



日本農芸化学会 2019年度 関東支部例会

農芸化学奨励賞およびトピック賞受賞講演

## 講演要旨集

\*トピックス賞のご講演につきましては、次ページのプログラムにお名前を掲載した方がご発表になる予定です（ご発表者が本大会時と異なる場合があります）。なお、本プログラムにはご発表者のみを掲載しました。詳細は要旨をご覧ください。

2019年 12月 7日 (土)

東京農業大学 1号館 142教室

主催 公益社団法人 日本農芸化学会 関東支部

## 日本農芸化学会 2019 年度 関東支部例会プログラム

9:55 開会

<2019 年度農芸化学奨励賞 4 件>

10:00 笠井 大輔 (長岡技術科学大学) 2019 年度農芸化学奨励賞

細菌の酸素添加酵素が関わる代謝系の解析と物質変換技術への応用

10:25 高妻 篤史 (東京薬科大学) 2019 年度農芸化学奨励賞

電気活性細菌のエネルギー代謝と電流生成を制御する分子機構の解明

10:50 鈴木 道生 (東京大学) 2019 年度農芸化学奨励賞

バイオミネラル化を制御する有機基質の構造と機能に関する研究

11:15 渡辺 智 (東京農業大学) 2019 年度農芸化学奨励賞

シアノバクテリアから見出された増殖機構・環境適応機構の可塑性と有用物質生産への展開

11:40-12:40 昼休憩

<トピックス賞受賞 13 件>

12:40 加藤 由悟 (東京大学)

乳酸菌を模倣した金ナノ粒子合成手法の開発

13:00 永久保 利紀 (筑波大学)

環状イミン構造を有する  $\beta$ -カルボリンアルカロイド分解酵素の発見

13:20 佐藤 優太 (東京大学)

タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構

13:40 大池 秀明 (農研機構)

高脂肪食の時間制限給餌による SAM マウスの聴覚老化の遅延

14:00-14:10 休憩

14:10 陶山 達矢 (山崎製パン)

食後血糖値の予測を目的とした食品の試験管内糖化速度測定法 (GR 法) の開発

14:30 田中 一己 (慶應義塾大学)

米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は腸内細菌叢由来トリプトファン代謝物質がもたらす

14:50 永井 俊匡 (高崎健康福祉大学)

ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響

15:10 久知良 桃花 (筑波大学)

空間的・代謝的な相互作用を介した細菌と真菌の新たな相利共生戦略

15:30-15:40 休憩

15:40 安井 瑞稀 (筑波大学)

米麴におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析

16:00 鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ、理化学研究所)

ユーグレナ油脂生産における硫黄に関する副次的反応の解明

16:20 石毛 和也 (ヤマサ醤油)

Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立

16:40 長田 和樹 (東京理科大学)

神経性疼痛物質オピオイドの腸管免疫における炎症抑制作用

17:00 六川智博 (東京農業大学)

ドーパミン D1/5 受容体による cAMP 情報伝達経路活性化を介した海馬依存性記憶制御

17:25 閉会

18:00 懇親会@レストラン egg (事前の懇親会参加登録と参加費振込をお願いします)



## 細菌の酸素添加酵素が関わる代謝系の解析と物質変換技術への応用

長岡技術科学大学 技学研究院 生物機能工学専攻 笠井 大輔

## はじめに

人類は工業の発展に伴い、有機溶媒などの有用な化学物質を活用してきた。しかし、それらの環境中への漏出による汚染は、地球規模で早急に取り組むべき課題の一つとなっている。加えて、近年の世界的経済成長による資源需要の拡大は、環境汚染のみに留まらず資源枯渇といった問題も生み出した。これらの問題を解決するために、微生物の機能を利用した環境浄化やバイオリファイナリーなどの有用物質生産技術の確立に注目が寄せられている。加えて、将来的に増大が予想される廃棄物に対して、従来の燃焼や埋立てによる処理を微生物処理に代替することができれば、温室効果ガスの増加や熱源となるエネルギーや埋立地の確保といった懸念を払拭できると期待される。

我々は、上記の課題を解決するため、環境浄化や有用物質生産に利用できる微生物機能の開発を目指して、ユニークな物質変換能を持つ環境微生物を発掘し、それらの遺伝子や酵素機能の分子レベルでの解明に取り組んできた。特に、土壌細菌による好氣的条件下での物質代謝において重要な働きを担う酸素添加酵素（オキシゲナーゼ）が関わる代謝経路に着目し、それらの機能と発現制御機構を解明してきた。このオキシゲナーゼは、基質に分子状酸素を添加することで炭素間の結合を切断する酵素であり、多様な細菌に存在している。これまでに筆者らは、それらオキシゲナーゼが植物や化石資源由来の難分解性芳香族化合物の芳香環開裂や植物由来の高分子化合物の低分子化に関与することを明らかにした。

## 1. 未利用資源の有効活用を目指して

未利用資源の有効利用法の開発を目指した研究開発では、樹木などの植物に含まれるリグニン由来の難分解性芳香族化合物をターゲットとして、その分解菌 *Sphingobium* sp. SYK-6株が持つ芳香環開裂ジオキシゲナーゼの解析を行った。特に、シリングル型リグニン由来のシリング酸の代謝に関わる遺伝子の単離と機能解析を行い、シリング酸代謝への関与が示唆されていたプロトカテク酸4,5-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*ligAB*) 以外に2つの新規芳香環開裂酵素遺伝子、*desZ* および *desB* の関与を明確にした。これら3種類の遺伝子産物の酵素学的性質と遺伝子破壊株の解析を行い、これらの芳香環開裂酵素系が関与する多様なシリング酸代謝経路を世界に先駆けて明らかにした<sup>1)</sup>。加えて、本代謝経路の中間体が生分解性ポリマーの原料となることが見出され、未利用のリグニン由来化合物の有効利用法の確立に貢献する成果を得た。

## 2. 環境浄化への利用を目指して

難分解性の環境汚染物質の浄化系開発を目指して、オキシゲナーゼが主要な働きを担うポリ塩化ビフェニル (PCB) やフタル酸類の代謝系を明らかにした。特に、強力な PCB 分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA 1株のビフェニル/PCB分解には、

複数のオキシゲナーゼ遺伝子を含む5つのオペロン (*bph* オペロン) が関与する。そして、これらオペロンの転写には、センサタンパク質 (BphS) とレスポンスレギュレーター (BphT) で構成される二成分制御系が必須であることを明らかにした。加えて、これらの転写がグルコースによるカタボライト抑制を受けることを発見した。さらに、各オペロンの転写開始点上流に BphT との結合に関与すると想像される 24塩基の共通配列を見だし、芳香族代謝遺伝子群の転写制御機構の解明に貢献する成果を得た。最近、*bph* オペロンにコードされるオキシゲナーゼが揮発性有機化合物である塩素化エチレンの脱塩素化に関与することが示された。各オペロンの転写が塩素化エチレン代謝時に誘導されたことから、BphST二成分制御系が塩素化エチレンにも応答することが示唆された。これまでの成果は、汚染物質の分解に有用な *bph* 遺伝子群の効率的発現に必要な基礎的知見と位置付けられ、PCB や塩素化エチレン類の浄化能力の向上をもたらす分子育種に寄与すると期待される。

## 3. 産業廃棄物処理法の革新を目指して

次に、微生物酵素を利用した産業廃棄物の処理技術開発に関する研究について、これまでの取り組みを紹介する。ポリ *cis*-1,4-イソプレンを主成分とする天然ゴムや合成ゴムは、産業界で幅広く利用されている上、近年の世界的な経済成長に伴い需要が拡大している。将来的に増大すると考えられるゴムの廃棄物は、現状では燃焼や埋立てにより処理されていることから、それらの廃棄物からの有価物生産に期待が寄せられている。本研究では、ゴム廃棄物からの有価物生産を目指して、ゴム分解酵素を持つ分解菌の探索を行い、複数のゴム分解菌を単離した。天然ゴムを唯一の炭素源として生育するグラム陰性菌 *Rhizobacter gummiphilus* NS21<sup>1</sup>株は、2種のゴム分解遺伝子 (*latA1* および *latA2*) を有する<sup>2)</sup>。これらがコードするオキシゲナーゼは、細胞外でゴムのイソプレン鎖に酸素を添加し炭素間を切断することで、末端にアルデヒド基とケト基を持つイソ

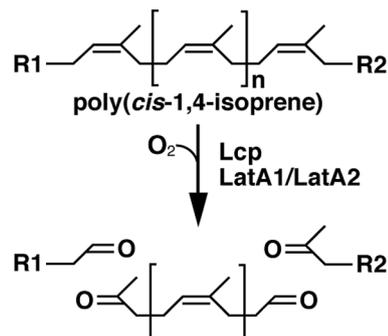


図1. 天然ゴムのポリ *cis*-1,4-イソプレン構造とゴム分解オキシゲナーゼ (LatA1/A2 および Lcp) によるゴムの低分子化。

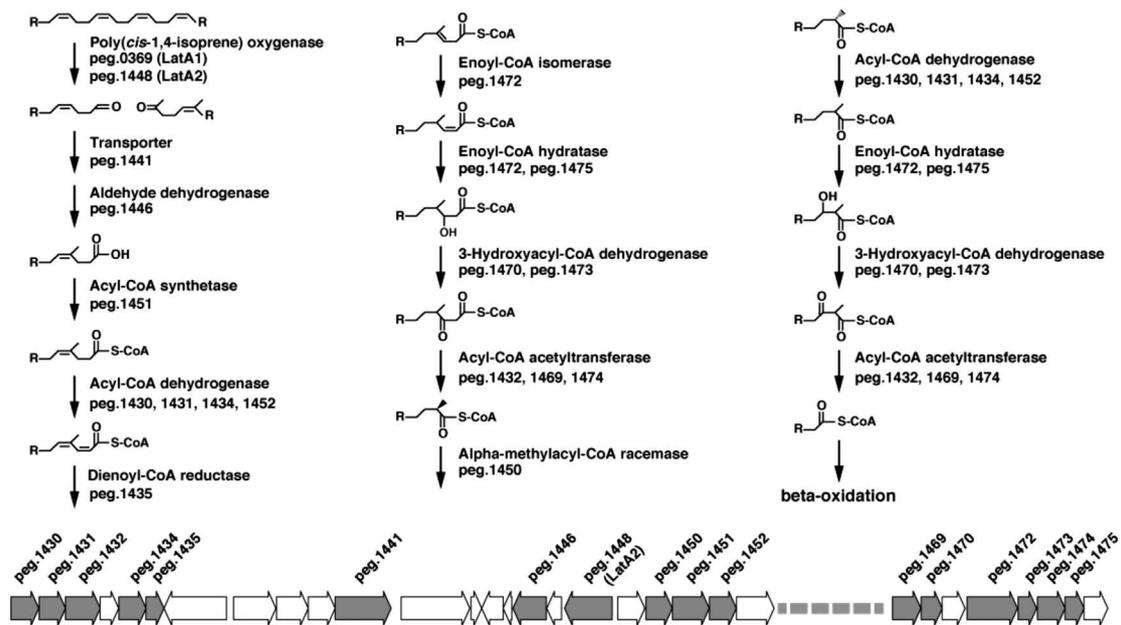


図2. *R. gummiphilus* NS21<sup>T</sup>株で推定されたゴム分解経路と分解遺伝子群。

プレノイド（ゴム低分子化イソプレノイド）へと低分子化する（図1）。また、ゲノム配列を利用した *in silico* 解析と網羅的転写解析により、NS21<sup>T</sup>株のゴム低分子化イソプレノイドの細胞内での代謝に関わる遺伝子群を特定した（図2）。

一方で、グラム陽性ゴム分解菌である *Nocardia* sp. NVL3株のゴム分解にはゴム分解酵素をコードする *lcp* 遺伝子が必須であることが示された<sup>3)</sup>。本酵素は、NS21<sup>T</sup>株の酵素と同様に細胞外でイソプレノ鎖に酸素を添加するオキシゲナーゼであり、ゴムの低分子化に関与する（図1）。しかし、アミノ酸配列の相同性は持たず、LatA1/2とLcpは進化的に全く異なる酵素であると想像された。

LatA1/2やLcpの反応で得られるゴム低分子化イソプレノイドは、反応性に富むテレケリックな構造を有しており、他のポリマー原料とのブレンド（アロイ化）することで新たな用途開発に応用できると期待されている。つまり、本研究で得たゴム分解オキシゲナーゼを利用したゴム廃棄物の処理システムを構築できれば、有価物生産を可能とする廃棄物処理の革新に繋がると期待される。

#### おわりに

これまでに筆者らは、微生物が有するオキシゲナーゼの機能解析を通して様々な代謝系の解明を行ってきた。環境負荷の低減を目指した環境対応技術を開発するために、微生物酵素を利用した環境浄化系や物質生産系の構築に期待が寄せられている。特に現在は、微生物機能を利用した廃棄物からの有価物回収技術の確立を目指して、微生物酵素系の機能解析に取り組んでいる。自然環境中には、未知の機能を持つ未解明微生物がまだ多く存在しているはずであり、そこには無限の可能性が眠っていると見える。それらの機能を解明することは、我々が持つ既存技術の革新と持続可能な社会の実現に大きく貢献すると期待されることから、今後も微生物が持つ有用機能の探索に邁進していきたいと考えている。

#### (引用文献)

- 1) Kasai, D., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y., Fukuda, M. *J. Bacteriol.* 187(15): 5067-5074, 2005.

