗ジチロシン抗体を用いたウエスタンブ ロッティングにより検出した. LacCR2とFA (5mM)も しくはCA(2mM)で架橋した卵白(10%)を用いた加 熱卵白ゲルの物性はクリープメーターを用いて測定した. 【結果・考察】LacCR1の至適 pH は 4, 至適温度は 30℃ であった. 至適温度より上下10℃の変化で至適温度に 対する相対活性が著しく減少した.一方で、LacCR2の 至適 pH は 4~5, 至適温度は 70℃であったが, 5℃~

60℃で至適温度の40%~90%と幅広い温度帯で活性を 保持していた. また, Vibrio sp.のLO1(至適温度 35℃), Kabatiella bupleuri G3 IBMiPのKbLcc1(至適 温度30℃)など,10℃で至適温度の約50%の活性を保 持するラッカーゼと同様,低温での活性を保持する一方 で,60℃で1時間処理後も40%と高い熱耐性も示した. LacCR1はFA存在下,LacCR2はCA存在下でオボトラ ンスフェリン(OVT)を架橋高分子化した(図1).FA 存在下で形成され架橋高分子中にジチロシンの形成が認 められた.

次に、LacCR2とFAもしくはCAにより架橋した卵白の 加熱ゲルの物性を解析した結果、CAとLacCR2により 架橋高分子化した卵白の加熱ゲルでは、未処理のゲルと 比較してその物性に大きな変化は認められなかった.一 方でFAとLacCR2により架橋高分子化した卵白の加熱 ゲルでは有意に破断応力と弾性率が増加し(図2)ゲル の強度が上昇した.このように、好冷性放線菌のラッカー ゼはタンパク質架橋酵素として機能し、LacCR2はタン パクゲルの物性を変化させ得ることが示された.



図1 ラッカーゼによる卵白タンパク質の架橋高分子化
(A) LacCR1 による架橋, (B) LacCR2 による架橋
OVA: オボアルブミン, OVT: オボトランスフェリン, FA: フェルラ酸, CA: コーヒー酸



(A) 破断応力,(B) 弾性率
1:未処理,2:LacCR2処理,3:LacCR2とフェルラ
酸で処理,4:LacCRとコーヒー酸で処理した卵白を
用いた加熱ゲル

高効率な嫌気的ベンゼン分解を実現する最適微生物群の構築

鈴木研志

【目的】ベンゼンは比較的水溶性が高く,地下帯水層に まで到達し地下圏を広域に汚染する.そのため,物理化 学的処理は高コストかつ高環境負荷であり,微生物を用 いたバイオレメディエーションも嫌気条件下での処理が 求められる.我々はベンゼンを嫌気的にメタンおよび二 酸化炭素に変換する微生物群を見出してきた.¹³C標識 ベンゼンを用いた代謝物解析および分子生物学的解析に よって,ベンゼン分解菌やメタン生成アーキア等の関連 微生物を推定することに成功しているが,10年以上の 集積培養を重ねても複雑な微生物叢を維持しており,ベ ンゼン分解菌や関連微生物の単離には至っていない.本 研究では,マクロドロップレット(MD)に複数の微生 物細胞を包埋することでサブ群集を構築しつつ,ベンゼ ン分解に関与する微生物を単離し,効率的にベンゼンを 分解する微生物群を再構築することを目指した.

【方法】ベンゼン分解プロセスは複数の微生物が関与す るため、従来の技術では直接的な単離が難しい.しかも、 分解を促進するような補助的微生物は難培養性微生物や 数的希少種であることが多く、その獲得はハードルが高 い.本研究では、マイクロドロップレット(MD)に複 数の微生物を包埋することでサブ群集を構築し、ベンゼ ン分解およびメタン生成をGCによって分析した.また、 嫌気度の担保および MD の安定性増大のため、ゲル MD (GMD)を用いた.さらに、ベンゼン分解能を持つ MD を分取するため、ベンゼン分解菌が多量に生産すると考 えられる Flavin 類およびメタン生成アーキアが有する 補因子 F420 の自家蛍光を検出することで GMD の選択 的分取を試みた.加えて、SYBR Green I による細胞の 蛍光染色を行い、蛍光強度の高い MD の分取を行った.

【結果・考察】これまで集積培養を行ってきた嫌気的ベ ンゼン分解菌群を適宜希釈し細胞が1~10細胞包埋さ れるようにGMDを作成した.作成したGMDをSYBR Green Iで染色し顕微鏡観察した結果、5~10細胞が包 埋されていることが示された.次に,作成したゲルMD を一つのバイアルにまとめて嫌気的に培養し,ベンゼン およびメタン濃度をGCによって測定した結果,ベンゼン の減少およびメタンの生成が確認された(図1).この結果 から,GMDによるベンゼン分解菌およびメタン生成アーキ アを含む微生物群の集積が可能であることが示唆された.

目的の活性を持つ GMD を選択的に獲得するため,自 家蛍光による分取を試みた結果,それぞれの蛍光では明



図1 GMDにおけるベンゼン分解とメタン生成

確な分離をすることができなかった、嫌気性微生物は増 殖が遅く、GMD中で目的の活性を示したとしても活発 に増殖するとは限らず、培養条件や検出系の最適化が必 要である. そこで、1細胞でも十分な蛍光が得られる SYBR Green I による染色を行い, GMD の分取を試みた (図 2). その結果.染色により顕著に緑色蛍光が増大した GMD が確認されたため分取し、ベンゼン分解能を揮発性芳香 族化合物検出センサで解析した結果、増殖を示した培養 系はあるものの、ベンゼン分解活性は確認できなかった. MD 技術は強制的な集積が可能な一方で、微生物群の単 純化に伴いこれまで数的希少種であった微生物が優占化 し、ベンゼン分解能を喪失した可能性も考えられた. つ まり、GMDで菌叢の単純化に加え最適な培養条件の検 討も重要であると考えられた.これまでの研究で、複数 の培養系の内ベンゼン分解菌およびメタン生成アーキア が同程度の比率で存在するときに高いベンゼン分解能を 示すことがわかっている.従って、その比率を維持しつ つ補助的役割を担う微生物が含まれた GMD の選抜が重 要であると考えられた.また,GMD 間では分子の移動 が可能なため、複数のGMDによってベンゼン分解およ びメタン生成が起きている可能性が考えられた.つまり, 複数の GMD を分取し培養することで活性を維持したま ま微生物群の集積が可能であると考えられた.



細菌スフィンゴ糖脂質の高度利用を目指した研究基盤の構築

【目的】スフィンゴ糖脂質は真核生物に広く存在するセラ ミド骨格を有する一群の糖脂質であるが、一部の細菌も スフィンゴ糖脂質を合成する.細菌由来のスフィンゴ糖 脂質は糖がα結合でセラミドに結合するという特徴を持 ち、ヒトやマウスのナチュラルキラーT(NKT)細胞を 活性化することから、その利用に注目が集まっている.本 研究では、細菌スフィンゴ糖脂質の中でもNKT細胞の活 性化能が最も強いα-ガラクトシルセラミド(α-GalCer) の生産基盤を確立するために、細菌由来のα-GalCer 合 成酵素を真核微生物である出芽酵母と海洋微生物ラビリ ンチュラ類で発現させた.

【方法】細菌由来の α-GalCer 合成酵素遺伝子を出芽酵母 と海洋微生物ラビリンチュラ類用の発現ベクターに組 み込んで、出芽酵母とラビリンチュラ類で発現させ、そ れぞれのα-GalCer 合成酵素発現株を作成した.次に、 α-GalCer 合成酵素発現株の細胞破砕液を用いて. 蛍光 セラミドに対する糖転移酵素活性を測定した.また. α-GalCer 合成酵素発現株の細胞からクロロホルム-メタ ノールの混合溶媒を用いて脂質を抽出し、 高速液体クロ マトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いて,脂質 組成を分析した. さらに, α-GalCer 合成酵素発現株から 抽出した脂質画分における NKT 細胞の活性化能を NKT 細胞ハイブリドーマを用いて測定した. 一方, ラビリンチュ ラ類の培養上清から濾過と超遠心機を用いて細胞外小胞 を抽出する方法を確立すると共に、その方法を用いて、 α-GalCer 合成酵素を発現するラビリンチュラ類から細胞外 小胞を調製して、LC-MS/MSにより脂質組成を分析した. 【結果・考察】細菌由来のα-GalCer 合成酵素を発現させ た出芽酵母とラビリンチュラ類の細胞破砕液中に、宿主 には存在しない α-GalCer 合成酵素の活性を検出するこ とが出来た. そこで, α-GalCer 合成酵素の発現株から 抽出した脂質画分をそれぞれLC-MS/MSにより分析し た. その結果、α-GalCer 合成酵素を発現する出芽酵母 では、スフィンゴシンとしてフィトスフィンゴシンを含 み,脂肪酸としてはC26の飽和脂肪酸であるセロチン 酸を有するヘキソシルセラミドが合成されていることが 分かった.一方,α-GalCer 合成酵素を発現するラビリ ンチュラ類に関しては、スフィンゴシンの部分には構造 の多様性があったが、脂肪酸の部分はC16の飽和脂肪 酸であるパルミチン酸を有するヘキソシルセラミドが合 成されていることが明らかになった.興味深いことに,

沖野 望

出芽酵母で生産したヘキソシルセラミドのセラミド部分 の構造は、抗腫瘍活性を指標にしてα-GalCerの構造を 最適化して合成されたKRN7000と同じであり、このこ とは出芽酵母が、KRN7000の生産に適した微生物であ ることを示している.さらに、α-GalCer合成酵素を発 現させた出芽酵母(図1)もしくは、ラビリンチュラ類 から抽出した脂質画分を用いて、NKT細胞の活性化能 を検証したところ、いずれの脂質画分においても、 NKT細胞の活性化能があることが分かった.これらの 結果は、真核微生物において初めて細菌型スフィンゴ糖 脂質の生産に成功したことを示唆している.



図1 山牙時母で生産した和困型スティンコ福油員は NKT細胞を活性化する

次に、細菌型スフィンゴ糖脂質を含有する細胞外小胞 を開発するために、ラビリンチュラ類の培養上清から超 遠心により、細胞外小胞を調製する方法を確立した.本 方法を用いて調製した細胞外小胞では、ラビリンチュラ 類の細胞に多量に含まれているトリアシルグリセロール の割合が顕著に減少していたことから、細胞や油滴の混 入は殆どないと判断した.そこで,α-GalCer合成酵素 を発現させたラビリンチュラ類の培養上清から細胞外小 胞を調製し、LC-MS/MSを用いて脂質組成を分析した ところ、 ラビリンチュラ類の野生株の細胞外小胞には存 在しないヘキソシルセラミドを含有することが分かっ た. これらのことは、細菌型スフィンゴ糖脂質を含有す る細胞外小胞が真核生物で初めて調製できたことを示し ている.近年,真核生物が生産する細胞外小胞に様々な 生物活性があることが明らかになっており、α-GalCer 合成酵素を発現するラビリンチュラ類が生産する細胞外 小胞の生物機能にも興味が持たれる.

複合微生物系プロセスの基盤制御技術の開発および理論構築

田代幸寛

【目的】著者は、これまでに単一微生物を用いた純粋発酵 系で有価物(化成品,バイオ燃料等)生産プロセス開発の 研究に従事し、連続発酵法における種々の因子に関する発 酵理論の確立と高性能発酵プロセスの構築を行ってきた. 近年、複合微生物系の多様な基質消費能力を活用した複 合微生物プロセスを対象として,有価物発酵生産法(乳 酸、酪酸等)の開発に取り組んでいる。一方、複合微生 物プロセスには、生成物の単一化、高度な微生物解析技 術の必要性、発酵の高効率化・制御に関する知見・技術 の不足など課題も多くある。次世代シーケンサー (NGS) によるアンプリコン解析法により微生物叢を高解像度で把 握できつつある一方、微生物代謝を種レベルで解析する 技術の開発は急務である. そこで本研究では、1) 複合微 生物プロセスにおける連続発酵プロセスの開発および希釈 率(D)のおよぼす影響解明と2)複合微生物プロセスにお ける微生物種レベルにおける代謝解析を目的とした.

【方法】1)種菌には堆肥を、炭素源にはグルコースを用 いて、1L 容ジャーファーメンターに培地0.4L 張り込み、 温度50℃で回分発酵を24h行ったのち、連続発酵を実 施した.連続発酵では、3つのD 変遷様式(一定法、アッ プ法、ダウン法)を行い、それぞれD=0.05、0.15、0.4h⁻¹ で検討した.発酵試料を適宜サンプリングし、基質(バ イオセンサー)・生産物(HPLC)濃度、および細菌叢 (16S rRNA アンプリコン解析)を分析した.

