



微生物が有する代謝酵素の分子および動力学的な多様性の解明

理化学研究所環境資源科学研究センター 千葉 洋子

はじめに

ゲノム情報の蓄積により、遺伝子の比較解析を用いて各生物の有する代謝・酵素を予測することが可能となった。一方で、以下に具体例を示すように、ゲノム上でその生物の生理条件からあるはずの代謝経路・酵素が推定できないことがあることも示された。これは既知のそれとは遺伝的・進化系統的に異なる酵素を用いている、もしくは異なる経路を用いていることを示唆する。すなわち、ゲノム情報は既知の代謝経路・酵素の有無だけでなく、新規システムが存在する可能性も示してくれる。

我々は相同性検索により推定することのできない新規代謝酵素を生化学的に同定し、同じ機能を有する酵素に起源の異なる複数タイプがあること、すなわち遺伝的な多様性があることを明らかにしてきた。さらにその理由を探る過程で、分子的多様性に加えて動力学的な多様性も存在することに注目し、その理由を明らかにすることにも挑んできた。ここでは、これまでに得られた研究成果の中から代表的なものを紹介する。

1. セリン生合成酵素の遺伝的な多様性の発見

アミノ酸は細胞構成成分およびエネルギー源として重要である。タンパク質を合成する20種類のアミノ酸の中で、セリン生合成経路はゲノム情報から推定することが難しいことが知られている¹⁾。すなわちセリン生合成能力を有しているはずなのに有さない(≡経路を推定できない)と誤判定されてしまう種が多く存在するのだ。その理由の一つとして、セリン生合成に関わる酵素の遺伝的多様性が高いことが挙げられる。

多くの生物において、セリンは糖代謝の中間代謝産物である3-P-glycerateから3つの反応を経て作られる。これらの反応を触媒する酵素はそれぞれ相同性を有する1種類ずつのみが知られていた。ところが微生物のゲノム情報を精査したところ、3ステップの内最初の2反応を担う酵素遺伝子を有しているものの、最後の反応を担う酵素phosphoserine phosphatase (PSP) 遺伝子を欠く種が多数存在することが示された²⁾。そこでそれら生物種の中から、増殖生理上セリン生合成能力を有することが明白で、かつゲノム情報から代替のセリン生合成経路が推定されない種を選定し、セリン生合成経路・酵素を実験的に特定した。

1-1. Type 2 PSP の発見

Aquificota 門に属する好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* は、CO₂ からすべての細胞構成成分を合成できる独立栄養性細菌であることから、セリン生合成経路を有することは自明である。しかし、本菌は既知のPSP (Type 1 と呼ぶ) 遺伝子ホモログを欠き、ゲノム情報からセリン生合成経路を推定することができなかった。一方で本菌の細胞破碎液からはPSP活性が検出されたので、type 1 PSP との相同性を欠く新規なPSPを有し、これを用いてセリンを生合成している可能性が示唆された。本仮説を検証するため、本菌の細胞破碎液から活

性を指標にPSP活性を有するタンパク質を精製し、同定した。本PSPはtype 1 PSPとはSuperfamilyレベルで異なるものだった²⁾ので、type 2 PSPと名付けた。さらに、本遺伝子の破壊株はセリン要求性を示した³⁾ことから、本新規PSPが実際にセリン生合成に必須であることが示された。Type 2 PSP ホモログは、type 1 PSPを欠くシアノバクテリア等にも存在し⁴⁾、これら生物でもセリン生合成に寄与していると推定される。

1-2. Type 3 PSP の発見

好熱性細菌 *Thermus thermophilus* は従属生物であるが、合成培地での増殖生理からセリン生合成能を有することが明白である。本菌は3ステップのセリン生合成経路の最初の2酵素の候補遺伝子を有するが、type 1, 2 PSP 遺伝子候補を欠く。そこで *H. thermophilus* と同様にPSP遺伝子を同定し (Type 3 PSP)、セリン生合成に必須であることを証明した⁵⁾。

2. 触媒化学と酵素化学の融合による酵素・代謝進化原理の抽出

2-1. PSP には動力学的な多様性もある

以上の研究から生物はPSPを少なくとも3回「発明」したことが示された。なぜPSPには遺伝的・分子的多様性があるのだろうか。本問いに答える方法を思慮する過程で、PSPのミカエリス・メンテン定数 (K_m) には3桁もの多様性がある⁶⁾ことに気付いた。そこで K_m の多様性が何を意味するのか明らかにすることを目指し、以下の研究を行った。