- 2) Kasai, D., Imai, S., Asano, S., Tabata, M., Iijima, S., Kamimura, N., Masai, E., Fukuda, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(3), 614-620, 2017.
- 3) Linh, D.V., Huong, N.L., Tabata, M., Imai, S., Iijima, S., Kasai, D., Anh, T.K., Fukuda, M. *J. Biosci. Bioeng.* 123(4), 412-418, 2017.

謝辞 本研究は、主に長岡技術科学大学・生物機能工学専攻・環境微生物工学研究室にて行われたものです。本研究を行う機会を与えて頂き、学部時代から一貫してご指導、ご鞭撻を賜りました長岡技術科学大学 名誉教授 福田雅夫先生（現・中部大学・応用生物学部 教授）に深甚なる感謝の意を表します。学生時代より共同研究者として、貴重なご意見・ご助言を賜りました東北学院大学・大学院工学研究科 教授 宮内啓介先生に厚く御礼申し上げます。また、立体構造解析に関しては高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所 教授 千田俊哉先生と旭川工業高等専門学校・物質科学工学科 准教授 杉本敬祐先生との共同研究により行われました。両先生ならびご協力頂きました共同研究者の方々に心より御礼申し上げます。そして、新しい研究分野に挑戦する機会を提供頂くとともに、有益なご助言を賜りました長岡技術科学大学・物質材料工学専攻教授 河原成元先生、ハノイ工科大学 准教授 To Kim Anh先生、同准教授 Nguyen Lan Huong先生、チュラロンコン大学 准教授 Alisa S. Vangnai先生に深く感謝申し上げます。ドイツ留学時代は、ヴェストファーレンヴィルヘルム大学・応用分子微生物学研究所 教授 Alexander Steinbüchel先生のご指導のもと、様々な経験を積むことができました。Steinbüchel先生をはじめ、研究室のメンバーに深く御礼申し上げます。お名前を挙げつくせませんが、学生時代から研究の基礎についてご指導賜りました長岡技術科学大学・生物機能工学専攻の諸先生方、本研究に関して多大なご支援賜りました当研究室の多くの卒業生、在学学生、研究補助員の方々に改めて感謝の意を表します。最後に、学生時代より温かいご指導を頂戴し、そして本奨励賞にご推薦下さいました長岡技術科学大学・生物機能工学専攻教授 政井英司先生に心から感謝申し上げます。

電気活性細菌のエネルギー代謝と電流生成を制御する分子機構の解明



東京薬科大学生命科学部 高妻 篤史

はじめに

近年、電極と電子のやり取りが可能な微生物（電気活性細菌；electroactive bacteria; 以下EAB）が発見され、大きな注目を集めている。EABはその特異な代謝形態から学術的な興味の対象であるとともに、微生物燃料電池（EABによって有機物等の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置）や、微生物電気合成（電極からEABに電子を与え、二酸化炭素等の単純な物質から有用物質を合成するプロセス）等のバイオ電気化学プロセスへの応用が期待されている。これらのプロセスはEABのエネルギー代謝に基づくものであるため、その代謝活性を適切に制御し、できるだけ高い状態で保つことが重要となる。しかしEABの生理学的性質には未解明の部分が多く、その電気的な活性を維持することが難しいことが課題となっている。

我々はEABの代謝活性と電流生産を制御するための分子生物学的基盤を確立することを目的とし、*Shewanella oneidensis* MR-1株の電気活性に関与する新規因子（遺伝子）の探索・同定、および電流生成を制御する分子機構に関する研究を行ってきた。本講演ではその成果の概要を紹介する。

1. 電極との相互作用に関与する新規因子の同定

*S. oneidensis* MR-1株はEABのモデル生物として世界的に最もよく研究されている菌株であり、細胞内有機基質の酸化酵素（Dld等）と細胞外電子伝達系酵素（CymA および MtrCAB）を介して、基質の分解により生じた電子を電極に伝達することが知られている（図1）。しかし、MR-1株においても電流生成を制限する因子は十分に解明されていなかった。そこで我々はMR-1株において電流生成に関与する遺伝子を探索するため、本株のランダムトランスポゾン挿入ライブラリーを電気化学リアクター内で集積し、野生株よりも高い電流を生成する変異株を単離・解析した。興味深いことに、単離された高電流生成株

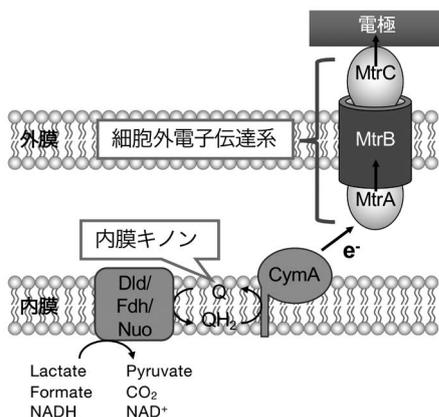


図1. *S. oneidensis* MR-1株の電流生成経路

の多くは細胞表層多糖等の欠損により電極に対して高い付着性を示すようになっており、EABの電流生成において“電極表面に対するバイオフィーム形成能力”が極めて重要であることが明らかになった<sup>1,2,3)</sup>。この結果はEABの細胞表層と電極の界面における電子移動が電流生成を律速していることを示唆しており、バイオ電気化学プロセスのエンジニアリングにおいて重要な知見であると思われる。

2. 電流生成に関与する遺伝子の発現制御機構の解明

MR-1株は乳酸を好んで資化し、乳酸脱水素酵素（Dld）による乳酸の酸化によって生じた電子を細胞外電子伝達系タンパク質（MtrCAB）によって菌体外に放出し、呼吸を行う（図1）。我々はこれらのタンパク質をコードする遺伝子（電流生成遺伝子群）の発現制御機構を解析し、これらの遺伝子の転写がCRP（cyclic AMP receptor protein）により包括的に活性化されることを明らかにした（図2）<sup>4,5)</sup>。Dldは内膜キノン依存性の乳酸脱水素酵素であり、細胞内の基質を酸化して内膜の呼吸鎖電子伝達系に電子を供給する役割を果たすため、NADH脱水素酵素（呼吸鎖複合体I）と同様、呼吸鎖の一部とみなすことができる（図1）。CRPが*mtrCAB*遺伝子に加えて*dld*の発現制御も担うことは、呼吸鎖の包括的な制御が*Shewanella*の生存において有利に働くことを示唆している。

バクテリアのCRPは主に大腸菌において糖代謝のカタボライト抑制に関連して研究されてきたが、CRPは糖代謝能を持たない細菌にも多く保存されており、その生理機能には未知の部分が多い。一方、本研究ではMR-1株においてCRPが異化代謝系を包括的に制御するグローバル転写因子として働くことを明らかにした。この発見は環境細菌の生理・生態を理解する上で重要な成果であると考えられる。

3. 電極電位に対する代謝応答機構の解明

*Shewanella*をはじめEABは酸化還元状態の変化が激しい環境に生息しているため、環境中の酸化還元電位を認識する機構はEABの生存と深く関わっていると考えられる。しかし、EABは細胞外の固体電子受容体（金属酸化物・電極等）を利用

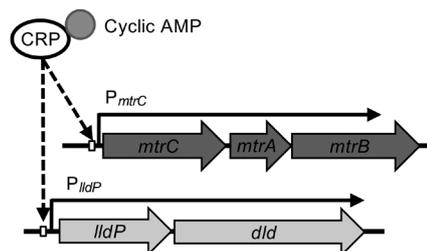


図2. CRPによる細胞外電子伝達系遺伝子（*mtrCAB*）および乳酸脱水素酵素遺伝子（*dld*）の発現制御。 *lldP*: 推定乳酸パーミアーゼ遺伝子

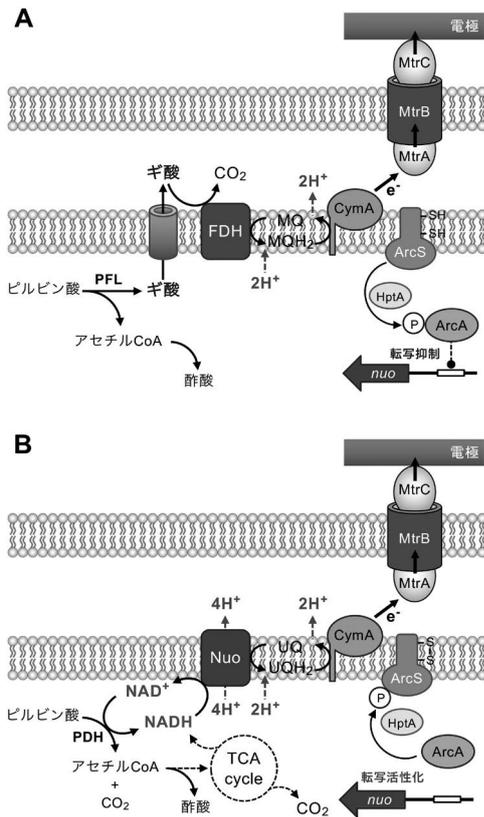


図3. MR-1株における低電位時(A)と高電位時(B)のピルビン酸代謝経路。電極電位が低い場合には、MR-1株はピルビン酸ギ酸リアーゼ(PFL)とギ酸脱水素酵素(FDH)を用いてピルビン酸を酸化分解し、電流を生成する(A)。一方、電極電位が高くなると、Arc systemによってNADH脱水素酵素遺伝子(*nuo*)の発現が誘導され、ピルビン酸脱水素酵素(PDH)とNuoを用いてピルビン酸を分解するようになる(B)。Nuoはプロトンポンプ活性を持つため、高電位時の経路(B)は低電位時の経路(A)に比べ、1電子あたりに汲み出されるプロトン量( $H^+/e^-$ 比)が多くなる。MQ, 酸化型メナキノン; MQH<sub>2</sub>, 還元型メナキノン; UQ, 酸化型ユビキノリン; UQH<sub>2</sub>, 還元型ユビキノリン

できるものの、これらの物質の電位を感知する能力を持つかどうかは不明であった。そこで我々は電極電位がMR-1株の代謝挙動と遺伝子発現変化に与える影響を詳細に解析した。その結果、本株は低電位(0 V vs. SHE)と高電位(+0.5 V)時において異なる異化代謝経路を用いること、またその制御にArc system(内膜キノンの酸化還元状態を認識する制御系)が関与することを明らかにした<sup>6)</sup>。電極電位が変化すると、細胞外電子伝達系を介して内膜キノンの酸化還元バランスが変化する。本研究により、MR-1株はこの変化をArc systemによって感知し、電位が低い場合にはエネルギー効率( $H^+/e^-$ 比)が低い代謝経路(ギ酸依存経路)を用いるが、電位が高い場合には $H^+/e^-$ 比が高い経路(NADH依存経路)を利用することが示された(図3)。これらの結果はEABが細胞外の電位を認識する能力を持ち、これにより酸化還元環境の変化に柔軟に適應していることを示している。電位認識は細胞外電子伝達系と電気的につながったArc systemによって行われるため、*Shewanella*の細胞外電子伝達系は単に電子排出経路としてだけでなく、外部環境を認識するためのセンサーの一部として機能しているとも考えられる。

おわりに

本研究により、EABの電流生成(異化代謝に起因する電極への電子伝達)にこれまで知られていなかった生物学的因子(細胞外多糖類、転写制御因子等)が関与することが明らかになった。また、MR-1株が電極電位を感知し、異化代謝系を切り替える機構を持つことが示された。これらの成果はEABの育種や代謝制御において有用な知見であると考えられる。

EABには、細胞内の異化代謝系(エネルギー代謝に関与する一連の酸化還元反応)と電極(電位)が細胞外電子伝達系を介して連動するという特性がある。すなわち、電極によって細胞内の酸化還元状態と、それに関連する代謝反応を直接的に制御することが可能である。この特性と本研究で明らかにした*Shewanella*の電位認識機構を応用すれば、電極によって微生物の遺伝子発現と代謝を任意に制御する技術を創出できる可能性がある。今後は本研究の成果を進展させ、EABを利用した有用バイオプロセスの開発に取り組んでいきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Kouzuma A *et al.* 2010. Disruption of the putative cell surface polysaccharide biosynthesis gene SO3177 in *Shewanella oneidensis* MR-1 enhances adhesion to electrodes and current generation in microbial fuel cells. *Appl Environ Microbiol* 76: 4151-4157.
- 2) Tajima N *et al.* 2011. Selection of *Shewanella oneidensis* MR-1 gene-knockout mutants that adapt to an electrode-respiring condition. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 2229-2233.
- 3) Kouzuma A *et al.* 2014. Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiol* 14: 190.
- 4) Kasai T *et al.* 2015. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol* 15: 68.
- 5) Kasai T *et al.* 2017. CRP regulates D-lactate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Front Microbiol* 8: 869.
- 6) Hirose A *et al.* 2018. Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat Commun* 9: 1083.