2) 著者の先行研究では、純粋発酵系によるアセトン・ ブタノール生産のための回分発酵プロセスで、基質、生 産物、代謝産物および菌体をターゲットとするモデルの 作成による代謝解析に関する成果を報告した(Shinto, Tashiro et al., J Biotechnol, 131(1), 45-56, 2007).本研 究では、1)の複合微生物プロセスによる連続発酵を優 占菌種ごとにモデルを作成できれば、微生物種レベル の代謝流束測定法を開発できると考えた、生体反応シ ミュレーター(WinBEST-KIT)を用いて、ダウン法 における D=0.05h⁻¹(主生産物: 酪酸, 優占菌種: Caldibacillus thermoamylovorans, Clostridium cochlearium) および D=0.4h⁻¹(主生産物:乳酸, 優占菌種:C. thermoamylovorans, Weizmannia coagulans)を対象に 速度式の立式,パラメータ推定,実験値との比較,各優 占種の生産速度の算出を行った.

【結果・考察】1) 複合微生物プロセスにおける連続発酵 プロセスの開発および希釈率(D)のおよぼす影響解明 ー定法では、優占細菌種は D 値によって変化し、D 値 の増加に伴い、種数が減少した(表1). 全 D 値で乳酸 が主生産物となり、D 値の増加に伴い、高い乳酸選択性 が得られた(表2). アップ法でも、優占細菌種は D 値 によって変化したが、D 値が増加しても種数は減少しな かった. 主生産物は、D= $0.05h^{-1}$ で乳酸、D= $0.4h^{-1}$ で は乳酸とギ酸であった. ダウン法では、D 値に関わらず、 種数は低い値で維持された. D= $0.05h^{-1}$ で酪酸が主に生 産された. 本研究により複合微生物プロセスにおける連 続化プロセスの開発および希釈率の影響を明らかにした (Koga, Tashiro *et al.*, J Biosci Bioeng, 136 (5), 391-399, 2023 (香読有)).

表1 異なるD変遷様式における各Dにおける種数

$D(h^{-1})$	一定法	アップ法	ダウン法
0.05	19.7	19.7	11.1
0.15	11.8	18.0	10.8
0.4	8.6	20.5	8.6

表 2	異なる	D 変遷様式に	おける生産物	と細菌種
-----	-----	---------	--------	------

変遷様式	$D(h^{-1})$	生産物	細菌種 ^a
	0.05	乳酸,酪酸	(1), (2)
一定法	0.15	乳酸,ギ酸	(1), (3)
	0.40	乳酸	(1), (4)
	0.05	乳酸,酪酸	(1), (2)
アップ法	0.15	酢酸,ギ酸	(1), (5)
	0.40	乳酸,ギ酸	(1), (5)
	0.05	酪酸	(1), (3)
ダウン法	0.15	乳酸,酢酸	(1)
	0.40	乳酸	(1), (4)

^a(1) Caldibacillus thermoamylovorans, (2) Anaerosalibacter bizertensis, (3) Clostridium cochlearium, (4) Weizmannia coagulans, (5) Xylanivirga thermophila

2) 複合微生物プロセスにおける微生物種レベルにおけ る代謝解析

グルコース阻害式の導入により,実験値とシミュレー ション値との相関係数が向上したことから,グルコース 阻害が示唆された.最終的に,相関係数0.9827と高い 精度のモデル化に成功し,微生物種毎の生産速度を算出 できた.本法は複合微生物プロセスにおける新しい代謝 解析法として期待される. 発酵経路に依存しない適応進化機構の解明とC5糖からの有用二次代謝物生産への応用

【目的】本研究では、微生物が利用しにくいC5糖を原料とした有用物質の発酵生産系の開発を目指した.酵母はその発酵能の高さからエタノールなどの有用物質生産の宿主として用いられている.一方でその発酵能の高さが仇となり、グルコース以外の糖類、とくにキシロースなどのC5糖を利用できる能力が低いこと、また、発酵経路以外用いた有用物質生産が限られていること、などが改善すべき点として残っている.これまで様々なアプローチが行われているものの、その多くは出芽酵母を用いたものである.そこで本研究では、分裂酵母Schizosaccharomyces pombeを宿主としてC5糖からの有用物質生産について検討を行った.

【方法】分裂酵母 S. pombe FY12804 株を宿主として選択 し、C5 糖としてキシロース資化遺伝子、Xylose Reductase (XR)、Xylose Dehydrogenase (XDH) および Xylulose Kinase (XK)を導入した.XR、XDH、XKは高活性で あることが報告されている Scheffersomyces stipitis 由来の ものを用いた.これらの株に対し、キシロースを炭素源 とした馴化培養を行った.ODが1を越すごとに継代培 養を繰り返すことで、増殖速度が向上した4つの株群 (023, 102, 112, 021)を選抜した.これらの株を用い て有用二次代謝物であるトリ酢酸ラクトン(TAL)の生 産を行った.上述のキシロース資化能をもつ S. pombe にTAL生産遺伝子を導入し、キシロースからのTAL生 産能を HPLC で評価した.

【結果・考察】XR, XDH, XK 導入株を、キシロースを 単一炭素源とする最小培地(EMM 培地)で培養したと ころ,96h 培養してもOD は1.5 にも満たなかった.こ の結果から、出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae と比較 してキシロース代謝活性が弱いことが考えられた. そこ で上述のXR, XDH, XK 遺伝子を追加で導入したが, キシロース資化能は改善されなかった. そこで, キシロー スを炭素源とした馴化培養を行ったところ、増殖速度が 向上した4つの株群(023, 102, 112, 021)を選抜す ることに成功した. これらの株群は、グルコースとほぼ 同等の増殖および糖消費能を示しており、72hでOD=8 以上に達した (図1). これより,世界で初めてキシロー ス資化能を持つ S. pombe の創出に成功し、その能力を グルコースとほぼ同等に引き上げることができた。興味 深いことに、得られた株はキシロース消費速度および増 殖能が異なる2つの集団に分かれていることがグラフか 田中 勉

らも見て取れる. これは馴化の方向性が複数あることを示しており,今後オミクス解析等を用いてこの原因を突き止めることで,C5糖を用いた発酵生産技術に有用な知見が得られると期待される.



続いて、これらの株を用いて有用二次代謝物であるト リ酢酸ラクトン(TAL)の生産を行った.一般的にこれ らポリケタイドはアセチル CoA から作られるため、エ タノール発酵経路が強い酵母では高生産が望めない. 上 述のキシロース資化能をもつ S. bombe に TAL 生産遺伝 子を導入し、キシロースからのTAL生産能を評価した. その結果、20g/Lキシロースから3g/LのTAL生産に 成功した. 驚くべきことに、この生産量はグルコースを 炭素源とした場合の生産量(2g/L)よりも高かった. エタノール生産量はグルコースの方が多く、グルコース 炭素源は発酵経路に流れていることが示唆された。これ は、糖源で活性化される代謝経路が異なることを示すと ともに、上述の馴化培養は、発酵経路に依存しない適応 進化を経たことを示唆している。また、グルコースとキ シロースの混合糖を用いてTAL生産を行ったところ, TAL 生産量は3.5g/Lに向上した. さらに、グルコース およびキシロースの両方を同時に消費していることも明 らかとなった.これより,酵母でよく見られるカタボラ イト抑制を回避した進化を遂げていることが明らかと なった.本結果をもとに様々な解明を進めることで、酵 母の新しい代謝機構の解明につながる可能性がある.

大規模ゲノム再編成を用いる休眠型二次代謝産物生産法の開発

浅 井 禎 吾

【目的】ゲノム解読技術の飛躍的な進展は、未利用生合 成遺伝子資源というポストゲノム時代の新たな天然物の 探索資源を我々に提示した.これらは、新規天然物の宝 庫として期待され、これまでに、様々な休眠遺伝子の覚 醒法や強制発現法が試みられ、未利用生合成遺伝子資源 から新しい天然物が発見されてきた.これまでに、エピ ジェネティック制御を改変する休眠遺伝子覚醒法などを 用いて、未利用生合成遺伝子由来の新規天然物の発見を 展開してきた.しかし、未だゲノム解読で明らかにされ た未利用生合成遺伝子資源のごくわずかしか利用できて いない.本研究では、共同研究者の太田らが開発した、 好熱細菌由来の制限酵素であるTaqIを用いる大規模ゲ ノム再編成技術「TAQingシステム」を糸状菌に適応し、 これまでにない革新的な未利用生合成遺伝子由来新規天 然物の創製法を開発することを目的とした(図1).



【方法】本研究では、モデル糸状菌である Aspergillus niger IFM58835を用いて検討を行った。制限酵素は4塩 基認識で認識サイトがゲノム上に豊富に存在し、かつ、 切断活性を温度で制御可能な TaqI を選択した。TaqI 遺 伝子は Aspergillus 属菌の高発現プロモーターとして利用 される enoA および amyB プロモーターを選択した。そ れぞれの下流に taqI を導入した発現ベクターを作製し、 A. niger にプロトプラスト-PEG 法を利用して taqIw を導 入し、形質転換株を作製した。初期検討では、TaqI の 活性化のための加温条件の検討は、形質転換直後に 30℃から 45℃までの温度域において、30分、1時間お よび 2時間と検討し、得られる形質転換株の形態の違い を探索した。しかしながら、いずれの条件でも、期待し た形態が変化した株の作製には至らなかった. A. niger の一般的な培養温度である 30℃の条件下は, TaqIの切 断活性が弱いものの確認できるため, 得られた形質転換 株について, 30℃の条件で, 長期にわたって継代し, 様子を注意深く観測した.

【結果・考察】 形質転換を繰り返し行うことで, TaqI 発 現株を数十株獲得した. それらを30℃の条件下で、一ケ 月程度継代培養を実施し、その間、2度ほど植え継ぎ、 注意深く観測した. その結果, 偶然ではあるものの, 同 心円状に生育していく菌から、生育速度や菌糸の状態が 顕著に異なる株が出現しているのを発見した、こうした 現象は、複数の継代中のプレートで観測され、上記のよ うな形態が変化した部分を新しいプレートに移すことで 分離した. このように、taqI遺伝子導入株をTaqIの活 性の下限に近い温度で継代することで. 形態変化株を作 出できることを見出した(図2). 複数回検討した結果, 得られる形態の違いや頻度に差はあるものの、実験の再 現性が認められた. また, これらを培養し代謝物を解析 したところ、それぞれ異なる代謝プロファイルを示す株 の獲得に成功した.次に、親株について、ロングリード とショートリードの次世代シーケンス解析を組み合わせ ることで参照配列を作製し、得られた形態変化株のゲノ ム再編成の状況の解析を実施した. その結果, TaqI サ イト近傍での大規模遺伝子欠損や.繋ぎかえが観測され. TAQing システムによる形態変化である可能性を示唆す る株も発見された(図2). 本結果は, TAQing システム が糸状菌に適応できることを示す初めての例であり、か つ、糸状菌の二次代謝ポテンシャルを引き出す有用な手 段になり得ることが期待されるものである. まだ. 形態 変化の発生の制御や形態維持、また、汎用性の面で課題 が残されている、今後、これら課題を克服した、新たな 天然物創製法へと発展させたい.



図2 本研究で獲得したA. niger 形態変化株の例

2022年度若手研究者助成の研究報告

助成期間:2022年4月~2024年3月

植物地上部に棲息する非病原性真菌類の分類及びC1酵母の分布と特性評価

白石晃將

【目的】メタンやメタノールなどのC1化合物を単一の 炭素・エネルギー源として利用できる C1 微生物は、自 然界に広く生息し地球規模の炭素循環に寄与している. 近年.植物葉面から細胞壁成分であるペクチンのメチル エステル基に由来するメタノールの放出が報告され. C1細菌を中心に単離や同定から遺伝子の機能解析、食 料増収に向けた技術開発に至るまで幅広い研究が展開さ れている.しかしながら.病原菌を除いて真核微生物を 対象にした研究は少ない. そこで本研究では, 葉圏から メタノール資化性酵母(C1酵母)を単離・同定し、生 育特性と生物間相互作用を調べることを目的とした. 【方法】葉,花,果実,野菜などを採取し,集積培養を行っ た後、固体培地上にコロニーを形成させることで酵母を 単離した. 固体培地には、メタノールを含む寒天培地 (SM 寒天培地)に加え、メタノール以外完全無機のシ リカゲル培地(SMシリカ培地)の二種類を用いた. 酵 母の同定には 26S rDNAの D1/D2 と ITS 領域の配列を 用いた、生育特性評価には、葉圏での炭素源候補として 考えられるペクチンやメタノールなどを炭素源として含 む液体培地を用いた.また、別府フラスコでの共培養系 により酵母-酵母間相互作用を調べた.別府フラスコは, 左右を膜で隔てた構造をしており培地は膜を通って移動 するが菌体は移動できない. 酵母-植物間相互作用の解 析には、酵母接種の有無による植物の生育度を評価した. 【結果・考察】SM 寒天培地にて単離した 180 株を 14 属

21種に分類した. これらの中には, C1酵母 Candida boidinii 62株の他 Papiliotrema laurentii など植物に対す る共生効果が報告されている種も含まれていた. 酵母の 炭素源資化能については,全てがペクチンを資化した一 方,メタノールを資化したのは C. boidinii のみであった. この従来法では,単離された C1酵母が 62株・1種のみ(全 体の約3割)であったことから C1酵母の単離効率の低 さが課題となった. そこで SM シリカ培地を用いたとこ ろ,新たに単離した 41株の約8割がメタノールを資化し, C. boidinii を含め複数種の C1酵母が同定できた. これ らにより, C1酵母の単離効率を向上できた. また, C. boidinii が高確率で単離・同定されたことから,同酵母 が自然界に普遍的に棲息していることが示唆された.