2-2. K_m の多様性が意味すること：理論解析

酵素速度論の基本であるミカエリス・メンテン式によると、 K_m が小さく、 k_{cat} が大きいほど反応速度が大きくなる。 K_m は基質と酵素の親和性を表し、その値が小さいほど両者が強く結合する。しかし、基質と酵素が強く結合すると、生成物が酵素から離れにくくなり、反応が進みにくくなると推定される。実際、人工触媒の分野では基質と触媒の吸着エネルギーが小さすぎず「ほどほど」の時に反応速度が最大となる経験則 (サバティエ則)⁷⁾ が知られている。さらに近年、欧州のグループによってセルラーゼ活性がサバティエ則に従うことが報告された⁸⁾。もしPSPを含む他の酵素もサバティエ則に従うのであれば、 K_m が基質濃度に対して最適化されている可能性があるのではないかと候補者らは推定し、以下の研究を行った。

まず、生化学および物理化学の知見を融合することで、活性

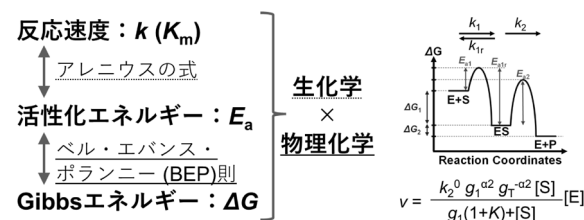


図1. 酵素反応速度とギブスエネルギー変化の関係式

化エネルギーを介して酵素反応速度とギブスエネルギー変化の関係を数式化した(図1)⁹⁾。その結果、いくつかの仮定のもとにおいて、 K_m と k_{cat} のトレードオフを理論的に記すことに成功し、 K_m を限界まで小さくするのではなく、基質濃度と同じくした時に酵素活性が最大になることが示された。

さらに、既存のオミックス情報との照合によりほ乳類細胞、酵母、大腸菌の細胞内基質濃度と、各生物の有する酵素の K_m の関係を調べたところ、多くの酵素が基質濃に近い K_m を有することが明らかになった(図2)⁹⁾。本結果は、進化の過程で基質濃に近い K_m を有する酵素が選択されてきた、さらには活性の高い酵素が選択されてきた可能性を示唆する。

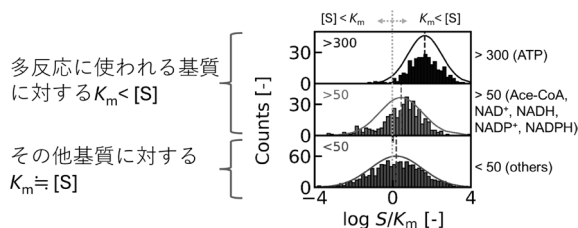


図2. 細胞内基質濃度とその基質に対する K_m の関係

2-3. K_m の多様性が意味すること：PSP の解析

では、PSP の K_m の多様性はその酵素を有する生物における基質 (phosphoserine) 濃度に対する活性の最適化によるものなのだろうか？ 答えはおそらく否である。なぜなら、少なくとも我々が解析した10生物由来のPSPについて、基質濃度を変化させても最大活性を示す酵素 (K_m) は変化しなかったからである(図3)⁶⁾。この理由を実験と理論により解析したところ、PSP ではセルラーゼと比較して酵素ごとの活性化エネルギーの違いが大きいことが一因であることが明らかとなった⁶⁾。

2-4. PSP の解析がもたらした高活性酵素設計のヒント

以上の研究成果は、高活性な酵素を作る指針、すなわち k_{cat} を大きくし K_m を小さくするという既存の概念に再考をもたらす。具体的には、 K_m が「中間的な値」の時に活性は最大化し、対象酵素がサバティエ則に従う ($\approx k_{cat}$ と K_m にトレードオフがある) 場合は K_m を反応環境における基質濃度に近づけることが好ましい。さらに、将来的に対象酵素の活性化エネルギーを制御することができるようになれば、 K_m と k_{cat} のトレードオフを破るさらなる高活性酵素を設計できると期待される。

おわりに

紹介したPSPの分子(遺伝)的な多様性は、非モデル生物を含む系統的・生理的に多様な生物・酵素を対象としたことで初めて達成された。なぜならモデル生物であるヒト・植物・酵母・大腸菌はいずれもtype 1 PSPを有するので、他のタイプのPSPの存在は我々が水素細菌で研究するまで見逃されていたのだ。さらに、我々が発見した活性化エネルギーの多様性も、3ドメインすべての生物に分布し、機能する環境も常温～85℃と多様である酵素PSPを用いて解析したことが肝であったと考えられる。(なお、セルラーゼ活性は、カビ由来およびその変異体のみを用いて解析されている。)候補者がこれまで長年行ってきた酵素多様性の解明は、酵素工学等へ展開される可能性を秘めており、基礎と応用をシームレスにつなぐ農芸化