謝辞 本研究は、科学技術振興機構ERATO橋本光エネルギー変換システムプロジェクトおよび東京薬科大学生命科学研究部生命エネルギー工学研究室で行われたものです。本研究に携わる機会を与えていただき、多くのご指導、ご鞭撻を賜りましたERATO研究統括・橋本和仁先生(現物質・材料研究機構理事)に深く感謝申し上げます。東京薬科大学教授・渡邊一哉先生には、ERATOプロジェクトから今日に至るまで日々懇切なご指導とご支援を賜り、本奨励賞にご推薦下さいましたことを心より感謝申し上げます。また、学生時代にご指導いただき、卒業後も親身なご支援をいただきました東京大学教授・野尻秀昭先生と産業技術総合研究所・羽部浩先生に深謝いたします。本研究の成果は、多くの共同研究者の先生方と研究室の修了生、在学学生、研究補助員の方々のご支援とご尽力によるものです。笠井拓哉博士(現名古屋大学助教)、廣瀬篤弥氏をはじめ、ここに全ての方のお名前を挙げることはできませんが、皆様に深く感謝申し上げます。

## バイオミネラリゼーションを制御する有機基質の構造と機能に関する研究



東京大学大学院農学生命科学研究科 鈴木道生

## はじめに

生物が金属などの無機元素を濃集し、固体として沈着させる現象をバイオミネラリゼーションと呼ぶ。バイオミネラリゼーションは単細胞生物から植物、動物に至るまで、あらゆる生物に見られる普遍的な現象である。その中で、地球上で最もバイオマスが多いバイオミネラルは、炭酸カルシウムである。カルシウムイオンは海水中に大量に存在し、炭酸イオンと強く静電相互作用して容易に沈殿物を作るので、沈殿物である炭酸カルシウムは生体において、外敵からの防御のための硬組織、重力の感知、ミネラルの貯蔵など様々な用途に用いられている。炭酸カルシウム形成の化学反応は、カルシウムイオンと炭酸イオンの結合という単なる静電相互作用であり、共有結合とは異なり電子のやり取りも生じない非常に単純なものである(図1A)。実際には、この一つの炭酸カルシウム分子から分子同士が重合していき、高分子の炭酸カルシウム結晶へと成長していく。炭酸カルシウム分子から炭酸カルシウム結晶への結晶成長において、どのような原子配置のものが、どのような条件で形成され、どのような形態や方位になるということは鉱物結晶学の分野で大変よく研究されており、一見すると新たに研究する余地は何もないかと思われる。しかし、バイオミネラルにおける結晶成長では、鉱物結晶学でよく研究されている低過飽和条件で無機的な環境での古典的な結晶成長モデルと全く異なり、高過飽和条件で多くの有機分子が共存する環境で反応が進行する。このような非古典的な結晶成長において合成されたバイオミネラルは、古典的な条件では形成されないような特異的な方位、形態、多形、欠陥密度、結晶子サイズなどを示すことが多く、これらがどのように制御されて形成されるのか多くのことが全く未解明である。このようなバイオミネラリゼーションの反応において、有機分子がどのような役割を果たすのか明らかにすることを目標に取り組んできた研究のいくつかを紹介する。

## 1. アコヤガイ貝殻の有機基質の研究

真珠の養殖技術は日本発祥であり、1900年前後に世界で初めてアコヤガイを用いて確立されたため、真珠の研究は日本が最も盛んである。アコヤガイ貝殻は炭酸カルシウムと有機物から構成されるが、貝殻の内側の真珠層、外側の稜柱層、蝶番部の靱帯と複数の石灰化された微細構造から成り立っている。

## 1-1. 真珠層形成に関与する新規基質タンパク質

真珠は貝殻の内層に存在する真珠層と同じ微細構造を有している。真珠層の微細構造は、キチンとタンパク質を含有する有機薄膜に挟まれた、厚さが300-400 nm程度の扁平状の炭酸カルシウム結晶が積層した構造である(図1B)。このような微細構造に光が入射すると、光の干渉作用により特定の光が強め合ったり、弱め合ったりすることで虹色の真珠光沢が見えるのである。また、炭酸カルシウム結晶にはいくつかの結晶多形が

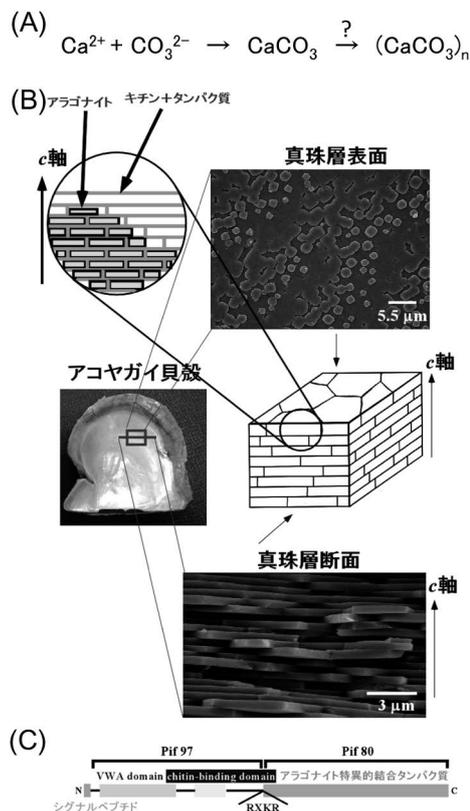


図1. (A) 炭酸カルシウムの沈着反応  
(B) 真珠層の微細構造模式図  
(C) Pifの構造模式図

存在し、最安定なのがカルサイト、準安定なのがアラゴナイト、不安定なのがヴァテライトである。真珠層は準安定なアラゴナイトでできており、準安定なアラゴナイトを扁平状に配置させるようなメカニズムは不明であった。そこで合成した炭酸カルシウムのカルサイトとアラゴナイトに対し結合実験を行うことで、真珠層の抽出液からアラゴナイトに特異的に結合するタンパク質成分を見出した。このタンパク質は既知のものとは相同性を持たない新規のタンパク質であることが判明したため、Pifと命名した。Pifは前半にVWAドメインとキチン結合ドメインを有し、後半のアラゴナイト結合部位に解離性のアミノ酸を合計で60%も含む配列を有していた。これまでの先行研究から、酸性のアミノ酸が重合したタンパク質成分が非古典的な炭酸カルシウムの結晶成長に重要であると提唱されていたが、実際に真珠層から酸性のアミノ酸が多く含まれるタンパク質を同定したのは本成果が初めてであった。また、RNAiによるノックダウン実験やPifタンパク質を用いた*in vitro*での炭酸カルシウム結晶形成実験の結果から、Pifは真珠層の有機薄膜を形成しアラゴナイトの成長方向を制御して扁平状の形態を作り出す役割があることが示唆された。

## 1-2. その他の貝殻構造の基質タンパク質に関する研究

アコヤガイの貝殻外層には太さが30–60  $\mu\text{m}$ 程度の柱状のカルサイトが厚い有機膜に覆われたハチの巣状の構造を有している。この有機膜にも新規のタンパク質prismalin-14が含まれることを明らかにした。Prismalin-14はキチンと炭酸カルシウムを仲介しバイオミネラルの構造を強固にする役割を持つことが示唆された。また、稜柱層内のカルサイト結晶に含まれる有機物ナノファイバーの形成にキチン分解酵素が働くことを示した。キチン分解酵素が高密度に存在するとキチンの水素結合による凝集を阻害し、分散化することで、有機物ナノファイバーがカルサイト結晶に多数入り込み、カルサイト内に高密度の欠陥を生じさせ、劈開を防ぐことで貝殻の強度を増している可能性を示した。

アコヤガイは二枚貝であるため蝶番部に靱帯と呼ばれる繊維状の構造を持つ組織が存在する。特に50–100 nm程度の非常に細い繊維状のアラゴナイトファイバーが圧力に強い構造を作り出すと考えられている。靱帯のアラゴナイトファイバーの内部から新規の酸性ペプチドであるLICPを見出した。LICPは10アミノ酸から成り、特にアラゴナイト結晶のc軸の成長を抑制することで、細いアラゴナイトの形態を維持していると考えられた。さらに靱帯のアラゴナイトファイバーの外側に存在する有機膜からはMMP (matrix metalloproteinase) の阻害剤であるTIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) が存在することが示された。ノックダウン実験および*in vitro*での炭酸カルシウム結晶形成実験の結果から、MMPとTIMPの働きにより、アラゴナイトファイバー間の有機膜の繊維形成が調整される可能性が示された。

## 2. その他のバイオミネラルゼーションに関する研究

特殊な貝類としてスケーリーフットと呼ばれる鉄の鱗を貝殻および足に付加する生物が知られている(図2A)。特に黄鉄鉱( $\text{FeS}_2$ )のナノ粒子を作ることから、鉄鉱物をナノ化する有機分子を体内に含むことが示唆されていた。黄鉄鉱ナノ粒子は性能が高く安価で環境に優しいことから、太陽光発電や蓄電池の材料として期待されている。スケーリーフットから黄鉄鉱のナノ粒子を含む成分を抽出したところ、特定の有機分子が含まれることを見出した。その有機分子を用いて*in vitro*の系で黄鉄鉱ナノ粒子を合成したところ、非常に粒径の揃った安定性のある黄鉄鉱ナノ粒子を合成することに成功した。

上記のように金属ナノ粒子は様々な分野で応用されており、金属ナノ粒子のサイズ、形態、化学形態などを制御し、機能性のナノ粒子を安価に安全に合成する手法の開発が求められている。そこで生物の持つ潜在的なバイオミネラルゼーション反応機構を利用して、環境負荷の小さい新たな手法を見出すことを試みている。乳酸菌を用いて金ナノ粒子を効率的に合成できる手法を確立し、金酸イオンの還元と金の分散化に重要な因子として糖脂質(DGDG, diglycosyldiacylglycerol)を見出した(図2B)。DGDGの持つ不飽和脂肪酸のアリル位からラジカルが生成され、金イオン(III)に1電子を供与し、金イオン(II)が生成される。金イオン(II)は不安定であることから、不均化反応により金イオン(III)と金イオン(I)が生成される。金イオン(I)が同様に還元されることで金が生成すると考えられる。生成された金はラジカル重合したDGDGが分散剤となって表面