*C. boidinii*を対象に C1 酵母がペクチンで生育する際, ペクチンメチルエステラーゼ (PME) により自らメタ ノールを生成して利用しているか調べた. ペクチン培地

で培養した培養上清および菌体を用いてそれぞれ PME と メタノール代謝に特有のアルコールオキシダーゼ (AOD) 活性を測定したところ、両活性が検出された、これらよ り、葉圏で C. boidinii はペクチンからメタノールを生成。 利用していることが示唆された。続いて、C. boidiniiの ペクチン利用の特性およびメタノール資化能に着目し、 C. boidinii と P. laurentii との相互作用を別府フラスコを 用いて調べた、すると、ペクチン培地でそれぞれを単一 培養した際と比較し、共培養した際にはP. laurentiiの 生育が80%向上した(図1). C. boidinii による生育促 進効果は Rhodotorula toruloides や Rhodosporidiobolus ruineniae などの他種酵母との共培養においても見られ た. PME に着目しその活性を測定したところ, C. boidinii からのみ PME 活性が検出されたことから, C. boidinii が持つ高い PME 活性が P. laurentii の生育を促進してい る可能性が示唆された.これらの結果より, 葉圏におい てペクチン利用を介した酵母-酵母間の相互作用がある ことが推察された.



図1 C. boidinii による P. laurentii への生育促進効果

さらに、酵母による植物への共生効果を解析する簡 便な実験系の構築に取り組んだ.共生効果の検証には これまでに植物への生育促進効果が報告されている*P. laurentii*を用いた.シロイヌナズナの種子をOD=0.01 の菌液に懸濁して培地に播種した後、人工気象器で2週 間生育させた.その後、シロイヌナズナのロゼット直径 と根の長さを測定し、菌液の代わりに水を使った未処理 条件と大きさを比較した.その結果、ロゼット直径およ び根の長さは未処理条件と比較して*P. laurentii* 接種条件 でそれぞれ約20%、11%大きくなった.これらのことか ら、シロイヌナズナを用いたこの実験系で、酵母により 植物への生長促進効果を評価できることが確認できた.今 後は*C. boidinii*を含め、これまでに植物への共生効果が 報告されていない酵母種についても検証をしていきたい.

ヒトロ腔内に蔓延する細菌の細胞壁/膜合成に関与する巨大な染色体外エレメントの発見

【目的】染色体外エレメント (Extrachromosomal element: ECE) はヒトマイクロバイオームの主要な構成要素であ り、マイクロバイオームの遺伝的多様性を拡大する、し かし. 既存の参照配列依存的なメタゲノム解析手法では 新規性の高い ECE の検出は困難であり、ヒトの健康に 関与する重要な ECE を見逃している可能性がある. そこ で、本研究ではヒトの口腔マイクロバイオームを対象と してこれまで認識されていない ECE の同定を目指した. 【方法】ロングリードシークエンス技術はゲノムアセン ブリ解析の精度を飛躍的に改善することが知られている ため、ロングリードメタゲノム解析の実用化によって未 知のECEを完全長ゲノムとして再構築できる可能性が ある. そこで,本研究では Nanopore 社 PromethION シー クエンサーを用いたロングリードメタゲノム解析をヒト 唾液サンプルに適用した. 合計 56 検体の唾液サンプル からロングリードシークエンスを取得し、メタゲノムア センブリ解析によって得られたコンティグ配列を既知の 微生物エレメント(細菌染色体,バクテリオファージ, プラスミド)に分類した.既存の手法では分類できな かったコンティグ配列からデータベースに未登録の遺伝 子の割合が50%を超える新規性の高いコンティグ群を 抽出し、唾液中で高い存在量と蔓延率で存在する新規 ECEを探索した.

【結果・考察】既知の微生物エレメントに分類できなかっ たコンティグ配列から日本人唾液において蔓延率が40% を超えるこれまで未認識のECEを発見した. このECE は下のサイズが平均352kbと巨大で,環状ゲノムであり, ゲノム中にInsertion sequenceをコードしている. 我々 はこの新たなECEを「Inocle」と名付けた(Insertion sequence enriched; found from oral metagenome; circle genomic structure). Inocle の約16%の遺伝子が *Streptococcus*属の染色体と相同性を有することから Inocle は*Streptococcus*を宿主とするECEであることが わかった. さらに,既知の*Streptococcus*染色体,バクテ リオファージ,プラスミドとのゲノム配列の類似度解析か らInocle はプラスミド様エレメントであると予想された.

Inocle に保存されているマーカー遺伝子 (InoC; Inocle conserved gene)の系統樹から4つの系統が明らかに なった (図1A). これら、4つの系統は口腔内のニッチ が異なり (Inocle- α は舌、Inocle- β と Inocle- δ は頬粘膜、Inocle- γ は歯肉)、宿主候補細菌種が異なることもわかった (Inocle- α は *S.infantis*, Inocle- β は *S.sinensis*, *S.australis*,

木口悠也

S.pneumoniae, Inocle-δはS.pneumoniae). Inocleの世 界での蔓延率は平均43%と非常に高いが,系統毎の蔓 延率は国によって異なる(図1B).



図1 (A) Inocle のマーカー遺伝子 (InoC) の系統樹によって 明らかになった4つの系統. (B) 8カ国の口腔メタゲ ノムデータから算出された Inocle の系統毎の蔓延率.

遺伝子機能解析の結果, Inocleの持つ20%の遺伝子 は細胞壁/膜に関連することが明らかになった。特に、 ペプチドグリカンを構成するグリカン鎖の重合とグリカ ン鎖同士を架橋する2つの機能を有する遺伝子が全ての Inocle ゲノムから見つかり, Inocle が Streptococcus の細 胞壁合成に寄与していることが示唆された。他にも細胞 膜/壁タンパク質の翻訳後修飾に関与するシグナルペプ チダーゼと Sortase A が見つかった. さらに, これらの タンパク質のターゲットとなるモチーフ(シグナルペプ チドとLPXTGモチーフ)を保有する遺伝子も発見され た. これらの結果は Inocle が Streptococcus の ECE として 細胞壁の合成と修飾に関与していることを示唆している (図2).本研究で培養した細菌および世界中の口腔由来 ゲノムシークエンスデータから Inocle を探索したが発見 には至らず、Inocleを保有する宿主細菌の分離培養が困 難であることが示唆された. Inocle の生物学的意義のさ らなる理解のためにInocle保有細菌株の培養が待たれる.



 図2 Inocle と 宿 主 細 菌 (Streptococcus) と の 関 係 性. Inocle は ECE として細胞内に存在すると考えられ、 宿主の細胞壁合成と細胞壁タンパク質組成の変化に 寄与していると考えられる。

分離株とゲノム情報から紐解く Epsilonproteobacteria 綱細菌の分類体系

【目的】*Epsilonproteobacteria* 綱は,動物の共生体・病原 体や熱水噴出孔・冷水湧昇域などの多様な環境からの分 離株を含む,*Proteobacteria* 門に属する綱の一つとされ ていた.しかしながら,近年行われた全ゲノム比較解析 から,本綱が*Proteobacteria* 門とは独立した分類群 (*Campylobacterota* 門)として再分類され,分子系統や 生理機能を含む分類群として認識されている.一方で, 熱水噴出孔・冷水湧昇域とは全く異なる環境であるマン グローブ林においても,本門の16SrRNA配列が検出さ れているが,系統的位置や生理的特徴は分かっていない. 本研究では,マングローブ林由来新規 *Campylobacterota* 門細菌の分離・分類・ゲノム比較解析により,本門の分 類体系を整理することを目的とした.

【方法】2022年6月に、沖縄本島の7箇所のマングロー ブ林にて堆積物および海水試料のサンプリングを行っ た.マングローブ林は潮汐の影響を受けるため、うち1 箇所では干潮・満潮およびその中間のタイミングで試料 を採取した.これまでに知られている本門細菌の特性、 およびマングローブ林の環境特性から、電子源として硫 化水素・硫黄・水素を加え、N₂+CO₂(20%)ガス置換 したのち酸素濃度の勾配ができるよう調整した各軟寒天 培地に、採取した試料を添加した.形成されたコロニー を同組成の液体培地へ植え継ぎ、15℃および25℃にて 集積培養・単離操作を行った.単離の状況はDAPI 染色 した細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察することにより確認 した.また、培養した細胞から DNAを抽出し16S rDNA の配列を解読することで、種の推定を行った.

加えて、マングローブ林の環境試料由来の遺伝子配列 から網羅的に本門細菌のゲノムを再構築し、ゲノム情報 から適切な培養条件を選定するため、沖縄本島で採取し た堆積物・海水試料、および2023年12月に西表島のマ ングローブ林にて採取した堆積物のメタゲノム解析を 行った.海水試料および堆積物試料からDNAを抽出し、 DNBSEQシーケンサーを用いて150bp×2のペアエン ドショットガンシーケンスを行った.得られたリードは FastQCを用いたクオリティチェックにより、クオリティ の低い断片や末端配列のトリミングを行った.megahit によるアセンブル、MaxBin2・MetaBAT2・CONCOCT によるビニング、およびmetaWRAPのbin_refinement モジュールによるビンの精製を経て、微生物ゲノムを再 構築し、GTDB-Tkを用いて系統の予測を行った.

長谷川 万 純

【結果・考察】沖縄本島試料を用いた集積培養・単離操 作および単離株の16S rDNA 配列の解読の結果,残念な がら本門細菌の分離株を得ることはできなかった.一方. 沖縄本島および西表島の試料のショットガンシーケンス およびメタゲノム解析を行い、微生物ゲノムを再構築し た結果、完全長ではないものの、本門に属すると推定さ れる細菌ゲノムの取得に成功した.加えて、本門細菌に 由来する遺伝子配列は、海水中からは検出されず、 堆積 物中のみから検出されることを明らかにした.得られた 本門細菌の再構築ゲノムの系統的位置を明らかにするた め,本再構築ゲノムと,原核生物のゲノムデータベース (GTDB) に登録されている本門細菌のゲノムを用いて 系統解析を行い、ゲノム系統樹を作成した、ゲノム系統 樹は、細菌に共通な120個のシングルコピータンパク質 配列に基づき, iqtree を用いて作成した. その結果, 本 再構築ゲノムは Campylobacter 属と Sulfurospirillum 属の 間に位置し、近縁のゲノムはいずれも分離・培養がされ ておらず、新規性の高い、新属に値するグループを構成 することを突き止めた(図1).一方で同グループは、本再 構築ゲノムがマングローブ林の堆積物に由来するのに対し, イルカの口腔や陸上泥火山、原油、嫌気的な有機物排水 など多様な環境から得られたゲノムから構成されており. 嫌気~微好気環境に適応したグループであることが示唆さ れた. 取得した再構築ゲノム中には. 嫌気的な条件下での フマル酸呼吸をサポートする DcuA 遺伝子や、フマル酸の 生成に関わる fumB 遺伝子などが存在していることも、本 グループの嫌気~微好気環境への適応を示唆している.

今後,得られた再構築ゲノムおよび近縁ゲノムの情報 から培地条件を選定することにより,本門細菌の分離お よび生理学的特徴の解明を目指す.



図1 得られた本門再構築ゲノム周辺のゲノム系統樹

ボタンタケ目の新規昆虫病原性系統"ハスノミウジムシタケ"の分類学的検討

【目的】子嚢菌門ボタンタケ目の中でもオフィオコルディ ケプス科,コルディケプス科,バッカクキン科,ポリケ ファロミケス科からなる4科は,約45属に及ぶ多様な 昆虫寄生菌を含み,これらは冬虫夏草類と総称される. これらは古くから漢方薬として利用される種に加え,有 用な抗生物質を生産する種や,農林業害虫の防御に有効 視される種を数多く含むことから,資源の宝庫として注 目されてきた.冬虫夏草類の昆虫病原性や,有益な二次 代謝産物の合成に関係する遺伝子基盤を解明すれば,今 後の資源探索は大きく促進されうる.しかし,冬虫夏草 類と他のボタンタケ目系統の間のギャップを埋める中間 的な特徴をもつ系統が未発見のため,冬虫夏草類を特徴 づける遺伝子基盤とその進化の背景はほぼ未解明である.