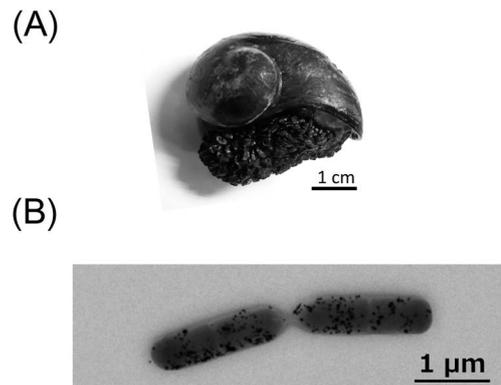


図2. (A) スケーリーフットの貝殻および鱗 (B) 乳酸菌により合成した金ナノ粒子

に結合することで、分散化しナノ粒子となるというメカニズムが示唆された。これまでも微生物を用いて金属ナノ粒子を合成したという報告は数多いが、具体的に反応に関与する分子を明らかにした研究は少なく、乳酸菌では本研究が初めての報告である。

### おわりに

これまでの自身の研究においてもバイオミネラルゼーションに関する有機分子は、新規なもの、報告の無い未知の反応ばかりであり、手掛かりが少なく研究の進め方に苦労する一方で、誰も知らない人類未踏の領域を探検しているような気分が味わえる。いつかこの人類未踏の領域で宝を掘り当て、人類社会の発展に貢献できるような成果が出ることを期待している。

謝辞 本研究は主に東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻、東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻およびワイツマン科学研究所(イスラエル)において実施されたものです。特に東京大学名誉教授である長澤寛道先生には、学生の頃より多くのご指導、ご支援を賜りました。心より御礼申し上げます。東京大学大学院理学系研究科教授である小暮敏博先生には鉱物学を基礎から教えて頂き、多くの勉強をさせて頂きました。ワイツマン科学研究所教授であるStephen Weiner先生とLia Addadi先生にはバイオミネラルゼーションの神髄とも言える幅広い知識をご教授頂きました。東京大学大学院農学生命科学研究科准教授(現帝京大学教授)である作田庄平先生には研究を継続する機会を与えて頂いたのみならず、多くのご助言と温かい励ましを頂戴しました。東京大学名誉教授(現放送大学教授)である吉村悦郎先生には分析化学、無機化学的視点から研究を進めるための指導を頂きました。先生方との出会いが一つでも欠けておりましたら、現在の自分は無かったと確信しており、ご指導頂いたことに深く感謝申し上げます。また、本研究は尾崎紀昭博士、村山英未博士、井上宏隆博士、猿渡和子博士、木村麻里子氏、鈴木愛氏、奥村大河博士、中山誠志氏、三木匠氏、米澤舞氏、近都浩之博士、菊池郁也氏、松浦晃宙氏、松田大輝氏、加藤由悟氏、窪田一輝氏、山下達也氏をはじめ、ここに書ききれない多くの共同研究者ならびに研究室のメンバー、卒業生の皆さまのご協力によって成り立っています。この場を借りて厚く御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・浅見忠男先生(東京大学大学院農学生命科学研究科教授)に厚く御礼申し上げます。



東京農薬大学生命科学部 渡辺 智

## シアノバクテリアから見出された増殖機構・環境適応機構の可塑性と有用物質生産への展開

### はじめに

原核藻類シアノバクテリアは多様な環境に生息し、太古の昔から地球環境を支えてきた。光合成の仕組みを最初に生み出した生物であり、葉緑体と共通の祖先をもつと考えられている。これまで大腸菌、枯草菌などのモデル微生物を用いた研究からDNA複製や転写、翻訳などの普遍的な生命現象が示された。一方、シアノバクテリアは細胞あたり複数コピーの染色体を有し、ゲノム構造や遺伝子の構成もモデル微生物とは異なっている。モデル微生物とは生き様の異なるシアノバクテリアが固有の細胞機能を備えていることは想像できるが、その詳細は不明であった。著者らはシアノバクテリアが可塑的なゲノム複製、分裂制御を有すること、様々なストレスに対して柔軟に応答するための環境適応機構を備えていることを明らかにした。またシアノバクテリアゲノム工学のための基盤技術を構築すると共に、シアノバクテリアを宿主とした有用物質生産系の構築に取り組んできた。これまでの研究概要を下記に示す。

### 1. シアノバクテリアのDNA複製と細胞増殖に関する研究

#### 1-1. DNA複製の光依存性

シアノバクテリアにおける染色体コピー数の測定系、DNA複製活性の評価系を構築し、DNA複製に対する光や光化学系阻害剤の効果を解析した。その結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 (S. 7942) は細胞あたり2-8コピーの染色体を有すること、DNA複製は光に完全に依存し、光化学系電子伝達系の活性化がDNA複製に必要であることが示された(1, 2)。

#### 1-2. DNA複製開始点と複製様式

大腸菌や枯草菌のゲノムにおいて複製開始点 $ori$ および終結点 $ter$ はゲノムのGC skewから推定が可能であり $ori/ter$ はGの割合が高い領域と低い領域の境界に存在する。一方、淡水性シアノバクテリアのゲノムはG/Cの偏りが少ない特異なGC skewを示し $ori/ter$ の推定は困難である(図1)。著者らは新規合成DNAをNGSにより定量的解析するRepli-seq法によりシアノバクテリアにおいて初めて $ori$ の位置、複製様式を同定し

た。また新規合成DNAを顕微鏡観察し、複数コピー染色体の複製が染色体間で非同調的に起こることを発見した(1)。

#### 1-3. ゲノムの細胞内分布・分配制御

Fluorescence *in situ* hybridization法によりS. 7942の複数染色体が細胞長軸に沿って均等に分布することを明らかにした(図2)。またプラスミドの分配を制御するParAタンパク質のホモログを欠損すると染色体分布異常やDNA損傷ストレスに対し感受性を示すことがわかった。ParAは、染色体分配を司るSMCやその構造的ホモログと相互作用することから、これらの因子と協調しながら細胞内の染色体分布に寄与すると考えられる(3)。

#### 1-4. ゲノムコピー数の制御

大腸菌では定常期の細胞を新鮮な培地に移植するとDNA複製と細胞分裂が同期する。一方、S. 7942で同様の処理を行った場合では最初の分裂前にマルチラウンドの染色体複製が起こり、その後の複製は細胞分裂と同期しなかった。つまりシアノバクテリアの複製-分裂間の共役は厳密に制御されておらず、可塑的であることが示された(図3)(4)。

#### 1-5. DNA複製の開始制御

DNA複製開始因子DnaAは大腸菌、枯草菌において必須であるのに対し*Synechocystis* sp. PCC 6803 (S. 6803) や糸状性シアノバクテリア*Anabaena* sp. PCC 7120 (A. 7120) は $dnaA$ を欠損しても顕著な表現型を示さない。一方、S. 7942において $dnaA$ 完全欠損株を取得し、そのゲノムを解析すると、 $dnaA$ 欠損株は内在性プラスミドpANLが染色体中へと挿入され、pANL挿入部位より複製が開始された。つまりS. 7942において $dnaA$ は必須であり、染色体の複製はプラスミドの複製機構によって代替できることがわかった(5)。S. 6803やA. 7120の $dnaA$ 非依存型複製についてさらに研究を進めている。

### 2. シアノバクテリアの環境応答に関する研究

#### 2-1. 孤立二成分制御系シグナル伝達機構(TCS)のパートナーシップ

大腸菌、枯草菌において環境応答センサーであるヒスチジン

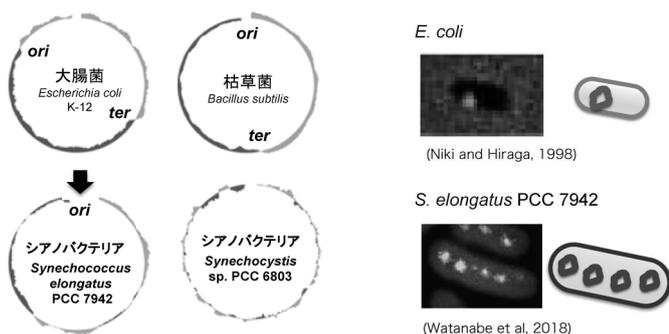


図1. GC skew の比較

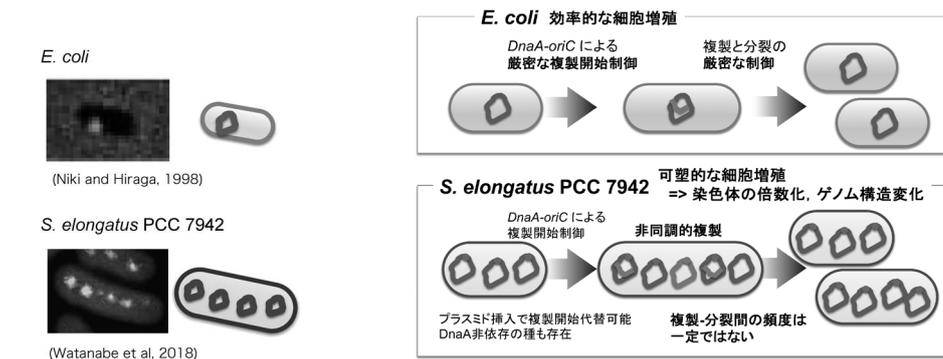


図2. 染色体 $ori$ 領域の細胞内分布

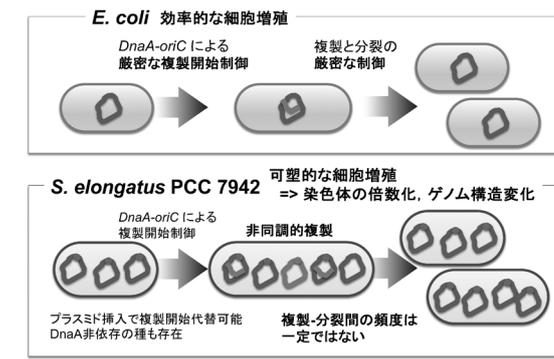


図3. シアノバクテリアに見出された可塑的な細胞増殖機構

キナーゼ (Hik) とレスポンスレギュレーター (Rre) はゲノム中でオペロン形成しておりパートナーを容易に推定できる。一方、シアノバクテリアではオペロンを形成する Hik-Rre が少なく、孤立した TCS が多いことがわかった。孤立 TCS についてタンパク質間相互作用解析とリン酸基転移解析を行い、新規パートナーを多数同定した。また複数の Rre と相互作用を示す Hik や多段階リン酸リレーの可能性を示した (6)。

### 2-2. 熱ショックタンパク質 (HSP) の特異的機能の解析

HSP70/DnaK, HSP40/DnaJ はバクテリアにおいて主要な HSP であり、ストレスから細胞を保護する働きを持つ。ゲノム解析からシアノバクテリアは全ての種において複数コピーの DnaK, DnaJ を持つことが示された。個々の機能解析やタンパク質間相互作用解析より、シアノバクテリアは熱や強光ストレス耐性だけでなく、光合成タンパク質の発現制御にも DnaK, DnaJ を利用することが明らかになった (7)。また真核生物において多様な役割をもつ一方、原核生物での機能が未知であった HSP90/HtpG について解析した結果、HtpG は変性タンパク質のリフォールディングに寄与するだけでなく、代謝酵素と直接相互作用してヘムの代謝調節に関わることも示された (8)。

### 3. シアノバクテリアを用いたゲノム工学技術構築と物質生産研究

#### 3-1. シアノバクテリアゲノム工学技術の構築

複数コピー染色体を持つシアノバクテリアは遺伝子改変に手間と時間を要し、複雑なゲノム改変は困難である。この問題を解決するために、枯草菌ゲノム上で予め遺伝子改変を構築する新規ゲノム改変システムを構築し、シアノバクテリアゲノム改変の迅速化、大規模化に成功した。

#### 3-2. シアノバクテリアによる物質生産研究

培地コストが低く植物よりも生育の早いシアノバクテリアは物質生産のホストとして有望である。物質生産のモデルケースとして医薬品や香料の原料となるベンゼン系化合物 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) に着目し、S. 7942 を用いて DOI 生産系を確立した (9)。現在、植物や藻類由来の高付加価値物質を生産するシアノバクテリアの分子育種に取り組んでいる。

#### おわりに

細胞内の酸化還元バランスが攪乱されると、有害な活性酸素種 (ROS) が発生する。ROS が発生しやすい細胞内環境をもつ光合成生物は ROS に対する防御機構を備える必要がある。大腸菌、枯草菌が高度に洗練された細胞増殖を行う一方、シアノバクテリアは DNA 複製開始や複製-分裂間の制御を可塑化することで染色体数を増やし、さらに孤立 TCS や HSP の機能多様化により細胞内外からのストレスに対する幅広い環境適応能力、頑強性を獲得したと考えられる。これら増殖機構・環境適応機構の可塑性は葉緑体にも見出される特徴であり、植物細胞の共生進化の歴史を紐解く上でも重要な発見である。

光から有機物を安価に生産できるシアノバクテリアは有用物質生産における究極のホストと言っても過言ではない。エネルギーの枯渇や、温暖化など地球レベルでの問題が深刻化する中で、これからシアノバクテリアが果たす役割は大きい。今後、シアノバクテリアの基礎と応用を両輪とした研究を進めることで、シアノバクテリアの産業利用の促進に貢献したい。

#### (引用文献)

1) Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y,

Chibazakura T, Yoshikawa H. Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Mol. Microbiol.*, Vol. 83, p 856-865, (2012)

- 2) Ohbayashi R, Watanabe S, Kanesaki Y, Narikawa R, Chibazakura T, Ikeuchi M, Yoshikawa H. DNA replication depends on photosynthetic electron transport in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 344, p 138-144, (2013)
- 3) Watanabe S, Noda A, Ohbayashi R, Uchioko K, Kurihara A, Nakatake S, Morioka S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H. ParA-like protein influences the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology*, Vol. 164, 1, p 45-56, (2018)
- 4) Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Chibazakura T, Soga T, and Yoshikawa H. Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in cyanobacteria. *PLoS One*, Vol. 10, e0136800, (2015)
- 5) Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, and Yoshikawa H. Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. *ISME J.*, Vol. 10, p 1113-1121, (2016)
- 6) Kato H, Watanabe S, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Tozawa Y, and Yoshikawa H. Exploration of a possible partnership among orphan two-component system proteins in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, p 1484-1491, (2012)
- 7) Watanabe S, Sato M, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Yoshikawa H. Protection of *psbA* transcript from ribonuclease degradation *in vitro* by DnaK2 and DnaJ2 chaperones of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 71, p 279-282, (2007)
- 8) Watanabe S, Kobayashi T, Saito M, Sato M, Nimura-Matsune K, Chibazakura T, Taketani S, Nakamoto H, Yoshikawa H. Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 352, p 36-41, (2007)
- 9) Watanabe S, Ozawa H, Kato H, Nimura-Matsune K, Hirayama T, Kudo F, Eguchi T, Kakinuma K, Yoshikawa H. Carbon-free production of 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol. 82, 1, p 161-165, (2018)

謝辞 本研究は、東京農業大学生命科学部 (旧応用生物科学部) バイオサイエンス学科にて行われたものです。学生の頃から今日に至るまで、終始ご指導を賜りました東京農業大学名誉教授 吉川博文先生、同大学教授 千葉櫻拓先生、同大学 荷村 (松根) かおり先生、武蔵野大学教授 門多真理子先生に心から感謝申し上げます。また東京工業大学教授 田中寛先生、Freiburg大学教授 Wolfgang R. Hess 先生には、本研究を進展させるにあたり、公私に渡り親身にご支援いただきましたことを深く感謝いたします。日頃より温かいお言葉とご助言をいただきました立教大学名誉教授 河村富士夫先生、慶應義塾大学教授 板谷光泰先生、東京農業大学教授 朝井計先生に厚く御礼申し上げます。多くの共同研究者の先生方より貴重なご意見・ご助言を賜りました。全ての方のお名前を挙げることはできませんが、心から御礼申し上げます。本研究の成果は、東京農業大学バイオサイエンス学科、細胞ゲノム生物学研究室 (旧微生物分子遺伝学研究室) の修了生、在学生の皆様のご尽力、ご支援によるものです。皆様には改めて感謝の意を表します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・浅見忠男先生 (東京大学大学院農学生命科学研究科教授) に厚く御礼申し上げます。

講演番号：1D8a08

講演日時：3月24日 10:27～ 1号館 D8会場

乳酸菌を模倣した金ナノ粒子合成手法の開発

Development of gold nanoparticle synthesis method mimicking *Lactobacillus casei*

○加藤 由悟<sup>1</sup>、菊池 郁也<sup>1</sup>、吉村 悦郎<sup>1,2</sup>、鈴木 道生<sup>1</sup> (1東大院農、<sup>2</sup>放送大教養)

○Yugo KATO<sup>1</sup>, Fumiya KIKUCHI<sup>1</sup>, Etsuro YOSHIMURA<sup>1,2</sup>, Michio SUZUKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>UTokyo, <sup>2</sup>OUJ)

金ナノ粒子とは1 nm から100 nm の大きさの金属の結晶であり、特異的な光学特性を有し、医療や工学の分野で数多く利用されている。現在用いられている化学的手法は環境への負荷が懸念されており、微生物を用いた生産方法が注目されている。金ナノ粒子の合成には金イオンを還元する還元剤と、粒子間の凝集を抑える分散剤が必要である。本研究では乳酸菌 *Lactobacillus casei* ATCC393 株 (以下、乳酸菌) を用いて金ナノ粒子を生成し、その還元剤および分散剤の探索を行うことにより、微生物における金ナノ粒子生成機構の解明を目指している。

乳酸菌の懸濁液にテトラクロリド金(III)酸カリウムを加えることで金ナノ粒子が合成された。低温電子顕微鏡による観察から、金ナノ粒子は細胞膜表面近傍で合成されており、細胞膜成分と菌体外に放出している成分 (菌体外成分) に着目して分析を行った。

まず、乳酸菌の脂質を TLC により分離して還元に関与する脂質を抽出し、質量分析を行った結果、乳酸菌の細胞膜に含まれる糖脂質であるジグリコシルジアシルグリセロール (DGDG) がナノ粒子の生成に関与していることが判明した。分離・精製した DGDG により、*in vitro* での金ナノ粒子の生成を試みたところ、金ナノ粒子を合成することに成功したことから、DGDG は金ナノ粒子の合成において還元剤及び分散剤として大きな役割を果たすことが確認できた。

次に乳酸菌の菌体外成分に金酸溶液を加えたところ、粒子径の小さな金ナノ粒子が合成されたため菌体外成分が優秀な分散剤として機能することが分かった。合成された金ナノ粒子を走査型電子顕微鏡によって観察したところ、金ナノ粒子の周りが繊維状の有機物質に覆われており、この繊維状の物質が金ナノ粒子合成において分散剤として寄与していると考え、成分の解析を行った。アミドカラムを用いた液体クロマトグラフィにより分離した菌体外成分のうち、金ナノ粒子合成活性画分を<sup>1</sup>H-NMR および質量分析装置を用いて分析したところ、lacto-*N*-triose と乳酸が金ナノ粒子合成に活性を持つことを突き止めた。

Lacto-*N*-triose と乳酸および DGDG の混合溶液に金酸を添加したところ、乳酸菌が作る金ナノ粒子と同じサイズのコロイドの合成に成功したことから、これらの成分が協調して乳酸菌の中で金ナノ粒子が生成されるというメカニズムを初めて明らかにした。

様々な微生物を用いた金属ナノ粒子の合成手法の報告があるが、原因物質や合成機構はほとんど解明されていない。本研究は微生物を活用した効率的なナノ粒子合成手法開発につながる発見である。

*Lactobacillus casei*, gold nanoparticles, biomineralization

発表責任者：鈴木道生 (amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

講演番号：3E2a11

講演日時：3月26日 11:10～ 1号館 E2 会場

環状イミン構造を有する $\beta$ -カルボリンアルカロイド分解酵素の発見

Discovery of the  $\beta$ -carboline alkaloid-degrading enzyme

永久保 利紀<sup>1</sup>、○熊野 匠人<sup>1</sup>、太田 雄大<sup>2</sup>、橋本 義輝<sup>1</sup>、小林 達彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境、<sup>2</sup>山陽小野田市立山口東京理科大学・工学部)

Toshiki Nagakubo<sup>1</sup>, ○Takuto Kumano<sup>1</sup>, Takehiro Ota<sup>2</sup>, Yoshiteru Hashimoto<sup>1</sup>, Michihiko Kobayashi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Sanyo-Onoda City University)

### 【背景・目的】

$\beta$ -カルボリンは、トリプタミンに由来する化合物であり、インドールアルカロイドに分類される。 $\beta$ -カルボリン骨格を有する化合物は自然界に普遍的に存在しており、その多くが顕著な生理活性を示す。例えば、 $\beta$ -カルボリン骨格を有する比較的単純な構造のアルカロイドの一種であるハルマリンは、ヒトを含む動植物に広く見出されており、モノアミンオキシダーゼの活性を阻害し向精神作用を示すことから、古来より世界各地で幻覚剤の成分として用いられてきた。しかしながら、自然界におけるその普遍性にもかかわらず、ハルマリンを含む $\beta$ -カルボリンアルカロイドの微生物による代謝経路は全く解明されておらず、また、 $\beta$ -カルボリンの部分構造である環状イミンの分解代謝も全生物を通じて分かっていない。そこで本研究では、ハルマリンを代謝する微生物を土壌からスクリーニングし、本代謝経路の解明および代謝酵素の取得と機能解析を目的とした。

### 【方法・結果】

ハルマリンは、蔓性植物 *Peganum harmala* の根および種子に特に多く含まれている。そこで、この植物の根付近の土壌より、ハルマリン代謝微生物の単離を試みた。具体的には、ハルマリンを単一炭素源または窒素源とする最少培地に上記の土壌を接種し、28°Cで数日間振盪培養した。その後、新しい培地への植継ぎを繰り返して集積培養を行い、同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、菌の単離を行った。その内、1株を選抜し、大量培養後、超音波処理により無細胞抽出液を調製し、各種クロマトグラフィーを用いて、ハルマリン代謝酵素を SDS-PAGE 上で単一になるまで精製した。N 末端部分アミノ酸配列を解析した結果、本酵素は銅含有アミノキシダーゼと相同性を示すことが判明した。本酵素は活性中心に 2,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニルキノン (TPQ) を有し、ハルマリンの環状イミン構造を酸化的に開裂した。本発表では本酵素の諸性質 (酵素動力学定数など) および反応機構について考察する。本研究では、自然界に広くみられる環状イミン構造を開裂する酵素を初めて同定するとともに、細菌からヒトに至るまで、ほぼ全ての生物が有する銅含有アミノキシダーゼの新規酵素活性を明らかにした。

(本成果は現在、*Nature communications* に投稿中)

cyclic imine, copper amine oxidase, harmaline

講演番号：3E2p11

講演日時：3月26日 16:00～ 1号館 E2 会場

タマネギ由来催涙因子合成酵素の触媒機構

### Catalytic Mechanism of Onion Lachrymatory Factor Synthase

○佐藤 優太<sup>1</sup>、荒川 孝俊<sup>1,2</sup>、高辺 潤平<sup>1</sup>、青柳 守紘<sup>3</sup>、加藤 雅博<sup>3</sup>、鴨井 享宏<sup>3</sup>、正村 典也<sup>3</sup>、柘植 信昭<sup>3</sup>、今井 真介<sup>3</sup>、伏信 進矢<sup>1,2</sup> (1東大院・農生科・応生工、<sup>2</sup>東大微生物連携機構、<sup>3</sup>ハウス食品・中央研究所)

○Yuta SATO<sup>1</sup>, Takatoshi ARAKAWA<sup>1,2</sup>, Jumpei TAKABE<sup>1</sup>, Morihiko AOYAGI<sup>3</sup>, Masahiro KATO<sup>3</sup>, Takahiro KAMOI<sup>3</sup>, Noriya MASAMURA<sup>3</sup>, Nobuaki TSUGE<sup>3</sup>, Shinsuke IMAI<sup>3</sup>, Shinya FUSHINOBU<sup>1,2</sup> (1Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, 2CRIIM, UTokyo, 3Central R&D. Inst., House Foods Group Inc.)