申請者は、主に菌寄生菌と腐生菌から構成されるボタ ンタケ科に属す唯一の昆虫寄生菌であるハスノミウジム シタケ Hypocrea dipterobia (図1)に着目した.本種は ハエ目の幼虫に寄生し、冬虫夏草類に似た子座柄をもつ が、子座頭部はクッション型、子嚢は8胞子性で胞子は 中央の隔壁で分裂し、ボタンタケ属の特徴も有す.本種 と同定された国内産標本を対象に、rDNA 配列の予備的 な相同性検索を実施した結果、冬虫夏草類との相同性が 最も高かったが、その値は90%以下であった.以上より、 本種は新科相当の系統で、冬虫夏草類と他のボタンタケ 目とのミッシングリンクである可能性があると推測し、 本仮説を大規模系統解析で検証することを目的とした.

【方法】日本冬虫夏草の会の会員の協力のもと、京都府、 茨城県、栃木県、宮城県から採集された、ハスノミウジ ムシタケ9標本を用いた.これらについて子嚢殻、子嚢、 子嚢胞子の計測を行い、原記載の計測値と比較した.分 離培養は、ポテトデキストロース寒天(PDA)、麦芽抽 出物寒天(MEA)、トレハロース・ペプトン・酵母エキ ス寒天の各培地を用い、子嚢胞子を培地上に射出させる、 または表面殺菌した宿主内の菌糸を接種する方法で行っ た.さらに、得られた単離株からゲノムDNAを抽出し、 Illumina NovaSeq6000による全ゲノム解析を行った. 【結果・考察】ハスノミウジムシタケはブラジル原産で、

日本産標本が同種か検証の余地があった.本研究に供試 した国内産標本の観察の結果,原記載に比べ子嚢殻と子 嚢が大きく,部分胞子の幅が小さい傾向があった.また, 基準標本の宿主はミズアブ科の幼虫と推定されているが, 栃木県産標本(図1)の宿主部分から得られた COI 配列

山本航平

を解析した結果、ミズアブ科ではない可能性が高いことが判明した.したがって、日本産のハスノミウジムシタケは H. dipterobia に近縁な未記載種の可能性がある.

分離培養の結果,子嚢胞子の発芽はいずれの培地においても認められなかった.一方,宿主体内の菌糸を接種した区では,京都府,栃木県,茨城県産試料から菌糸伸長が観察され,生育は非常に遅いものの,培地上に白色のコロニーを形成した.特に,栃木県産試料のMEA上のコロニーでは,虫ピン状の分生子柄束が確認された.

京都府産由来(KHYM13)および栃木県産由来 (KHYM14)の各単離株から,それぞれ30Mbpおよび 38Mbpのドラフトゲノム配列が得られた.また、ミト コンドリアゲノムはそれぞれ9.5Mbpおよび5.8Mbpで あった.これらの結果とrDNAの配列比較の結果から、 京都府産と栃木県産標本は種レベルで異なると考えら れ、国内のハスノミウジムシタケには複数種が含まれる ことが強く示唆された.なお、茨城県産試料はrDNAの 配列比較の結果から、KHYM14と同種であることが示 唆された.

さらに、ドラフトゲノム配列から抽出した RPB1 遺伝 子の全長を用いて、冬虫夏草類と他のボタンタケ目菌類 と共に予備的な系統解析を行ったところ、KHYM13 お よび KHYM14 からなるハスノミウジムシタケのクレー ドは、冬虫夏草類やボタンタケ科とともに単系統を構成 し、この中で本種はボタンタケ科とともに単系統を構成 し、この中で本種はボタンタケ科とこれディケプス科か らなるクレードの姉妹系統に位置した.よって、ハスノ ミウジムシタケは冬虫夏草類とボタンタケ科に近縁な新 科相当の系統である可能性が示されたため、現在、大規 模系統解析による詳細な系統的位置の解明を進めている.



図1 栃木県産ハスノミウジムシタケの子実体 (A) と 子嚢 (B) (Bars: A 2mm; B 10µm)

細胞性粘菌が持つ膜受容体タンパク質の構造解析を突破口として Gタンパク質共役型受容体の起源に迫る

加藤英明

【目的】生命が生命として活動するためには、常に細胞 の内外で物質や情報のやり取りを行う必要がある.この うち情報のやり取りを主に担うのが膜受容体であり、ヒ トにおいて最大のファミリーを形成している膜受容体が Gタンパク質共役型受容体(GPCR)である.ヒトは 800種以上のGPCRを持ち、各GPCRが多様な細胞外刺 激を受容し、その情報を細胞内へと伝えている.GPCR はヒトの幅広い生理作用に関与しており、基礎研究的に も創薬研究的にも重要な研究対象である.

GPCR はあらゆる高等真核生物が有するタンパク質で あるが、原核生物はGPCRを持っておらず、生物進化 と GPCR 獲得の関係が注目を集めている。申請者は両 者の関係を紐解くには、現存する最も原始的な GPCR である cAR1 を研究することが重要であると考えた. cAR1 は粘菌であるタマホコリカビが有する GPCR であ り、細胞外 cAMP により活性化される、ヒトが持つ GPCRの90%以上がこのcAR1から進化したと言われる 一方、ヒトGPCRの活性化に必要なアミノ酸モチーフ は cAR において全く保存されておらず, cAR1 がどのよ うにして cAMP により活性化されるのか, またヒト GPCRはcAR1からどのように変異を獲得して現在の形 に至ったのか、といった点は完全に未知である.申請者 はこの cAR1 の構造機能相関を解明することで「GPCR はどのようにして生まれたのか? |「GPCR が GPCRと して働くために必要な要素は何なのか?」という本質的 問題の解明を目指した.

【方法】Dictyostelium discoideum 由来, apo 型の不活性 化状態 cAR1, cAMPとGタンパク質が結合した活性化 状態 cAR1 の立体構造をそれぞれ決定することを目指し た(遺伝子はTwist 社より遺伝子合成により入手). 手 法としてはクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析(SPA) に着目したが,特に不活性化状態 cAR1 については,分 子サイズが小さすぎて SPAでの構造解析が困難である ことが予想されたため,まずヒト由来 GPCR 単体の迅 速な構造決定を可能にするための手法開発を行なった. 具体的には,GPCRのICL3 に別の融合タンパク質を挿 入し,かつ GPCRと融合タンパク質の間のリンカー配 列を in silico screening により高速で最適化することで, 迅速に cAR1 を含む GPCRの構造を cryo-EM を用いて 決定できるのではないかと考えた.そこで,高精度構造 予測ソフトウェア AlphaFold2 をベースに, 独自に考案 した評価スコアを取り入れることでリンカー配列の自動 最適化プログラムを実装した. さらに, これを用いて Proof-of-concept 実験として3種のヒト GPCR (バソプレ シン v2 受容体, ブラジキニン b2 受容体, OPN5)の構 造解析を試み, 続けて cAR1 の不活性化状態構造解析を 目指した.

【結果・考察】上記のプログラムを用いてコンストラクト を設計し、これを利用することで、3種のヒトGPCR単 体の新規構造を高分解能で決定することができた(図1). そこで、本手法をNOAH(NOvel AI-assisted Highthroughput construct screening for structural analysis) と名付けた.NOAHについては現在特許申請を行った 上で、論文を準備中である(Kojima *et al.*, manuscript in preparation).また、このNOAHを用い、現在までに(上 記の3GPCRに加えて)共同研究の枠組みでさらに3種 のヒトGPCR(GRP受容体、赤色オプシン、緑色オプシ ン)の構造決定に成功している(unpublished).さらに、 このNOAHを利用して cAR1 のコンストラクトを設計 し、現在までに図に示した二次元平均クラス像を得るに 至っている(図2).



図1 NOAHによって決定できたヒト GPCR 構造の例



図2 cAR1の二次元平均クラス像

所属 東京大学先端科学技術研究センター E-mail: c-hekato@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

食の質的変化に依存した腸内環境変化が生体に及ぼす影響

【目的】近年の腸内細菌研究の発展に伴い,様々な病態 と密接に関与することが科学的根拠に基づいて明らかに されている.腸内細菌は,遺伝的要因だけでなく,食事, 薬物,運動やストレスなどの環境要因を通じて種類や構 成が大きく変化することが明らかにされており,特に, 食事は腸内細菌の構成変化を惹起する調節因子の一つと して良く知られている.しかしながら,様々な栄養環境 や食事の質的な違いによる腸内細菌への影響,さらには 宿主側の生体調節機能へ及ぼす影響については明らかに されていない.そこで,本研究では,食事中の脂質分を 様々な食用油に置換することで,腸内細菌の構成変化に 及ぼす影響と高脂肪食誘導性肥満モデルマウスへ及ぼす 影響について明らかにすることを目的とした.

【方法】動物飼料中の脂質画分を様々な食用油(大豆油 (Soybean)を亜麻仁油(Linseed),魚油(Fish),および オリーブ油(Olive)) に置換した飼料を作製した. C57BL/6Jマウスは日本SLC(Shizuoka,Japan)から購 入した.全ての動物実験は、東京農工大学の動物実験に 関する規定に基づき実施した(Permit No. R4-147). C57BL/6Jマウス,オス,7週齢は1週間の馴化後、改 変飼料を8週間,自由摂食で負荷した.負荷7週目に16 時間の絶食後,耐糖能試験を実施した.負荷期間終了後, 解剖を行い,生体エネルギー代謝調節関連パラメータや 腸内細菌解析を実施した.

【結果・考察】様々な食用油を置換した飼料を8週間摂 取した際の腸内細菌を16SrRNAシークエンスによって 評価した.その結果、各種食用油を置換した飼料の摂取 群によって、それぞれ異なる腸内細菌の構成を示すこと が示唆された (Figure 1).



Figure 1 The composition of gut microbiota. Gut microbial composition was evaluated for the determination of the relative abundance of microbial phyla (a) and principal coordinate analysis at the phylum level (b).

宮 本 潤 基

さらに、高脂肪食誘導性肥満モデルマウスにおける肥 満症状へ及ぼす影響を評価した.通常食(normal chow, NC)負荷マウスと比較して、高脂肪食(high fat diet, HFD, Soybean)負荷マウスは顕著に体重増加や組織重 量の増加が認められた.Linseed群やOlive群に置換し た飼料を与えた群では、高脂肪食負荷マウスと同等のエ ネルギー代謝異常が確認された.一方、Fish群におい ては、肥満症状を改善した(Figure 2).



Figure 2 The metabolic beneficial effects in Fish-fed mice. (a) Changes in body and tissue weights. epi, epididymal; peri, perirenal; sub, subcutaneous; WAT, white adipose tissue. **P<0.01; *P<0.05, vs, NC. ##P<0.01; #P<0.05, vs, HFD. (b) ipGTT was evaluated at 15 weeks of age. **P<0.01; *P<0.05, vs, NC. ##P<0.01, vs, HFD.

本研究成果は,食事,腸内細菌,および宿主エネルギー 代謝を結びつける重要な役割を担っている可能性が示唆 された.本研究は,肥満者の血糖値を低下させる魚油中 の多価不飽和脂肪酸(主に,DHAおよびEPA)の機能 の基礎となる新しい治療法の確立を目指した知見を提供 することが期待される.

所属 東京農工大学大学院農学研究院 E-mail: m-junki@go.tuat.ac.jp

ガスや液体寒天がラボスケールの液内培養中の微生物に及ぼす影響の網羅的解析

【目的】微生物の様々なスクリーニングを行う際,フラ スコなど小規模なスケールで培養条件を複数設定するこ とは重要である.本来,培養因子の組み合わせは無数に あるため培養条件の自由度は非常に高い.しかし,限定 的な培養因子(培地組成,温度,時間など)の検討に依 存しやすく,従来の培養法から脱却する術がない限り, 新規な有用微生物を獲得できても,培養環境がボトル ネックとなりアクセスできる生物資源が頭打ちになりう る.生物資源として微生物の真価を引き出すガイドライ ン作成を最終目標に,本研究では,利便性を維持しなが ら,ラボスケールの液内培養に新たな培養因子(二酸化 炭素や液体寒天[低pHではない寒天ブレートの作成中 に意図せず見出したゲル化しない寒天])を付与し,そ の培養環境が微生物に及ぼす影響を解明し,新規培養法 として特徴づけを試みた.

【方法】 好気的に二酸化炭素を強制通気した Streptomyces 属の培養において、これまでとは異なる代謝(抗菌活性) を見出した、一方で、既往のフラスコスケール下のガス制 御培養では、再現性を確保するのが困難であった、そこ で、簡便なガス制御機構を開発した(図1).具体的には、 著者が独自に開発した換気エンハンサー(Nonelectric bellows pump: NeBP) を最適化し、振盪基盤付きガス インキュベータを組み合わせた. 振盪基盤のデッドス ペースに設置できる NeBP は、追加電力が不要であり、 振盪で生じる運動エネルギーを換気能に変換できるアク チュエータである. 振盪条件に応じて NeBP 内部で往復 運動する硬球と安定して収縮運動できるベローズの組み 合わせを選定し、NeBPを最適化した. また、加熱撹拌 処理したゲル化しない寒天(終濃度1~1.5%)を再現 よく作成できる方法を見出し、均一化・脱泡して環境試 料の集積培養に用いた.