【背景】催涙因子合成酵素 LFS は、タマネギの催涙因子 *syn*-プロパンチアール *S*-オキシド(PTSO) を合成する反応を触媒する。タマネギの細胞に存在するシステイン誘導体イソアリインは、細胞が損傷を受けると 1-プロペンスルフェン酸(PSA)へと分解される。PSA は非酵素的に直ちに縮合する短命な化合物だが、LFS 存在下では一部が分子内水素転位により PTSO に変換され大気中へ飛散し催涙効果を発揮する。LFS は、スルフェン酸やチアール *S*-オキシドという珍しい含硫官能基の反応を触媒することでタマネギの硫黄代謝経路に関わる、興味深い酵素である。しかし、LFS は既知タンパク質と明確な相同性を持たず基質・生成物も不安定なため、その触媒機構は明らかになっていない。本研究では、結晶構造解析と構造情報を元にした機能解析を行い LFS 触媒機構の解明を目指した。

【方法】大腸菌で異種発現したタマネギ LFS を Ni アフィニティおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィによって精製した。PSA のアナログ分子であるクロチルアルコールと精製 LFS を共結晶化し、X 線回折実験によって複合体構造を決定した。また、野生型と同様に発現・精製した変異体 LFS を用い、酵素反応によって生成する PTSO 量を HPLC で測定した。アラニン変異体の PTSO 合成量を野生型と比較することで触媒反応に重要な残基を特定し、さらに側鎖の似たアミノ酸への変異体と比較することで残基の役割を推定した。

【結果】1.8 Å の分解能で LFS とクロチルアルコールの複合体構造を決定した。LFS 分子中央にあるポケット内に、PTSO に似た配向をとったクロチルアルコールの電子密度が観測された。クロチルアルコールはグルタミン酸と 2 つのチロシンの側鎖によって安定化されており、特にグルタミン酸残基は水素が転位する炭素とも近い位置に存在していた。これらの残基のアラニン変異体は活性が 1%未満に低下し、触媒反応への大きな関与が示唆された。更なる変異体の活性測定により触媒反応における役割を推定し、「LFS はグルタミン酸とチロシン側鎖による水素結合で PSA の配向を PTSO に似たものに強く限定し、グルタミン酸側鎖を中継した水素転位を促すことで PTSO を合成する」という、触媒機構を提唱した。

【展望】ネギ属植物の硫黄代謝物は様々な生理活性を持つ。中には抗酸化作用などヒトの健康に役立つ活性もあり、近年注目を集めている。本研究により二次代謝初期におけるタマネギ硫黄化合物の挙動が明らかとなったことで、健康効果の期待される硫黄化合物について、より詳細な生成過程やヒトが摂取した際の動態の理解、潜在的な健康効果の最大化につながると考えられる。

Crystal structure, Organosulfur compound, Plant enzyme

発表責任者：佐藤優太 (sato-yuta463@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)

講演番号：1B1a05

講演日時：3月24日 09:44～ 1号館 B1会場

高脂肪食の時間制限給餌による SAM マウスの聴覚老化の遅延

Time-restricted feeding of a high-fat diet delayed age related hearing loss in senescence-accelerated mouse

○大池 秀明、薊 佳代（農研機構／食品研）

○Hideaki OIKE, Kayo AZAMI (NARO/FRI)

高脂肪食の長期摂取は、ヒトやマウスにおいて肥満を引き起こし、さらに継続すると、メタボリックシンドロームに行きついてしまう。しかしながら、これまでの時間栄養学研究から、マウスの活動期のみで食餌を制限する時間制限給餌は、高脂肪食において、肥満の誘導を小さくすることが知られている。一方で、これを長期間続けた場合にどうなるかは報告がなく、健康状態が維持できるのか、それとも、不健康な状態に陥ってしまうのかは不明である。

ここでは、高脂肪食のエネルギー効率の良さに着目し、暗期の時間制限給餌を長期間に渡って実施した場合、マウスの老化がどのように影響されるのかを検討することを目的とした。

試験動物として、メスの老化促進マウス（SAMP8 系統）を利用し、高脂肪食および普通食について、それぞれ自由摂食群と暗期 12 時間の時間制限給餌群を設定し、2 ヶ月齢から 1 年齢まで飼育を行っている。

高脂肪食群は、普通食群と比較して体重が有意に増加し、既存の報告とは異なり、最初の 2 ヶ月程度は自由摂食群においても時間制限給餌群においても、同等の肥満（体重増加）度であった。しかし、3 ヶ月目あたりから徐々に体重差が出始め、時間制限給餌群の方が体重増加の伸びが抑制されている。

また、老化の指標として、3, 6, 9(もしくは 10) ヶ月齢の時点で、尾懸垂試験、ロータロッド試験、聴力等について評価を行った。聴力に関しては、加齢依存的に閾値が低下し、加齢性難聴の進行が認められ、高脂肪食、および、時間制限給餌の影響で若干ではあるが、有意に老化が遅延された。尾懸垂、ロータロッドについては、加齢によるスコアの低下が起きていないことから、今後、さらに飼育を続けて解析する。

（本研究はロッテ財団による研究助成を受けて実施されたものです）

aging, circadian, clock

発表責任者：大池秀明 (oike@affrc.go.jp)

講演番号：3B1a12

講演日時：3月26日 11:21～ 1号館 B1会場

食後血糖値の予測を目的とした食品の試験管内糖化速度測定法（GR法）の開発

Development of an in vitro method to measure the glucose releasing rates of foods and meals (GR method) aimed to predict postprandial glycemic response

○陶山 達矢<sup>1</sup>、橋本 和彦<sup>1</sup>、村上 隆之<sup>1</sup>、西川 佳子<sup>2</sup>、阿部 準<sup>2</sup>、中西 由季子<sup>3</sup>、佐々木 一<sup>4</sup>、木村 修一<sup>5</sup> (1山崎製パン(株)中央研究所、<sup>2</sup>一般財団法人日本食品分析センター栄養科学部生化学分析課、<sup>3</sup>人間総合科学大学人間科学部、<sup>4</sup>神奈川工科大学栄養生命科学科、<sup>5</sup>NPO 法人国際生命科学研究機構 (ILSI Japan) )

○TATSUYA SUYAMA<sup>1</sup>, KAZUHIKO HASHIMOTO<sup>1</sup>, TAKAYUKI MURAKAMI<sup>1</sup>, KEIKO NISHIKAWA<sup>2</sup>, JUN ABE<sup>2</sup>, YUKIKO NAKANISHI<sup>3</sup>, HAJIME SASAKI<sup>4</sup>, SHUICHI KIMURA<sup>5</sup> (1Yamazaki Baking Co.,Ltd., <sup>2</sup>Japan Food Research Laboratories, <sup>3</sup>University of human arts and sciences, <sup>4</sup>Kanagawa institute of technology, <sup>5</sup>International life sciences institute Japan)

【背景および目的】食後高血糖は糖尿病などの生活習慣病や血管内皮細胞障害の進行を促すと報告されており、健康管理上重要な指標である。食後の血糖値を予測する手法として、ヒト試験による食品の血糖応答性（グリセミックインデックス、GI）測定が知られている（IS026642）。GI測定はヒトの生理的反応として測定できる反面、個人差などの測定誤差が大きく、採血による被験者へのストレスなど課題も多い。特定非営利活動法人国際生命科学研究機構（ILSI Japan）では新たな手法として、ヒト体内の物理的破碎および生化学的消化プロセスをモデル化し、試験管レベルで食品からの糖化速度を測定するGR（Glucose Releasing Rate）法の開発を進めており、各プロセスについて測定条件の最適化と分析法の妥当性確認を行った。

【方法】ヒトの消化吸收過程を①咀嚼：ミートグラインダーで破碎、②胃内消化：ペプシン溶液で反応、③膵液消化：パンクレアチン抽出液で反応、④腸内消化：ラット小腸アセトンパウダー抽出液で反応の4工程にモデル化した。糖化速度の測定には③膵液消化において反応初期（反応時間20分）と反応終点（反応時間16時間）で遊離したグルコース濃度を測定し、その比率を算出しGR値とした。食品の糖化に重要な③膵液消化について、パンクレアチンの最適pH測定および防腐剤の選定より、溶液条件の最適化を行った。また、分析法の妥当性確認として、検体にジャンプ大腸内視鏡専用検査食クリアスルーNC・夕食（チキンクリームシチュー、クラッカー）および、やわらかプリン計3品および、その混合品を用い、室内精度（n=4、4日間）および室間再現精度（n=4、4日間、3施設）の確認を行った。

【結果および考察】パンクレアチンの最適pHは7.0であり、③膵液消化の溶液条件は0.039Mリン酸三ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム溶液（pH7.0）とし、防腐剤には1%ソルビン酸カリウム溶液を使用することに決定した。その条件にて測定を行った結果、GR値はチキンクリームシチュー83、クラッカー61、やわらかプリン99、3品を混合した場合は77であった。3品のGR値を炭水化物量で加重平均すると77となりGR法では食事を構成する食品から食事のGR値を算出することができた。その他の食品についても測定を実施したところ、GR値はGIなど既知の食品の血糖応答性と相関のある結果が得られた。分析法の妥当性について、3品を混合した同一検体でのGR値の相対標準偏差を算出した結果、室内精度2.8%、室間再現精度6.0%とAOAC Int.ガイドラインの許容範囲内にあった。今後、10施設程度による室間共同試験を実施し、妥当性の検証を継続する予定である。

glucose releasing rate, postprandial glycemic response, GR method

発表責任者：陶山達矢 (tatsuya.suyama@yamazakipan.co.jp)

講演番号：3B5p06

講演日時：3月26日 14:55～ 1号館 B5会場

米ぬか由来繊維は腸内細菌叢の調節を介して大腸炎を抑制する

Rice bran-derived fibers ameliorate colonic inflammation via gut microbiota modulation and fermentation

○田中 一己<sup>1,2,3</sup>、アウ ワンピン<sup>1,2</sup>、鈴木 健大<sup>4</sup>、尾花 望<sup>8</sup>、楊 佳約<sup>1,2</sup>、木村 彰宏<sup>7</sup>、富田 勝<sup>1,2</sup>、福田 真嗣<sup>1,2,3,5,6,8</sup> (1慶大・先端生命研、2慶大・院・政策・メディア、3神奈川産技総研、4環境研・生態環境セ、5JST・さきがけ、6メタジェン、7国立国際医療研究センター、8筑波大学)

○Kazuki TANAKA<sup>1,2,3</sup>, Wanping Aw<sup>1,2</sup>, Kenta Suzuki<sup>4</sup>, Nozomu Obana<sup>8</sup>, Jiayue Yang<sup>1,2</sup>, Kimura Akihiro<sup>7</sup>, Msasaru Tomita<sup>1,2</sup>, Shinji Fukuda<sup>1,2,3,5,6,8</sup> (1Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., 2Grad. Sch. Media and Governance, 3KISTEC-KAST, 4NIES, 5JST PRESTO, 6Metabologenomics, Inc., 7NCGM, 8University of Tsukuba)

日本料理や、納豆や抹茶などの伝統的な食品の一部は健康促進効果が知られており、世界中から注目されている。これらの食品のいくつかは、腸内環境を改善するプレバイオティクスやプロバイオティクス効果として作用することが知られており、宿主の健康維持に寄与している。米の胚乳の外側にあたる米ぬかを摂取すると大腸炎が抑制されることが以前より報告されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。近年、日本を含む先進国では大腸炎患者数が増加しており、大腸がん発症にも繋がることから大腸炎予防法の確立が求められている。そこで本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液(DSS)誘導性大腸炎モデルマウスを用いて、米ぬか摂取による大腸炎抑制効果の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。8週齢の雄 C57BL/6 マウスへ米ぬかを与えたところ、濃度依存的に大腸炎が抑制されることを明らかにした。次世代シーケンサーを用いた便中細菌叢の網羅的解析から、*Clostridium* spp. が米ぬか摂取によって有意に増加することを明らかにした。また、大腸断面の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによって、*Clostridium* cluster XIVa が米ぬか由来食物繊維の近傍に局在していることも明らかにした。米ぬか成分を分画してマウスに投与したところ、食物繊維が含まれる画分を摂取したマウスで大腸炎が有意に抑制されることが明らかとなった。このことから、米ぬか由来成分の発酵代謝により産生される何らかの物質が大腸炎を抑制する可能性が示唆された。事実、米ぬか摂取マウスの便中細菌叢を無菌マウス腸内に移植させたところ、通常食摂取マウスの便中細菌叢を移植したマウスより DSS 誘導性大腸炎が軽減されたため、キャピラリー電気泳動-質量分析計を用いたメタボローム解析を実施した。その結果、米ぬか摂取マウス腸内において、トリプトファン代謝物質群が米ぬかの濃度依存的に増加することを明らかにした。さらに、Clostridiales 目細菌群だけを定着させたノトバイオームマウスの腸管では、トリプトファン代謝物質群の産生量が有意に多いことを見出した。トリプトファン代謝物質群の一部は芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介して大腸炎を抑制することが報告されていたことから、AhR 強制発現培養細胞株へ Clostridiales 目細菌群由来のトリプトファン代謝物質群を添加したところ、そのシグナル因子である *Cyp1a1* の発現が誘導されたことから、AhR リガンドとして機能することが明らかとなった (特願 2018-224169)。従って、米ぬか摂取による大腸炎抑制効果は、Clostridiales 目細菌群による発酵代謝により腸内で産生されたトリプトファン代謝物質群が、腸管上皮細胞の AhR を介してその恒常性維持に寄与していることが示唆された。本研究成果は、食を介した新たな大腸炎予防法の確立に繋がると考えられる。

rice bran, gut microbiota, metabolome

講演番号：3B4a11

講演日時：3月26日 11:10～ 1号館 B4会場

ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響

Effects of mastication on hippocampal gene expression and memory in juvenile rat

○宮口 一勢<sup>1</sup>、永井 俊匡<sup>2</sup>、斉藤 芳和<sup>1</sup>、安岡 颯人<sup>1,3</sup>、阿部 啓子<sup>1,3</sup>、朝倉 富子<sup>1</sup> (1東大院農生科、<sup>2</sup>高崎健大・栄養、<sup>3</sup>神奈川県立産業技術総合研究所)

○Hitonari MIYAGUCHI<sup>1</sup>, Toshitada NAGAI<sup>2</sup>, Yoshikazu SAITO<sup>1</sup>, Akihito YASUOKA<sup>1,3</sup>, Keiko ABE<sup>1,3</sup>, Tomiko ASAKURA<sup>1</sup> (1Univ. of Tokyo, 2Takasaki Univ. of Health and Welfare, 3Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】ヒトの幼若期においては、咀嚼が脳の血流量を増加させ脳機能の成長を促進することが知られている。また、成熟・老年期においては、記憶能力の維持に働くという報告がなされている。げっ歯類モデルを用いた研究では、咀嚼が海馬における神経細胞数の増加や空間記憶能力の向上をもたらすことが報告されている。以上のようなヒトやモデル動物における研究は成熟後に注目した知見が多く、幼若期ラットについての研究は少ない。さらに、行動学や現象論に基づく報告が多く、分子レベルでの解析例は少ない。本研究では、幼若期における咀嚼が記憶機能向上に与える効果とそのメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

【方法・結果】離乳直後(3週齢)のWistar系雄ラットに粉末(P)飼料餌あるいは固形(C)餌与え、8日間飼育した(P群とC群)。飼育期間中の体重は両群で有意差は見られなかった。飼育後に新奇物体認識試験とY字迷路試験を行ったところ、両試験共にC群において記憶能力が向上していることが示唆された。この原因を探るため、記憶を司る部位である海馬に注目した。海馬CA1領域のGolgi-Cox染色を行い、樹状突起の長さ、複雑さ、spine密度についての形態観察を行った。その結果、複雑さ、spine密度が固形飼料群で有意に増加していることが確認された。空間認知能力の向上と神経形態の発達は正の相関を示すことが知られている。そこで、神経形態が変化した原因を分子レベルで追求するために、DNAマイクロアレイによる海馬のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、P群、C群の間で有意に発現変動した遺伝子が合計746個抽出された(C>P:623, C<P:123)。樹状突起の複雑さに影響を与えることが知られているシグナル因子について調べたところ、RhoシグナルやCaMKIIシグナルに関連する遺伝子が有意に発現変動していた。以上のことから、離乳直後の幼若期に咀嚼刺激が入力されることで海馬CA1領域の樹状突起の複雑さが増し、そのことが空間記憶能力の向上につながっていることが示唆された。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, memory, hippocampus

発表責任者：宮口一勢 (issey5717@gmail.com)

講演番号：3C3a12

講演日時：3月26日 11:21～ 1号館 C3会場

空間的・代謝的な相互作用を介した細菌と真菌の新たな相利共生戦略

Bacterial-fungal mutualistic growth strategy via spatial and metabolic interactions

○久知良 桃花<sup>1</sup>、Gayan Abeysinghe<sup>1</sup>、梶尾 俊介<sup>2,3</sup>、萩原 大祐<sup>2,3</sup>、高谷 直樹<sup>2,3</sup>、野村 暢彦<sup>2,3</sup>、尾花 望<sup>3,4</sup>、竹下 典男<sup>2,3</sup> (1筑波大学大学院・生命環境科学研究科、2筑波大学・生命環境系、3筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター、4筑波大学・医学医療系・トランスボーダー医学研究センター)

○Momoka KUCHIRA<sup>1</sup>, Gayan ABEYSINGHE<sup>1</sup>, Shunsuke MASUO<sup>2,3</sup>, Daisuke HAGIWARA<sup>2,3</sup>, Naoki TAKAYA<sup>2,3</sup>, Nobuhiko NOMURA<sup>2,3</sup>, Nozomu OBANA<sup>3,4</sup>, Norio TAKESHITA<sup>2,3</sup> (1Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 2Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3MiCS, Univ. Tsukuba, 4Transborder Medical Research Center, Fac. of Medicine, Univ. Tsukuba)

健康・食糧・環境に深く関わっている微生物複合体の理解と制御のため、同種・異種の微生物間の相互作用についての研究が注目を集めている。しかし、環境中の主要な微生物である糸状菌と細菌の相互作用に関する知見は限定的である。本研究では、糸状菌及びグラム陽性細菌のモデル生物である *Aspergillus nidulans* と *Bacillus subtilis* との共培養を対象に、糸状菌と細菌の物理的・化学的な相互作用について解析を行った。

両者を共培養することにより、それぞれの生育様式・遺伝子発現に与える影響について解析した。糸状菌用の固体最少培地上で共培養を行い、蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、*B. subtilis* が *A. nidulans* の菌糸に沿って移動する様子が観察され、菌糸の伸長に伴って *B. subtilis* が存在空間を拡大していることが明らかとなった。*B. subtilis* のべん毛を欠損させた株を用いた実験では、そのような移動や増殖は観察されなかった。また、RNA-seq でのトランスクリプトーム解析により、共培養とそれぞれの単独培養における遺伝子発現を比較したところ、ビタミンの一種であるチアミンの生合成に関わる遺伝子群の発現が *B. subtilis* では上昇し、*A. nidulans* では低下していた。*A. nidulans* のチアミン合成欠損株 ( $\Delta thiA$ ) は、チアミンを含まない培地で著しい生育阻害を示すが、*B. subtilis* との共培養によって *A. nidulans*  $\Delta thiA$  の生育が回復した。*A. nidulans*  $\Delta thiA$  の生育阻害は *B. subtilis* のチアミン合成欠損株との共培養によっては回復しなかった。このことは、*B. subtilis* が *A. nidulans* にチアミンを供給することを示している。*A. nidulans*  $\Delta thiA$  の生育阻害は、*B. subtilis* べん毛欠損株との共培養によっても回復しなかった。

以上のことより、*B. subtilis* がべん毛を用いて *A. nidulans* の菌糸に沿って移動・増殖するという空間的相互作用と、*B. subtilis* が *A. nidulans* にチアミンを供給するという代謝的相互作用の両者によって、細菌・糸状菌複合体が生存空間と栄養を獲得するための新しい相利共生を生み出すことが明らかとなった。

bacterial-fungal interactions, mutualistic strategy, spatial niche and nutrient

講演番号：1C1p04

講演日時：3月24日 14:23～ 1号館 C1会場

米麴におけるコウジカビの破精込みの蛍光イメージング解析

Fluorescence imaging analysis of fungal mycelial growth in steamed rice

○安井 瑞稀<sup>1</sup>、高谷 直樹<sup>1</sup>、丸山 潤一<sup>2</sup>、竹下 典夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大生命環境、<sup>2</sup>東京大応生工)

○Mizuki YASUI<sup>1</sup>, Naoki TAKAYA<sup>1</sup>, Zyunnichi MARUYAMA<sup>2</sup>, Norio TAKESHITA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Dept. of Biotechnol, The Univ. of Tokyo)

古くから酒、味噌、醤油の製造に利用され、国菌に指定されている *Aspergillus oryzae*、別名コウジカビと呼ばれる菌がいる。麴とは穀類にカビを繁殖させたものをいう。特に米にコウジカビをはやしたものを米麴と呼び、清酒造りに必須である。米麴では米の表面に付着したコウジカビの胞子が菌糸を伸ばし、酵素による働きででんぷんを分解しながら米内部へ入っていく。このように蒸米に種付けされたコウジカビの胞子が発芽繁殖し、米の内部や表面で菌糸が白く見えるようにまで成長したこの現象は「破精」と呼ばれる。そして、米粒の中心部にコウジカビの菌糸が生育していく程度を「破精込み」という言葉で表す。破精込みには種類があり、米粒に対し深く破精込んだものを「総破精」、破精の廻っていない部分も残るものを「突き破精」、破精込みが浅い状態のものを「塗り破精」と呼ぶ。清酒醸造の現場において、杜氏は造りたい清酒の味に応じた麴造りを行っているほど、米麴へのコウジカビ菌糸の破精込みは清酒造りにおいて重要である。しかし、破精込みはコウジカビ(種)、米(品種・精米歩合)、水分、湿度、温度などによって変化するため制御が難しい。そこで本研究では *A. oryzae* の破精込みを検出し制御することを目的とし、蛍光イメージングを中心に解析を行っている。精米歩合50%または90%の酒米(山田錦)または食用米(千代錦)に、GFPで核を標識した *A. oryzae* を生育させて作製した米麴を用いて観察した。その結果、精米歩合90%より50%の米でより多く菌糸が米粒中心に破精込んでいる様子が観察された。さらに、米の細胞と細胞の間を菌糸が伸長していく様子も観察された。現在、SEMやX線CTによる検証と、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行っている。また、*A. oryzae* の性質を特徴付ける機構を明らかにするため、まず固体培地での核の動態を解析した。培養時間などにより菌糸内の核の数に大きなばらつきが見られた。一方、このようなばらつきは *A. oryzae* と同じ属のモデル生物 *A. nidulans* では見られなかった。現在、その原因を探索している。本研究において日本の伝統文化を最新のテクノロジーで解析することでその奥深さを明らかにし、更なる技術改良に貢献したいと考えている。

fluorescence imaging analysis, fungal mycelial growth, steamed rice

講演番号：1C1a10

講演日時：3月24日 10:49～ 1号館 C1 会場

ユーグレナ油脂生産における硫黄に関する副次的反応の解明

Characterization of sulfur-compound metabolism underlying wax-ester fermentation in *Euglena gracilis*

○山田 康嗣<sup>1,2</sup>、新多 智明<sup>1</sup>、阿閉 耕平<sup>1,2</sup>、城山 真恵加<sup>3</sup>、井上 小楨<sup>4</sup>、樋口 千恵子<sup>1</sup>、新田 伸子<sup>1</sup>、大城 聡<sup>5</sup>、持田 恵一<sup>2,4,6,7</sup>、岩田 修<sup>1,2</sup>、大津 巖<sup>1,3</sup>、鈴木 健吾<sup>1,2</sup> (1ユーグレナ、2理研 BTZ、3筑大、4理研 CSRS、5沖縄工専、6横市大、7岡大)

○Koji YAMADA<sup>1,2</sup>, Tomoaki NITTA<sup>1</sup>, Kohei ATSUJI<sup>1,2</sup>, Maeka SHIROYAMA<sup>3</sup>, Komaki INOUE<sup>4</sup>, Chieko HIGUCHI<sup>1</sup>, Nobuko NITTA<sup>1</sup>, Satoshi OSHIRO<sup>5</sup>, Keiichi MOCHIDA<sup>2,4,6,7</sup>, Osamu IWATA<sup>1,2</sup>, Iwao OHTSU<sup>1,3</sup>, Kengo SUZUKI<sup>1,2</sup> (1euglena, 2Riken BTZ, 3Tsukuba Univ., 4Riken CSRS, 5Okinawa Coll., 6Yokohama City Univ., 7Okayama Univ.)