高橋将人

【結果・考察】これまでの著者の研究から,液内振盪培 養中の培養器内は,初発のガス環境を維持するのが困難 な場合が多いことが明らかとなっている.原因として, 培養器(通気性を有した培養栓付き)の特徴(酸素供給 能に対して著しく低い二酸化炭素換気能)が挙げられる. はじめに,二酸化炭素の自然換気に要する時間(半減期) を換気能の指標として,フラスコで用いられる通気性を 有した従来の培養栓(約30~70分)に替わる素材を評 価したが,換気能の改善は困難であった(ウェルプレー ト用ガス透過シールやポリジメチルシロキサン製シート は,それぞれ50分と100分を超過)

そこで,最適化した NeBP (半減期は約10分)と振盪 基盤付きガスインキュベータを併用することで,培養器 内外のガスが迅速に置換され,微生物培養中に生じるフ ラスコ気相部の非意図的なガスの濃度変動を抑制でき, 設定値に制御できた (NeBP 無しの従来のフラスコ内は 設定値を超過).本結果から,培養器の換気能に着目し たガス制御システムによって,これまで困難であった振 盪培養法の特徴を維持した気相制御が可能となった.

海洋試料(カイメン)の液内培養を、テトラゾリウム 色素が添加された30種類(例、マンニトール、リンゴ 酸など)の有機物で行った結果、液体寒天の有無で異な る基質資化活性(ホルマザンへ不可逆に変換されるのを OD[λ =590nm]でモニタリング)を示した(図2). 本結果から、特定の微生物種を集積できる培養基材とし ての利用が示唆された.本来ゲル化する濃度の寒天を微 生物の培養基材として積極的に利用したのは、著者が知 る限り本研究が初めてであり、レオロジー解析やガス供 給能の評価を介してメカニズムを解明することで、液内 培養や固体培養とは異なる培養法を提案できる.



図1 開発した NeBP の概略



図2 顕著に違いが確認できた基質資化活性の経時変化 (25℃,ダイゴ人工海水SP培地,新鮮空気下での 培養.実線,寒天有り;点線,寒天なし,左,L-ト レオニン;右,ピルビン酸メチル)

所属 筑波大学生命環境系 E-mail: takahashi.masato.fn@u.tsukuba.ac.jp

ビフィズス菌における全てのオリゴ糖取込みを制御するグローバル ATPase: 生理的意義の理解に向けて

阪中幹祥

【目的】ヒトの健康に有用な腸内細菌であるビフィズス 菌 (Bifidobacterium 属細菌) は、腸内で増殖するために、 幅広い種類の糖質を栄養源として利用していると考えら れている。事実、ビフィズス菌のゲノム上の至る箇所に、 二糖以上の糖質(オリゴ糖)を取込み可能な複数の ATP 結合カセット (ABC) 輸送体の構成因子, すなわち, 様々な基質結合タンパク質や膜貫通ドメインがコードさ れている. 最近, 我々は, これらのABC 輸送体遺伝子 クラスターとは全く別の領域に孤立してコードされてい る ATP 加水分解酵素(以後, ATPasebif)が種々の ABC 輸送体のオリゴ糖取込み(エネルギー供給)に関与して いる可能性を見出した(図1). すなわち, ただ一種の ATPasebif 遺伝子を Bifidobacterium longum subsp. longum にて破壊するだけで,解析に供した全てのオリゴ糖の取 込み能が大幅に低下した.本研究では、ヒトとビフィズ ス菌の共生の理解に向け、本菌が有するATPasebirの機 能・生理学的意義をより深く解明することを目指した.



図1 1種のATP加水分解酵素がビフィズス菌のほぼ全てのABC輸送体に作用している可能性がある

【方法】他の腸内細菌が存在する環境下でATPase_{bif}がビフィズス菌の増殖に如何に影響を及ぼすのかを理解するために, *B. longum* subsp. *longum* JCM 31944のATPase_{bif} 遺伝子欠損株または親株のいずれかとヒト糞便由来の腸内細菌叢(糞便を生理食塩水で懸濁)をオリゴ糖を含む 培地で嫌気的に共培養した.オリゴ糖として母乳に含ま れるオリゴ糖を使用した.嫌気培養は嫌気チャンバー (N₂ 85%; CO₂ 10%; H₂ 5%)にて37℃で行い,その後 のビフィズス菌数の測定は定量 PCR により行った.また,ATPase_{bif}遺伝子欠損株と親株においてビフィズス 菌の主要な糖代謝産物である短鎖脂肪酸の産生能を比較 するために,両株をオリゴ糖としてラクトースを含む培 地で単独培養した後の上清を高速液体クロトマトグラ

フィーに供した. ATPasebirホモログの保存性は, ビフィ ズス菌の様々な種のゲノム配列を対象として tblastn 解析 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)により調査した. 【結果・考察】 糞便由来の腸内細菌叢との共培養の結果. B. longum subsp. longum の ATPase_{bif} 遺伝子欠損株は, 親株と比較して、存在量が約5倍低下することが分かっ た、このことから、ビフィズス菌の増殖・他の腸内細菌 との競合における ATPase_{bif}の重要性を示すことができ た. また. ATPase_{bit}遺伝子欠損株と親株を単独培養に 供したところ、欠損株は、親株と比較して16時間程度 の生育の遅延が観察されたが、培養24時間目以降は生 育度(600nmでの濁度)が親株と同程度にまで上昇した. 興味深いことに、ビフィズス菌の主要な糖代謝産物であ る短鎖脂肪酸のプロファイルは両株間で異なっていた. 具体的には、欠損株は、親株と比べて乳酸の産生量が1.6 倍減少. 酢酸の産生量が1.3 倍減少. およびギ酸の産生 量が3.7倍上昇していることが明らかとなった。短鎖脂 肪酸はヒトの健康に密接に関与していることから, ABC 輸送体によるオリゴ糖取込みを通じた短鎖脂肪酸の産生 調節は、ビフィズス菌が発揮する有用効果に何かしらの 影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、ビフィズス菌は、ヒトのみならず、昆虫から哺 乳類まで幅広い種類の動物の腸内に棲息しており、これ までに百以上の(亜)種が報告されている.これらの(亜) 種における ATPase_{bif}ホモログの保存性を tblastn 解析に より調べたところ、興味深いことに、当該ホモログは解 析に供した全てのビフィズス菌(亜)種に高く保存され ていることが分かった(表1;代表的な菌種について結 果を示す).以上の成果より、ビフィズス菌にて共通し て保存されている ATPase_{bif}遺伝子は、本菌の腸内定着 と有用効果発揮を支えている可能性が考えられた.

表1 ATPasebif ホモログの保存性

Bifidobacterium 属	アミノ酸配列一致度
B. adolescentis ATCC 15703	97%
B. bifidum JCM 1255	95%
B. breve JCM 1192	98%
B. catenulatum JCM 1194	96%
B. dentium JCM 1195	95%
B. pseudocatenulatum JCM 1200	96%

放線菌が真菌の侵略を防ぐメカニズムの解明

【目的】土壌等の自然環境において、微生物は多様な種 からなる複雑な生態系を築いている. 土壌において普遍 的に見出される放線菌は抗生物質をはじめとする生理活 性物質を合成する顕著な能力を有しており、これが生態 系での微生物間競争に与える影響が注目されてきた. 一 方で,先行研究において,代表者は放線菌 Streptomyces lividans が生産するウイルス様粒子 (SLP) の欠損株のコ ロニーが真菌である酵母 (Saccharomyces cerevisiae およ び Shizosaccharomyces pombe) により深く侵略される傾 向にあることを見出した. さらに. 上記欠損株は野生株 よりも高い高浸透圧感受性を示したことから、酵母によ り形成される高浸透圧な細胞間領域での放線菌の生存に SLP が寄与し、異種微生物間競争に影響を与えている可 能性が示唆された.本研究課題ではこの現象のメカニズ ムの解明を出発点として. 放線菌群に広く保存された SLP 様粒子の生態学的役割にも迫った.

【方法】 S. lividans TK23 および Streptomyces davawensis JCM 4913 (理研 BRCより分譲)を用いた. プロテオーム 解析、局在解析、および胞子形成解析においては、それ ぞれ Bennett's-glucose 液体培地, Bennett's-glucose 固 体培地, Mannitol-soya flour 固体培地を用いた. 野生型 遺伝子座において SlpS (SLP 構造タンパク質) および 30S protein S6を SlpS-msfGFP/mScarletI および protein S6-mScarletIに置換し、それぞれ SLP および 30S サブユ ニットを標識した. pGM1192 プラスミドを改変して, hrdBプ ロモーター制御下でHis₆タグを付加したSLPスパイクタ ンパク質を発現するように設計した. MurG-His₆および MurG-msfGFPは、pTYM19tプラスミド(尾仲宏康教授 [学習院大]より分譲)において tibA プロモーター制御下 で発現させた. His₆ タグを付加した SLP スパイクタンパク 質および MurGを含む細胞破砕液をNi²⁺アフィニティクロ マトグラフィーに供し、さらにその溶出液を定量プロテオー ム解析に供した(西山辰也博士[日本大]との共同研究).

【結果・考察】SLPは細胞内の特定の領域に局在する傾向を示し、細胞内タンパク質との相互作用が示唆された. そこで、SLPにHis6を付加してNi²⁺カラムで単離し、単離画分のプロテオーム解析を行ったところ、この画分には30Sリボソームタンパク質の大多数が濃縮されていた. 上記画分には細胞壁合成を担う重要な細胞内タンパク質 MurGも濃縮されており、MurG-His6タンパク質を用いた補完的な解析により、30SリボソームおよびSLPタン 永久保 利 紀

パク質との共溶出が示された.加えて、蛍光タンパク質 融合による局在解析では、MurGまたは30Sサブユニット とSLPの共局在も観察された(図1A).SLP欠損株では 細胞側壁領域での細胞壁合成が減少するという先行研究 の結果と併せると、リボソーム-MurG-SLPの3者間の相 互作用が適切な細胞壁合成の制御ひいては浸透圧に起因 する細胞表層ストレスへの耐性に繋がった可能性がある.

SLP 様粒子は放線菌に広く保存されており、そのうち Streptomyces davawensis は独特な組成の遺伝子クラスター に由来する SLP 様粒子を有することも見出した.この粒 子を欠いた S. davawensis は高密度コロニーにおける胞 子形成が著しく低下し、この表現型は多細胞集合体の足 場となる細胞外マトリクス中の細胞外 DNAの減少と関 連することが示唆された.また、SLP 様粒子を欠いた S. davawensis と S. lividans を共培養すると、この複合コロ ニーにおいても両者の胞子形成が著しく低下した(図1B).

SLP 様粒子は元来放線菌に感染するウイルス(ファー ジ)だったと思われるが,放線菌はそれらの粒子を利用 して,放線菌共同体においては繁殖可能な胞子を生産し, 一方で真菌との対峙面においてはそれらの侵略を防いで いるのかもしれない.本研究の成果は,外敵(ウイルス) をも利用しながら自然界での競争にのぞむ放線菌の抜け 目ない生き様を示唆している.



図1 ウイルス様粒子の局在と胞子形成への影響 (A) S. lividans での SLP, MurG, 30S サブユニットの局在 (B) S. lividans-S. davawensis 共同コロニーの胞子形成



ゲノム解析とメタボローム解析による腟内優性乳酸桿菌の生息に関わる代謝経路の解明

【目的】切迫早産(TPL)は最も多い妊娠合併症であり, 2020年の日本の人口動態統計によると,日本における 早産率は5.6%であるが,早期新生児死亡において早産 児の占める割合は65.1%と高率である.TPLの予防は 重要な課題であるが,医療技術や医学が発展しているも のの,発症率はあまり改善されず,早産率は減少してい ない.TPLの主な原因は,細菌性腟症(BV)や頸管炎 からの上行性感染が考えられ,抗菌薬投与による早産予 防が試みられてきたが,その有効性に関しては否定的な 報告が多い.一方で,腟内常在菌は乳酸桿菌が優勢であ り,腟内のpHを下げ,他の菌が発育を阻害している. 抗菌薬投与にて早産が改善されないことからも,乱れた 腟内細菌叢が早産を誘発しているのではなく,常在する 乳酸桿菌が積極的に早産を抑制していると仮説を立てた.

常在性の腟内乳酸桿菌は4種に分類され、優勢菌叢で はその90%が同一菌株で構成され、腟内細菌叢解析か らも、乳酸桿菌優勢 Cluster と非優勢 Cluster に分類され る. BV 様菌叢の非優勢 Cluster では切迫早産が有意に多 い一方で、優勢 Cluster においても TPL 患者は一定数存 在する.同じ乳酸桿菌とはいえ,株毎に働きが異なるこ とは多くの研究で示されており, 腟内細菌においても同 様のことが予想され、患者由来株毎に機能解析をする必 要がある. そこで本研究では, 腟内常在菌である乳酸桿 菌がTPL/早産に与える効果を、妊婦から分離した腟内 細菌の全ゲノム解析からその機能を予測し、切迫早産/ 早産抑制, またはそのリスク因子の同定を目的とした. 【方法】大阪公立大学(旧大阪市立大学)医学部付属病 院に通院,及び入院の妊産婦の腟分泌よりDNAを抽出 し、 腟内細菌叢解析を実施した、 細菌叢解析の結果から 目的となる細菌種を特定し, 腟分泌液より各種選択培地 を用いて目的細菌種の単離を行った(表1).

表1 本研究における全ゲノム	ム解析腟内細菌単離株
----------------	------------

菌種名	単離株数
Lactobacillus crispatus	11
Lactobacillus gasseri	7
Lactobacillus iners	3
Lactobacillus jensenii	5
Gardnerella swidsinskii	1
Fannyhessea vaginae	2

神谷知憲

単離株から DNAを抽出し, MinION にてロングリード シーケンスを行った. アセンブル (Canu)後にポリッ シング (racon, medaka) を行い, CheckM 及び ANI より環状ゲノムの質的チェックを実施した. 得られた環 状ゲノムをアノテーション (RAST Server) し, 細菌 種毎の変化を解析した.

【結果・考察】単離が完了した優勢乳酸桿菌4種26株, 非乳酸桿菌3株,及びそれぞれの標準株の全ゲノム解析 を行い,作成した環状ゲノムをアノテーションし,各細 菌種,特徴別に遺伝子群を比較した(図1).乳酸桿菌別, 非乳酸桿菌別に特有の遺伝子群クラスターが確認され た.非乳酸桿菌クラスターには,それらがグラム陰性菌 であることから,ポリサッカロイド合成経路が含まれた. そして特徴的なのが,植物ホルモン-オーキシン合成や 芳香族アミノ酸代謝に関わる遺伝子群が見られ,トリプ トファン代謝物を産生する遺伝子を多数保有しているこ とがわかった.将来展望として,必須アミノ酸であるト リプトファンを宿主と非乳酸桿菌クラスターが取り合う 環境が考えられることから,トリプトファンの有無が優 勢乳酸桿菌の生着に関与するかを検証する予定である.



図1 保有遺伝子群の階層クラスタリング結果 単離株,及びそれぞれの標準株の全ゲノム解析を実施した.上記階層クラスタリングにて示した Heatmapの列がそれぞれの菌株を示し,行が遺伝子 群(Subcategory Annotation)を示す.

所属 大阪公立大学大学院医学研究科病態生理学 E-mail: tkamiya@omu.ac.jp

典型的な DNA 修復因子が示す新規 RNA 結合活性の意義

【目的】高温環境で生息する生物のゲノムには損傷が起 きやすく,正確な遺伝情報の継承には効率的な DNA 修 復が必要であると考えられている.本研究では、至適 生育温度80℃以上の超好熱性アーキアThermococcus kodakarensis と Pyrococcus furiosus の DNA 修復タンパク 質の機能解析を進めた。修復タンパク質の中でも特に2 つのDNA修復タンパク質, XPBとRadAに着目した解 析を進めた、XPB は真核生物型ヌクレオチド除去修復因 子のホモログであり、アーキアにおける役割に関する理 解は進んでいないものの. 広く保存されている. RadA は 相同組換え酵素であり、多くのアーキアで必須タンパク 質である. XPBと RadA がアーキアで重要であることは 推察されるものの、具体的な役割の理解は進んでいない. 【方法】 P. furiosus RadAと T. kodakarensis XPBの核酸に 対する結合や組換え反応を調べた. 続いて. T. kodakarensis 抽出液を用いた共免疫沈降/プルダウン-LC-MS/MS 解 析によりXPBとRadAの相互作用因子を網羅的に同定 した. XPBとRadAに直接結合する因子を同定するため、 精製タンパク質を使ったプルダウン法とゲルろ過クロマ トグラフィー, 酵母ツーハイブリット法, AlphaFold2 を用いた複合体構造解析を行った.

【結果・考察】XPBとRadAはDNAに特異的な修復タン パク質と考えられてきたが、ゲルシフトアッセイにより、XPB とRadAはDNAと同等にRNAにも結合することが分かっ た(図1A, B). このような活性は真正細菌や真核生物の ホモログでは報告されておらず、極限環境に広く適応して いる一部アーキア独特の機構である可能性がある.RadA の鎖交換活性について調べたところ、DNA-dsDNA間の 鎖交換反応は触媒するものの、RNA-dsDNA間の反応は 触媒しないことが分かった(図1C).つまり、RadAは DNAと同等の強さでRNAに結合するが、RNAへの結合 はDNAとは異なる役割を持つ可能性がある.



図1 アーキアのXPBとRadAの核酸結合能と鎖交換活性. RadA(A)とXPB(B)の核酸結合能.(C)RadAの鎖 交換活性.K144RはATP加水分解活性が遅い変異体.

白石 都

RadAと XPB が持つ RNA に対する結合意義について理 解を進めるため、RadAと XPB の相互作用因子を探索し た. 相互作用因子のスクリーニングは. T. kodakarensis 細胞抽出液を用いた共免疫沈降/プルダウン-LC-MS/MS 解析により行った. 抗 XPB 抗体をベイトとした解析では, 多数の RNA ポリメラーゼ (RNAP) のサブユニット及 び転写因子が検出された。XPB は転写制御あるいは転 写を介した DNA 修復に関与する可能性が示唆された. そこで XPB が転写因子あるいは RNAP のサブユニット と直接結合するかどうか、精製タンパク質を用いてプル ダウンアッセイあるいはゲルろ過解析により判定した. RNAP Eを用いた場合、プルダウンアッセイ及びゲルろ 過解析でXPBが共に溶出した.ただし、RNAPEの精製 度が低いことやゲルろ過の解像度が低いことから、別の 方法で追加解析をする必要がある.一部の相互作用候補 タンパク質は精製が困難であったため. 酵母ツーハイブ リット法を用いて XPB との相互作用を解析したが、陽性 クローンは得られなかった. 精製 RadA をベイトとした MS 解析では、既知の相互作用因子である RadA 自身が 多数検出された他に、機能未知タンパク質が検出された。 ただ、特定の経路で働くタンパク質群は濃縮されて検出 されなかった. そこで, RadAと直接相互作用する因子 を絞り込むため、AlphaFold2を用いた in silico プルダウ ン解析を行った.特に相互作用する可能性が高いと推定 されたTK0656について、ゲルろ過クロマトグラフィー による相互作用解析を行った(図2). RadAとTK0656 は共溶出したことから、相互作用する可能性がある.



図2 (A) AlphaFold2による RadA-TK0656の複合体構造
予測の PAE. (B) RadAと TK0656のゲルろ過による相互作用解析. TK0656は一部分解している.

以上より、アーキアの XPB は転写あるいは転写を介 した DNA 修復に関与する可能性があること、また、 RadAの新たな有力な相互作用候補因子として機能未知 タンパク質 TK0656 を同定した.

アーキアにおけるセレンタンパク質合成機構の解明

【目的】21番目のアミノ酸として知られているセレノシ ステイン (Sec) を含むセレンタンパク質は全生物ドメイ ンに存在するが、その合成機構は異なる(図1). Secは 本来終止コドンである UGA に挿入され、その挿入には Sec 挿入配列 (SECIS) を必要とする。細菌において、翻 訳伸長因子 SelB が SECIS を認識して Sec-tRNA Sec を運 び込む.一方、真核生物・アーキアの SelB には、細菌 由来 SelB に存在する SECIS 認識部位が存在しない. 真 核生物には SECIS 結合タンパク質 SBP2 が存在し, SelB は SBP2 を介して SECIS を認識し. Sec-tRNA^{Sec} を 運び込むと考えられている.しかしアーキアのゲノム上 にはSBP2ホモログが存在せず、どのようにセレンタン パク質を合成しているのか不明である. そこで、アー キアにも SBP2 に代わる SECIS 認識タンパク質 (aSBP) が存在し、セレンタンパク質合成において機能する可 能性を考えた.本研究では、セレンタンパク質を有す るメタン生成アーキア Methanothermococcus okinawensis IH1 (ICM 11175) および Methanococcus maribaludis II (NBRC 101831) を対象に、aSBPの探索を行った。



図1 各ドメインにおけるセレンタンパク質合成機構

【方法】まず, in vitro 転写により調製した RNAと組換 え型 SelBを用いてゲルシフトアッセイを行い, SelB が SECISと直接相互作用するかを検討した.次に, M. maripaludis を亜セレン酸添加・非添加条件で培養し, セレンにより誘導される遺伝子を探索した.さらに, Ni²⁺ カラムを用いたプルダウンアッセイにより,細胞抽出液 中に SelBと相互作用するタンパク質が存在する可能性 を検討した.また, M. okinawensis を対象に, 候補遺伝 子の機能評価に必要な遺伝子組換え系の構築を検討した.

青野 陸

【結果・考察】ゲルシフトアッセイにより SelB が SECIS と直接相互作用する可能性を検討したところ, RNAと の結合は見られたものの, SECIS 領域を含む RNAとの 特異的な相互作用は見られなかった (図 2).



図2 SelBと各種 RNAを用いたゲルシフトアッセイ

そこで SelB の SECIS 認識を介在する aSBP が存在す る可能性を考えた. 探索に先立ち, aSBP がセレンによ り誘導される可能性を予想し, 遺伝子発現変動解析を 行った. その結果, セレン添加条件において, セレンタ ンパク質合成関連遺伝子の発現量に大きな違いは見られ なかった. そのため, aSBPも同様にセレンの有無にか かわらず恒常的に発現していると予想された.

次に SelB 組換え型タンパク質と *M. okinawensis* の細 胞抽出液とを混合してプルダウンアッセイを行ったとこ ろ, SelB と相互作用する可能性のあるタンパク質が得ら れた. バイオインフォマティクス解析により, SelB と共 起性を示すタンパク質を探索したところ,上記プルダウ ンアッセイにおいて,得られたタンパク質と同等の分子 量を示すタンパク質が1つのみ存在していた.以上より, 本タンパク質が SelB と相互作用し,セレンタンパク質の 合成に何らかの関与をしている可能性を予想している.

また aSBP 候補タンパク質の生体内での機能を評価す るため、これまでに系が確立されていない M. okinawensis を対象に、遺伝子組換え系の構築を検討した. その結果、 高発現によりシンバスタチン耐性を示す hmgA を選択 マーカーとした、相同組換えによる遺伝子組換え系の構 築に成功した. このことより、本系を用いて aSBP 候補 遺伝子の in vivo 機能解析が可能となった.

以上より,SelBと相互作用してセレンタンパク質の 合成に関与すると予想される aSBP 候補タンパク質の取 得に成功した.さらに,その *in vivo* 機能解析に資する *M. okinawensis* の遺伝子組換え系の構築に成功した.本研 究を通じて,メタン生成アーキアのセレンタンパク質合 成についての研究基盤を構築することができた. 大腸菌の酸耐性発現誘導メカニズムの解明による次世代型感染防除法の構築

【目的】大腸菌は、ヒトに経口感染する際、酸耐性機構 を発現することで胃酸(pH<2.5)を突破する.しかし、 その発現制御メカニズムの詳細は解明されていない.酸 耐性の発現は迅速に誘導されることから、本研究では、 翻訳を介さず機能できる RNAレベルでの制御に焦点を 当てた.大腸菌の酸耐性機構は、グルタミン酸脱炭酸酵 素 GadA/B に依存した Gad システム、およびアルギニ ン脱炭酸酵素 AdiA に依存した Adi システムの二つが強 力である.興味深いことに、AdiAをコードする mRNA の 3'UTR(非翻訳領域)は切り離され、non-coding small RNA (sRNA)として機能する可能性が示されてい た.そこで、本研究では、これを AdiZ と命名し、その 生成メカニズムおよび機能の解明を目指した.

【方法】菌株: Escherichia coli K-12 MG1655, 培地:LB. AdiZ 生成メカニズムの解析: MES または MOPS 緩衝液 を添加しpHを5.5, 7.0, 8.0 に調製した培養液において, 振とうによる好気培養または嫌気性チャンバーを用いた 嫌気培養を行った.対数増殖期で RNAを抽出し,これ をノーザンブロット解析に供した.また,種々の転写因 子および sRNAシャペロン Hfq の遺伝子欠損株および主 要エンド型 RNase (RNase E)の温度感受性変異株も 同様に解析した.次に,adiZ 近傍にプロモーター領域 が存在するか検証するため,上流領域を含めadiZをプ ラスミドにクローニングし発現レベルを解析した.