ユーグレナは、淡水の湖沼、田んぼなどに生息するミドリムシという和名でもお馴染みの単細胞生物である。50種類以上が知られるユーグレナのうち、ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) は50年以上も前からモデル生物として使われており、その豊富な栄養素、及び細胞内に蓄積するβグルカンであるパラミロンの機能性から食品素材としての利用も検討されてきた。ユーグレナは独特な代謝経路を持っており、周囲に酸素がない条件において細胞内にワックスエステルを合成し油脂として蓄積することが知られ、この現象はワックスエステル発酵と呼ばれている。ワックスエステル発酵では、細胞内に蓄積したパラミロンを分解してエネルギーを獲得し、その反応において生成したピルビン酸をもとにして、最終的にワックスエステルが生成することが明らかになっている。このワックスエステルは、構成する脂肪酸の鎖長からバイオ燃料の原料として適しているとされ、ユーグレナはバイオ燃料生産にも利用が検討されている。

ユーグレナがワックスエステル発酵する条件下においては、同時に硫黄化合物の臭いがミドリムシから発生することが経験的に知られている。この臭いの発生は既知のワックスエステル発酵の反応系からは説明がされない現象であり、これまで深く追及されたことはなかった。本研究では、サルファーインデックス解析 (硫黄のメタボロミクス) を行うことにより、この臭い発生の原因について明らかにすることを試みた。その結果、ワックスエステル発酵時の培養液上清において、硫化水素が含まれていることが確認され、これがワックスエステル発酵における臭い発生の原因であることがわかった。さらに、細胞内に含まれる硫黄化合物量の変化を調べることで、ワックスエステルの生産に対応して、細胞内のシステインやメチオニンなどの含硫アミノ酸が増えていることが明らかとなり、同時にグルタチオンやタンパク質などの硫黄を含む化合物が減少していることがわかった。これらのことから、グルタチオンやタンパク質が分解されて、システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸が増えるという変化が細胞内で起こり、この含硫アミノ酸をエネルギー獲得のために分解した際に硫化水素が発生するという仕組みが新たに示唆された。

本研究では、ユーグレナのワックスエステル発酵にともなって起こる硫黄化合物に関係する副次的反応を明らかにした。これを知ることにより、ユーグレナを用いたワックスエステル生産における臭いの発生を抑制する技術の開発が可能となり、大規模にバイオ燃料生産する際の環境への臭い放出を予防するとともに、残渣の利用価値を高めることに役立つと期待される。

*Euglena gracilis*, wax ester, sulfur metabolomics

発表責任者：山田康嗣 (yamada@euglena.jp)

講演番号：3D7a15

講演日時：3月26日 11:54～ 1号館 D7 会場

### Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立

#### Practical enzymatic production of cyclic GMP-AMP

○吉田 晃、石毛 和也 (ヤマサ醤油・医薬化成品)

○Ko Yoshida, Kazuya Ishige (Yamasa Corp. Biochemicals div.)

【目的】環状ジヌクレオチドなどの STING リガンドは、樹状細胞などの抗原提示細胞に強く発現するアダプタータンパク質 STING に作用して自然免疫を強く惹起し、TLR リガンドである従来の核酸アジュバントと異なる新たなサブセットの核酸アジュバントとして注目されている。なかでも、GMP と AMP のヘテロ環状二量体である cyclic GMP-AMP (以下 cGAMP) は、がん免疫アジュバントとしての高い潜在能力が明らかとなり、次世代アジュバント候補として期待を集めている。しかしながら、cGAMP の実用的な合成法は開発されておらず、研究用試薬として著しく限定された量しか入手できないのが実情である。そこで、本研究では、cGAMP のワクチンアジュバントとしての開発に向けて、その量産化技術の確立を図った。

【方法と結果】報告者らは、代表的な cGAMP 合成酵素であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* 由来 DncV を取得し、当該酵素を用いて ATP/GTP からの cGAMP 合成特性を調べた。この結果、本酵素の cGAMP 合成活性は著しく低く、その効率的な合成には大幅な活性向上が必要であることが判明した。また、一般的に cGAMP 合成酵素は、副反応として他種の環状ジヌクレオチドである cyclic di-GMP や cyclic di-AMP を生成させることが知られていたが、DncV を用いた場合においても、cyclic di-GMP/-AMP が著量副生することが確認された。これらの他種環状ジヌクレオチドは、その物理化学的特性が cGAMP と酷似していることに起因して cGAMP との分離が難しく、これらが著量副生した場合、アジュバントとして求められる高純度な製品の取得が困難であることが判明した。従って、これらの他種環状ジヌクレオチドの合成段階での副生抑制が、cGAMP 量産化技術確立に向けた大きな課題であることが明らかとなった。そこで、報告者らは、まず、当該酵素へのランダム変異導入により cGAMP 合成活性が向上した変異酵素を網羅的に取得し、これらの変異を組み合わせることにより、当該酵素の活性を飛躍的に高めることに成功した。また、同様に、cyclic di-GMP/-AMP の副生が抑制された変異酵素を取得し、変異点の組み合わせを最適化することで、その副生を顕著に低減させることに成功した。さらに、当該機能改変 DncV に、AMP からの ATP 供給系、および、GMP からの GTP 供給系を共役させ、それらの活性バランスを最適化することで、cGAMP 合成反応の効率をさらに高めることに成功した。このようにして構築した cGAMP 酵素合成系に、結晶化による精製方法を組み合わせることにより、高純度な cGAMP の量産が可能となった。

cyclic GMP-AMP, vaccine adjuvant, STING ligand

発表責任者：石毛和也 (ishige-k@yamasa.com)

講演番号：3E3a09

講演日時：3月26日 10:38～ 1号館 E3 会場

神経性疼痛物質オピオイドの腸管免疫における炎症抑制作用

Anti-Immunoinflammatory effects of opioids in the gut immunity

○長田 和樹<sup>1</sup>、三浦 亮介<sup>1</sup>、長瀬 博<sup>2</sup>、八代 拓也<sup>1</sup>、西山 千春<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東理大基礎工、<sup>2</sup>筑波大 IIS)

○Kazuki Nagata<sup>1</sup>, Ryosuke Miura<sup>1</sup>, Hiroshi Nagase<sup>2</sup>, Takuya Yashiro<sup>1</sup>, Chiharu Nishiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. of Biol Sci and Tech, Tokyo Univ. of Sci, <sup>2</sup>IIS, Univ. of Tsukuba)

オピオイドとは麻薬性鎮痛薬に類似した精神作用を有する物質の総称で、麻薬として知られるモルヒネから、化学的に合成された鎮痛薬のフェンタニル、神経伝達物質であるエンドルフィンまで多種多様な物質が存在する。オピオイドは鎮痛、鎮静などの作用を示すため薬剤へ広く応用されており、その研究の焦点はオピオイドの受容体 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ の3種が強く発現している中枢神経系に当てられてきた。プラセボ効果として精神状態が末梢の炎症や免疫応答に影響を及ぼすことが知られているが、機構は不明である。加えて、近年、免疫細胞である樹状細胞やマクロファージにおいてもオピオイド受容体が検出され、 $\mu$ オピオイドであるモルヒネにより樹状細胞やマクロファージの機能が抑制されることが報告されている。しかし、 $\delta$ や $\kappa$ オピオイドが免疫細胞の機能や生体の免疫、炎症反応に及ぼす影響は不明である。本研究では、免疫細胞の炎症反応が病態に大きく寄与するマウス DSS 誘導性大腸炎モデルや *in vitro* 解析系を用いて、オピオイドによる免疫応答調節について明らかにすることを目指した。骨髄由来マクロファージ (BMDM) を作製し、オピオイド及びその受容体の発現レベルを調べた結果、特に $\delta$ 受容体発現が高いことが判明した。そこでオピオイド $\delta$ 受容体のアゴニストである KNT-127 をマウスに投与したところ、大腸炎による体重減少、下痢などの症状が改善し大腸の繊維化も抑制された。 $\delta$ 拮抗薬である NTI を事前投与すると症状改善が認められないことから、KNT-127 による大腸炎の病態改善がオピオイド $\delta$ 受容体を介した特異的な作用によることが判明した。血液脳関門を通過しないアゴニスト YNT-2715 を腹腔投与したマウスでも病態改善が認められたことから、 $\delta$ オピオイドが脳外の細胞に作用する可能性が示された。DSS 誘導性大腸炎は DSS により傷害された腸管上皮細胞から細菌が浸潤し腸管の免疫細胞が過剰な炎症反応を誘導することで発症する。その原因細胞の一つであるマクロファージは TLR を介して病原体の存在を感知することで種々の炎症性サイトカイン、ケモカインを分泌して炎症反応を促進する。そこでマクロファージの炎症反応における $\delta$ オピオイドの作用を解析した。BMDM を LPS で刺激すると、炎症性サイトカインである IL-6 や TNF $\alpha$ などの遺伝子発現が顕著に誘導されるが、KNT-127 で処理しておくことでこの誘導が有意に抑制され、培養上清中に分泌されるタンパク質量も減少した。このことから $\delta$ オピオイドによる DSS 誘導性大腸炎の症状改善にマクロファージの炎症反応の抑制が寄与することが示唆された。本研究により、中枢神経系へ作用する $\delta$ オピオイドが免疫反応に起因する腸炎を抑制すること、その分子機構として末梢の免疫細胞に直接作用し活性化を抑制する仕組みがあることがはじめて明らかとなった。

Opioid, Immune, colitis

発表責任者：長田和樹 (8318546@ed.tus.ac.jp)

講演番号：1E3p02

講演日時：3月24日 14:01～ 1号館 E3 会場

ドーパミン D1/5 受容体による cAMP 情報伝達経路活性化を介した海馬依存性記憶制御

Regulation of hippocampus-dependent memory retrieval by dopamine D1/D5 receptors-cAMP signaling pathways

○六川 智博、長谷川 俊介、喜田 聡 (東農大・応生科・バイオ)

○Tomohiro ROKUKAWA, Shunsuke HASEGAWA, Satoshi KIDA (Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

ドーパミン情報伝達経路は快情動、報酬行動、意欲、学習と記憶形成など多岐にわたる脳機能を制御する神経伝達を担っている。一方、サーカディアンリズム産生を司る生物時計は学習・記憶能力を中心とする認知機能を制御すると考えられているが、認知機能との関連性は不明であった。我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1(dnBMAL1)を発現する遺伝子改変マウス(dnBMAL1 マウス)を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めてきた。その結果、この変異型マウスは時間帯依存的(明期開始後 10 時間; ZT10)に海馬依存性記憶の想起障害を示したことから、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けることが強く示唆された。さらに、この変異型マウス海馬のトランスクリプトーム解析結果の Gene Set Enrichment 解析により、dnBMAL1 マウス海馬では、G タンパク質共役型受容体群と cAMP 情報伝達因子群の発現が異常を示すことが示された。この結果に基づいた定量的 RT-PCR 解析からアデニル酸シクラーゼ 1(AC1)、AKAP5、ドーパミン受容体 D1R 及び D5R の mRNA 量が顕著に低下していることが明らかとなった。これらの結果に一致して、dnBMAL1 マウス海馬では cAMP 量も低下していることも明らかとなり、海馬では、dnBMAL1 の発現によって D1/5R による cAMP 産生が低下していることが強く示唆された。そこで、本研究では、海馬依存性記憶想起に対する D1/5R による cAMP 産生の役割を明らかにすることを目的として、社会的認知記憶課題を用いた行動薬理的解析を行った。その結果、野生型マウスに対する D1/5R アンタゴニストの腹腔内投与は ZT4(明期開始後 4 時間)における記憶想起には影響を与えなかったものの、ZT10 における記憶想起を阻害することが示された。一方、dnBMAL1 マウスに対するロプリラムあるいは D1/5R アゴニストの腹腔内投与は ZT10 における社会的認知記憶想起の障害を改善することが示された。さらに、ZT10 において野生型マウスの海馬に cAMP 濃度上昇を誘導するロプリラムと D1/5R アンタゴニストを投与した結果、D1/5R アンタゴニストを投与した場合には腹腔内投与結果と同様に記憶想起の阻害が観察され、この D1/5R アンタゴニストによる記憶想起阻害はロプリラムの同時投与によって解消された。以上の結果から、海馬生物時計は D1/5R-cAMP 情報伝達経路を介して記憶想起を正に制御すると結論し、ドーパミン情報伝達経路が記憶想起を制御することが初めて明らかとなった。

memory, dopamine, hippocampus