AdiZの機能解析: プラスミドから AdiZ を過剰発現させ、 トランスクリプトーム変化を RNA-seq により解析した. ここで発現が顕著に変動した遺伝子を gfp に融合し、レ ポーター解析に供した. 最後に、AdiZ の Gad 発現への 影響を調べるため、pH 指示薬(Bromocresol Green) の呈色の変化により Gad 酵素活性を評価し、さらに強 酸培地(グルタミン酸添加 M9 最小培地, pH2.5)中で の生存率をコロニーカウントにより評価した.

【結果・考察】AdiZ生成メカニズムの解析:ノーザンブ ロットにより、AdiZは、嫌気性かつ弱酸性(pH5.5) 条件下で、約80塩基に相当するRNAとして検出された. 同条件下で種々の転写因子欠損株を解析し、FNRおよ びAdiYが、それぞれ嫌気性および酸性シグナルに応答 してadiA-adiZの転写を誘導することを特定した.また、 HfqおよびRNase Eの遺伝子変異株では、AdiZはほと んど生成されなかった.さらに、プロモーター活性の解 析により、adiZそれ自体はプロモーターを持たず、その転 写はadiAのプロモーターに依存していることがわかった. 以上より、AdiZは、adiAmRNAの3'UTRとして転写され

所属 筑波大学医学医療系 E-mail: tkanda@md.tsukuba.ac.jp

神田 健

た後, RNase Eにより切断され, Hfq が結合することで安 定的な sRNAとして存在すると結論付けられた (図 1). AdiZ の機能解析: AdiZ をプラスミドから過剰発現させ たところ, Gad システム構成遺伝子群の mRNAレベル が特異的に減少した. そこで,マスターレギュレーター GadE に着目しレポーター解析を行ったところ, gadEの 転写が AdiZ の発現により強力に抑制されることがわ かった (図 2a). さらに, adiZ の遺伝子破壊株では, Gad 酵素の発現レベルが上昇していた. また, pH2.5 に 1時間曝された際の生存率は,野生株では~50%だった のに対し, adiZ 破壊株では~100%と顕著な酸耐性化が 見られた (図 2b). 以上の結果から, AdiZ は, gadE の 発現を制御することで Gad システムの発現を抑制して いると考えられる.

本研究により、嫌気性条件下において adiA が転写さ れると同時に生成され、速やかに Gad システムの発現 を抑制する新規 sRNA、AdiZ を見出すことができた.本 発見は、大腸菌が環境中の酸素レベルに応じて、2つの主 要酸耐性機構を巧妙に使い分けており、AdiZ がこの分業 を成立させるカギであることを示唆している.なお、AdiZ の機能を再現した人工 RNA により大腸菌の酸耐性を阻害 する方策を試みたが、本研究では開発に至らなかった.



図1 本研究から予想される AdiZ sRNAの生成機構



- 207 -

水田細菌叢形成メカニズムの解析 - 土壌理化学性改変による菌叢制御の試み -

鈴木一輝

【目的】水田においては土壌細菌群集がその地力の維持 に重要な役割を果たしているが、その群集形成メカニズ ムは未だ不透明であり、菌叢の制御には至っていない. 我々は、水田の土壌型間で細菌叢が大きく異なり、肥培 管理(有機栽培か慣行栽培か)や地理的要因はその下位 に現れることを明らかにした.これらは、それぞれの土 壌型に固有の物理的あるいは化学的特性が、細菌群集に 大きな影響を与えていることを表している。また、水田 に移植されたイネ根には土壌から多様な細菌種が侵入 し、植物生育促進効果を持つ内生菌(エンドファイト) 群集を形成する、そこで、水田細菌叢の制御に繋がる知 見の獲得を目指し、土壌特性の変化が水田細菌叢形成に 及ぼす影響を追跡するとともに、土壌細菌叢の違いがイ ネ根エンドファイト群集形成に与える影響を解析した. 【方法】まず、本邦の特徴的な水田土壌である黒ボク土 を対照とし、その特徴である高い腐植含量および活性ア ルミニウム含量に着目した. グライ土および灰色台地土 に. 各種腐植酸または活性アルミニウムを黒ボク土の等 量または半量となるように添加したマイクロコズムを調 製し、暗所・湛水条件で最大8週間培養した、培養後、 土壌 DNAを抽出し、細菌 16S rRNA 遺伝子を標的とす るアンプリコンシーケンス解析に供した.次に、上記の 3 土壌を2mm以下(対照), 2~0.2mm(粗砂), 0.2~ 0.02mm (細砂). 0.02mm 以下 (シルト・粘土) の4つ の粒度で分画することで同一土壌型内に環境勾配を設け、 形成される細菌叢の比較を行った. 最後に、イネのエンド ファイト供給源としての土壌細菌叢の重要性を検討した. 黒ボク土, グライ土, 灰色低地土, 灰色台地土, 砂丘未 熟土を供試土壌として用い、土壌を不織布製の透水性袋 に入れて湛水条件で前培養を行い、水耕栽培ポットにイネ 幼苗と土壌袋を互いに接触しないように設置し、人工気象 器内で栽培を行った。幼苗移植後3週間および6週間目 に植物根の回収を行い、根エンドファイト群集を解析した. 【結果・考察】本研究では、肥培管理等に影響される可 給態養分ではなく、土壌に元々蓄積している難分解性の 有機成分である腐植に着目した. グライ土および灰色台 地土中の腐植酸および活性アルミニウム量を黒ボク土と 同等まで上昇させたところ、一部の細菌群の反応が確認 されたものの3種の土壌中の細菌叢は依然として大きく 異なっていた(図1).本研究での添加量がグライ土お よび灰色台地土の腐植酸含量及び活性アルミニウム含量 の5~10倍に相当するにも関わらず、細菌叢全体の変 動が小さいことから、いずれも黒ボク土様の細菌叢形成 の主要因ではないと考えられた.以上のことから,水田 細菌組成は易分解性・難分解性問わず,有機物施用に対して比較的堅牢であると言える。



図1 腐植酸添加による水田細菌叢の遷移(加重UniFrac)

粒度別に分画した土壌を湛水培養したところ,いずれ の粒度でも形成される細菌叢は各土壌型の特徴を維持し ていたものの(図2),粒度が小さくなるにつれて形成 される細菌叢の多様性が減少する傾向が認められた.ま た,グライ土のシルト・粘土画分を培養した場合に形成 される細菌叢は黒ボク土の細菌叢にやや類似する傾向を 示した.粒度ごとの土壌化学性の詳細な検討が必要では あるが、上述のように有機成分の影響が比較的小さいこ とを考慮すると、今後は土壌の物理性に焦点を当てた研 究が必要になると考えられる.



図2 粒度別に形成される土壌細菌叢の遷移(加重UniFrac)

5種類の土壌を細菌叢接種源としたイネの水耕栽培試 験では、根に形成されたエンドファイト群集は土壌ごと に有意に異なっていた。特に黒ボク土を用いた場合に根 エンドファイト群集は最大の種数・多様度を示した。一 方で、イネ生育は黒ボク土を接種源としたものよりもグ ライ土を用いたものの方が良好であった。以上より、土 壌細菌叢の違いがエンドファイト形成に影響することが 示され、土壌細菌叢制御の重要性が示唆された。 【謝辞】本研究における試料調製に用いた機材やシーケン シング解析の一部は、JSPS 科研費(21K14952)および加 藤記念バイオサイエンス振興財団の助成も受けて実施した。

所属 新潟大学研究推進機構超域学術院,現新潟大学自然科学系農学部 E-mail: suzukik@agr.niigata-u.ac.jp

水圏生態系におけるロドプシン集光アンテナの構造と機能

【目的】大多数の微生物型ロドプシンは、結合したレチ ナールが光エネルギーを受容すると水素イオン(H⁺) を細胞の内側から外側へ輸送し生物が利用可能な電気化 学的ポテンシャルを形成する.例外として数種類のキサ ントロドプシン(XR)は、レチナールのほかにサリニ キサンチンというカロテノイドと結合し、レチナールが 受容できない光を利用することができる.しかし、こう したカロテノイドは限られた微生物しか合成できないた め、サリニキサンチン-XRのペアのような集光アンテナ システムは例外的な光受容機構であると考えられてき た.我々を含む国際的研究グループは、イスラエルの湖 から機能的メタゲノミクスによって探索した結果、 Kin4B8が水酸化カロテノイドであるゼアキサンチンを 集光アンテナとして利用し、青色〜緑色光でH⁺を効率 よく輸送できることを発見した(図1).

しかし, ゼアキサンチンがどのように Kin4B8 に結合しエ ネルギーを受け渡すか, また水酸化カロテノイドを選択的に 利用できるカロテノイド選択性のメカニズムは不明だった.



図1 ゼアキサンチンを利用する Kin4B8の発見

【方法】ゼアキサンチンを発色団として持つロドプシン たちが、なぜ4-ケト環構造を持たないゼアキサンチンを 集光アンテナとして使うことができるのかを調べるため、 脂質ナノディスクに再構成したゼアキサンチン-Kin4B8 複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析 (cryo-EM)を行った.

【結果・考察】ゼアキサンチン-Kin4B8複合体の cryo-EM 構造を 2.3Åの分解能で決定した(図 2A). Kin4B8 は 5量体を形成しており、ゼアキサンチンは、タンパク質 志甫谷 涉



図2 ゼアキサンチン-Kin4B8 複合体の Cryo-EM 構造

の表面に大きな横穴が開いた単量体のそれぞれの外側に 確かに結合しており(図2B),その密度は明瞭に観察で きた. ゼアキサンチンの結合様式を詳細に観察すると. 水 酸基環は横穴にはまっており、レチナールと直接相互作 用していた. ゼアキサンチンの結合様式は. S. ruber 由 来XR中のサリニキサンチンの結合様式とほぼ同様であ り(図2C), 似たメカニズムによるエネルギー移動が可 能であることが推測された. この横穴は, Kin4B8 および S. ruber 由来 XR の両構造共に、レチナールのβイオノン 環付近のアミノ酸残基がグリシンであることで形成され ている. カロテノイドを結合しないロドプシンでは、こ の部分がフェニルアラニンになっていて横穴が塞がって おり、横穴がカロテノイド結合に極めて重要であること がわかる、横穴の環境をよくみてみると、ゼアキサンチ ンの水酸基は溶媒に露出しており、まわりの親水性アミ ノ酸であるセリンやチロシンと相互作用していた(図2D). 既知の4-ケト環構造のカロテノイドと結合する S. ruber 由来XRでは、これらの残基の極性は疎水性になってい た(図2E). このように、横穴を構成するアミノ酸残 基の性質や構造の違いが、XRの間で結合するカロテノ イド色素の違いを決めていると考えられた. また、メタ ゲノム解析の結果から、横穴を可能にするグリシン含む ロドプシンは海洋では3割,淡水では5割以上を占める ことが明らかになり、 集光アンテナを潜在的に持つロド プシンが予想以上に水圏生態系に広がっている可能性を 示唆している. 光エネルギーを受け取る生物の光受容効 率を把握し、生態系に流れ込む光エネルギー量を正確に 算出することは重要な研究課題であり、本研究の成果は 水圏生態系の理解の深化につながると期待される.
アーキアのゲノム安定性維持に関わる新規タンパク質の機能解明

尾木野 弘 実

【目的】アーキアの中でもユーリアーキオタ門に属する 生物は、増殖期において細胞内に多数のゲノムコピーを 有するポリプロイドである. そのため. モノプロイドで あり、進化的に真核生物に近いクレンアーキオタとは異 なり容易に相同組換えや相同組換え依存的 DNA 複製を 起こすことが予想される.相同組換えを進行させるタン パク質は生物ドメイン間で保存されているが、アーキア 特有のものや機能未知のものが存在し、全貌は明らかで はない. さらに、相同組換えから DNA 複製に移行する 分子メカニズムも不明である.本研究では.相同組換え と DNA 複製の両方で役割が想定される、RecJ/Cdc45 ファミリーに焦点を当てた.多くのアーキアが複数の RecJ/Cdc45ホモログを有するが、これまでに相互作用 することが知られているタンパク質は DNA 複製に必須 な GINS のみであり、その具体的な役割は不明である、 そこで, 好熱性アーキア Thermoplasma acidophilum に おける RecI/Cdc45 ホモログである RecI1 および RecI2 と相互作用するタンパク質を網羅的に探索し、得られた 候補タンパク質との相互作用解析を通してユーリアーキ オタ門における相同組換えおよび相同組換え依存的 DNA 複製の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした. 【方法】RecJ1 および RecJ2 の 発 現 ベ ク タ ー と T. acidophilum HO-62 由来ゲノム DNA ライブラリを用いた酵 母ツーハイブリッド法による網羅的なスクリーニングを 行い,相互作用候補タンパク質を絞り込んだ.得られた 候補のうち検出回数の多かった遺伝子を選別し、大腸菌 発現系を用いてリコンビナントタンパク質として調製し た. 調製したタンパク質について, RecJ1 および RecJ2 との相互作用をプルダウンアッセイにより解析した.

【結果・考察】RecJ1およびRecJ2と相互作用するタン パク質を酵母ツーハイブリッド法により探索した結果, RecJ1と5回以上相互作用が検出されたものが6種類, RecJ2からは7種類得られた.これらの中には,DNA複 製・修復・組換えに関与すると予想されるものや機能未 知のものが複数含まれていた(表1).これらのタンパク 質について大腸菌内で産生後精製を試みたところ,とも に5種類のタンパク質の精製に成功した.さらに,Hisタ グを用いたプルダウンアッセイによって,RecJ1が実際 に*in vitro*で直接 Rad50および SMCと相互作用すること を明らかにした.Rad50と SMC はともに同じ SMC ファ ミリーに属するタンパク質であり,それぞれ相同組換え 表1 RecJ1 および RecJ2 と相互作用する候補の一部

locus tag	annotation	function
RecJ1 と相互作用		
Ta0097	DnaG	primase
Ta0157	Rad50	ATPase, DNA-binding
Ta0518	SMC	chromosome condensation
Ta0917	PCNA	DNA clamp
Ta1500	RFCS	clamp loader
RecJ2と相互作用		
Ta0336	DUF6015	unknown
Ta0459	DUF2240	unknown
Ta1054/Ta1055	DNA gyrase	topoisomerase
Ta1104	RadA	recombinase
Ta1322	YncE	unknown

における一本鎖 DNAの形成過程と染色体凝縮に関与す ることから, RecJ1 がこれらの現象に関わる可能性があ る. RecJ1 と相互作用する領域はどちらもコイルドコイ ルドメインを含んでおり(図1), Rad50とSMCは同じ 相互作用様式を共有して RecJ1と結合することが示唆さ れた.また, RecJ2 との相互作用が検出された RadA はリ コンビナーゼであることから, RecJ2 は GINS と RadA という, DNA 複製と相同組換えの両方の現象で相互作 用するタンパク質が存在することが明らかになった.

今後は、これらの相互作用を中心に詳細な活性測定お よび細胞内での相互作用解析を行うことにより RecJ/ Cdc45 を利用した相同組換えの分子メカニズムを明らか にする予定である.



図1 Rad50 および SMC の RecJ1 との相互作用領域

2022年度学会・研究部会助成の研究報告

助成期間:2022年4月~2024年3月

日本乳酸菌学会における微生物の分類・培養分野の研究推進と啓発

片 倉 啓 雄

【活動内容および成果】

日本乳酸菌学会は、学会員数300余名ほどの小規模の 学会ですが、乳酸菌に関する基礎研究に加えて、産業利 用への展開など、実社会とも密接に連携する高いアク ティビティをもつ学会です. 伝統的な発酵食品や飲料に 用いられる乳酸菌だけでなく、昨今の腸内細菌への関心 の高まりとも相まって、プロバイオティクス(宿主に有 用な効果を与える微生物)としての乳酸菌にも注目が集 まっています.

乳酸菌学会は、その名の通り乳酸菌自体を主な研究対 象とする学会です.このため、研究対象とする乳酸菌の 氏素性を明らかにし、その性質や機能がどのような進化 によって、そしてどのような培養によってもたらされる のかを理解することは重要です. また、プロバイオティ クスとして産業応用し、用途を拡大するためには、高効 率の大量培養技術が必要です. さらには、データサイエ ンスの発展にともなって遺伝子配列による分類の再編に 加えて転写産物の機能予測が進んでいますが、これをそ の微生物の実際の生理機能と結びつけるには培養をとも なう検証実験が不可欠です.

ところが、分類・培養の研究に携わる若手研究者は以 前に比べて減少しているのが現状でした. そこで、貴財 団の学会・研究部会助成に応募させて頂き、当学会内に 「乳酸菌·腸内細菌分類·培養専門委員会」(構成員8名) を設けました. 本委員会は、2年間の活動を通して、分 類・培養に関する学会員の意識を高め、研究分野として の重要性を共に再認識して研究を推進するために、以下 の4つの活動を行いました.

1. 若手研究者への研究費の助成

当委員会の活動で最も重要視したのは、若手研究者に 分類・培養技術への造詣を深め、研究分野としての重要 性を再認識してもらうことでした. そこでまず, 若手研 究者・学生を対象に、1人あたり60万円を上限として、 分類・培養に関連する研究に対する助成を公募し、以下

の5件の優れた提案に対して、2年間で260万円の助成 を行いました.

2022年度

●九州大学(現山口大学)前野慎太朗さん(60万円) Apilactobacillus 属細菌における in silico DNA-DNA hvbridization を用いた分類方法の評価

2023年度

- ●岡山大学 鈴木理都子さん(60万円) 鶏腸管内容物より分離した乳酸菌株の新菌種提案に向 けた性状評価およびゲノム解析
- ●理化学研究所 久富 敦さん(60万円) 液・液共培養法を用いた細胞サイズが小さな難培養微 生物の単離
- 関西大学 神原大樹さん(40万円) 乳酸菌の好気流加培養における酸素障害の回避
- ●京都大学 小酒井智也さん(40万円) 系統解析を基軸とした Bacteroidaceae 科細菌の生態学 的意義の理解

このうち久富 敦さんは、成果の一部を微生物系統学 分野の国際学術雑誌に報告したほか(Int. I. Svst. Evol. Microbiol. 2024:74:006381). 日本微生物資源学会誌にも 論文が受理されています(2024年6月現在,印刷中). 学会発表についても, 前野慎太朗さんが日本乳酸菌学会 2023年度大会と日本農芸化学会2024年度大会で、久富 敦さんが日本農芸化学会2024年度大会でそれぞれ口頭 で成果を発表しています.

2. 若手研究者への学会参加旅費の助成

分類・培養関連分野の研究者育成を目的とし、学術集 会で研究成果を発表する若手研究者・学生に対して、そ れに係る参加費と旅費(宿泊費・交通費)を補助する事 業を行いました.2年間で以下の6名に総額258,968円 を助成し、受給者の参加・発表の報告文について日本乳 酸菌学会誌 34~35 号に掲載しました. 2022年度

●関西大学 神原大樹さん(日本乳酸菌学会2022年度 秋期セミナー,於:東京農業大学,33,084円) Lactiplantibacillus plantarum の好気流加培養における 網羅的遺伝子発現解析

E-mail: katakura@kansai-u.ac.jp 役職:日本乳酸菌学会 前会長

2023年度

- 岡山大学 鈴木理都子さん(日本乳酸菌学会2023年度大会,於:関西大学,21,100円)
 バクテリオシン様抗菌活性を有するニワトリ腸管由来乳酸菌の分離と同定
- 東北大学 橋本凌河さん(2023年度日本乳酸菌学会 泊まり込みセミナー,於:長野県木曽町,53,610円)
 乳酸菌による母乳オリゴ糖代謝から紐解く仔豚のマイ クロバイオーム形成
- 東北大学 松本夏歩さん(2023年度日本乳酸菌学会 泊まり込みセミナー,於:長野県木曽町,40,870円) ブタ小腸オルガノイドを用いたポストイムノバイオ ティクスの評価系構築
- ●山口大学 前野慎太朗さん(日本農芸化学会2024年 度大会,於:東京農業大学,82,744円)
 In silico 解析に基づく *Apilactobacillus kunkeei*の分類 方法の評価
- ●関西大学 中村めいさん(日本農芸化学会2024年度 大会,於:東京農業大学,27,560円)
 曲率認識ペプチドを用いた乳酸菌の膜小胞産生条件の 検討
- 3. 分類・培養に関する啓発イベント事業
- (1)「秋期セミナー」の共催

2022年度および2023年度に開催された乳酸菌学会秋期セミナーを乳酸菌・腸内細菌分類・培養専門委員会との共催とし、分類・培養分野で顕著な業績をあげておられる先生方から(特に学生を含む若手研究者への)教育的な講演及び最先端の研究紹介をいただきました.セミナー終了後は情報交換会を開催し、演者と参加者の交流の場としました.分類・培養分野の講演者は以下の通りです.

<u>2022 年度</u>(於:東京農業大学,ハイブリッド開催) 参加者 225 名(うち学生 90 名)

https://jslab-nyusankin.jp/conference/autumn-2022/ ● 坂本光央先生(理化学研究所)

微生物の分離・培養および分類 2023年度(オンライン)

参加者 139 名(うち学生 56 名)

https://jslab-nyusankin.jp/conference/autumn/ autumn-2023/

- 鈴木健一朗先生(東京農業大学)
 乳酸菌の分類に関する最近の動向
- 小柳 喬先生(石川県立大学)
 乳酸菌と伝統発酵食品~多様な菌株の分離源として
- 鎌形洋一先生(産業技術総合研究所)
 難培養微生物の実態解明と分類命名上の課題について

- ●三浦隆匡先生(製品評価技術基盤機構) 菌叢解析方法の妥当性評価のための mock community (微生物カクテル)の開発とその利用について
- ●中島賢則先生(㈱ダイセル) 機能性腸内代謝物ウロリチンA生産に関与するヒト 腸内細菌の探索と利用
- 海野良輔先生(東京農業大学)
 軟質熟成チーズにおける非スターター微生物の存在と
 風味形成の連関
- (2)「泊まり込みセミナー」の共催

2023年度および2024年度に開催された乳酸菌学会泊 まり込みセミナー(1泊2日で開催)を乳酸菌・腸内細 菌分類・培養専門委員会との共催とし,分類・培養分野 で顕著な業績をあげておられる以下の先生方を特別講演 演者として招待し,教育的な講演をいただきました. 2023年度(図1.2)

於:長野県木曽町,参加者43名(うち学生9名) https://jslab-nyusankin.jp/conference/special/ special-2023/

岡田早苗先生(高崎健康福祉大学)
 木曽の冷涼な風土で育まれた伝統発酵食品とそこに棲む乳酸菌



図1 2023年度泊まり込みセミナー(木曽開催)の様子



図2 2023 年度泊まり込みセミナー(木曽開催)での 特別教育講演の様子

日本乳酸菌学会における微生物の分類・培養分野の研究推進と啓発



- 図3 2024年度泊まり込みセミナー(京都開催)での 特別教育講演の様子
- ●下里剛士先生(信州大学)
 信州の老舗醸造蔵から分離された蔵付乳酸菌の特性と
 産業展開を目指して
- <u>2024年度</u>(図3)
 - 於:京都府京都市,参加者 53 名 (うち学生 19 名) https://jslab-nyusankin.jp/conference/special/ special-2024/
- 森浩二先生(製品評価技術基盤機構)
 培養する意味って何だろう
- ●小田巻俊孝先生(森永乳業㈱)
 培養技術と情報解析で、プロ・プレバイオティクスの
 謎に迫る
- 表彰事業(年次大会における乳酸菌・腸内細菌分類・ 培養専門委員会奨励賞の若手研究者への授与)

2022 年度および 2023 年度に開催された乳酸菌学会大 会において,若手優秀発表賞に分類・培養部門を設け, 分類・培養に関する優れた研究発表をした若手研究者・ 学生に奨励賞を授与しました(図4).

<u>2022 年度大会</u>(オンライン)

https://jslab-nyusankin.jp/conference/annual/2022_03/ ●丹野広貴さん(東京農業大学)

ヒト腸内酪酸産生菌 *Faecalibacterium prausnitzii* 類縁 菌における 16S rRNA 遺伝子の多様性と新規分類マー カーの提案

2023年度大会(於: 関西大学)

https://jslab-nyusankin.jp/conference/annual/2023_03/



図4 日本乳酸菌学会2023年度大会にて若手優秀発表 賞分類・培養部門に小澤芳里さんが選出された. 右から3人目は、片倉啓雄前・会長

 小澤芳里さん(東京農業大学) クマバチに分布する新種の乳酸菌群で構成される腸内 菌叢の解析

5. 総括

公益財団法人発酵研究所 2022 年度学会・研究部会助 成を受けた事業遂行により,日本乳酸菌学会内において 分類・培養および関連技術に関する研究および情報発信 が極めて効果的に行われました.また,設置した専門委 員会によるセミナーイベントの共催により,普段は埋も れがちな分類・培養に関するトピックを扱う機会が飛躍 的に増え,学会員の分類・培養に対する重要性の再認識 につながりました.特に,分類・培養分野にフォーカス して研究助成および共催セミナー開催を行ったことによ り,研究や発表に携わった研究者のみならず,学会員全 体からの注目が分類・培養研究分野に集まりました.こ れにより,分類・培養に関する具体的な知識や技術を学 会員と共有することができ,今後の乳酸菌・腸内細菌研 究を発展させるための礎になると考えています.

なお,335,030円の残額が生じましたので,事業報告 完了後,速やかに返却させていただきます.

最後に,乳酸菌および腸内細菌の研究分野において, 分類・培養の重要性を再認識する貴重な機会を頂戴した 貴財団に,学会員を代表してあらためて厚くお礼を申し 上げます.

発酵研究所助成研究報告集 第38号【非壳品】 2024年12月10日 印刷 2024年12月20日 発行 編集委員長 左子芳彦 編集委員 石井正治,清水 昌, 矢口貴志 吉村 徹 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