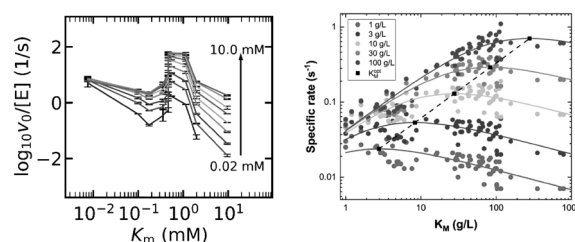


図3. PSP (左)⁶⁾とセルラーゼ (右)¹⁰⁾における基質濃度と K_m に対する活性変化の違い

学的な研究であると自負している。

(引用文献)

- 1) Ramoneda, J. et al. Taxonomic and environmental distribution of bacterial amino acid auxotrophies. *Nat Commun*, 14, 7608 (2023).
- 2) Chiba, Y. et al. Discovery and analysis of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homologs as novel phosphoserine phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biol Chem*, 287, 11934–11941 (2012)
- 3) Kim, K.T. et al. Phosphoserine phosphatase is required for serine and one-carbon unit synthesis in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Bacteriol*, 199, e00409–e00417 (2017)
- 4) Chiba, Y. et al. Structural units important for activity of a Novel-type phosphoserine phosphatase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 revealed by crystal structure analysis. *J Biol Chem*, 288, 11448–11458 (2013)
- 5) Chiba, Y. et al. Discovery and analysis of a novel type of the serine biosynthetic enzyme phosphoserine phosphatase in *Thermus thermophilus*. *FEBS J*, 286, 726–736 (2019)
- 6) Chiba, Y. et al. Rationalizing the influence of the binding affinity on the activity of phosphoserine phosphatases. *Angew Chem*, 63, e202318635 (2024)
- 7) Sabatier, P. Hydrogénations et déshydrogénations par catalyse. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 44, 1984–2001 (1911)
- 8) Kari, J. et al. Sabatier principle for interfacial (heterogeneous) enzyme catalysis. *ACS Catal*, 8, 11966–11972 (2018)
- 9) Ooka, H. et al. Thermodynamic principle to enhance enzymatic activity using the substrate affinity. *Nat Commun*, 14, 4860 (2023)
- 10) Kari, J. et al. Physical constraints and functional plasticity of cellulases. *Nat Commun*, 12, 3847 (2021)

謝 辞 本研究は、東京大学大学院在学時に着手し、海洋研究開発機構および理化学研究所で発展させたものです。在学中に今に続く研究テーマに出会う機会を与え、ご指導くださった応用微生物学研究室の五十嵐泰夫先生、石井正治先生、新井博之先生、亀谷将史先生に深く感謝いたします。また、触媒化学・物理化学の視点から酵素や代謝を解析するという新たな研究展開のきっかけをくださった理化学研究所の中村龍平チームリーダーおよび大岡英史研究員に心より御礼申し上げます。なお、本研究を行うにあたりこちらには書ききれない多くの皆様のご協力やご支援をいただきました。共同研究者および理研・生体機能触媒研究チームの同僚を筆頭に、日々研究活動を支えてくださる皆さまに改めて感謝の意を示します。



環境細菌に潜在する新規代謝機構の発見と解明

筑波大学生命環境系 土 肥 裕 希

はじめに

代謝 (metabolism) とは、生物が生命活動を維持するために必要な一連の化学反応である。我々ヒトの生活や健康は、環境浄化から食品・医薬品の生産まで、微生物の代謝の恩恵を多大に受けている。また、微生物は地球のあらゆる環境から検出されており、その潜在的な種数は他の生物を圧倒していることから、微生物は生物圏における物質循環の主役と考えられている。したがって、微生物の代謝を理解することは、我々の生活を豊かにするだけでなく、生物地球科学的循環を理解して将来に向けた持続可能社会を構築していくためにも非常に重要である。筆者らは、環境細菌に潜在する新規代謝や代謝応答を複数発見し、そのメカニズムを解明した。以下にこれらの研究成果の概要を紹介する。

1. 細菌の基礎代謝による酸化ストレス応答と耐性化

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は細胞膜を透過可能なラジカル性物質であり、細胞に強い酸化ストレスを引き起こす。筆者らは、高濃度の NO が含まれる浄化槽から NO 耐性菌を複数単離した。得られた NO 耐性菌はすべて脱窒菌であったことから、これらの細菌は NO を無毒な窒素ガスまで還元することによって生育の NO 耐性能を獲得していると考えた。一方で、筆者らはこれらの細菌の生育は脱窒活性を発現しない好気条件下においても高い NO 耐性を示すことを見出し、脱窒による NO の解毒とは異なる NO 耐性化機構が発現していることを明らかにした¹⁾。

YD35 株は上記で単離された NO 耐性菌のひとつであり、日和見感染菌として知られる *Achromobacter* 属細菌に分類される。筆者らは、NO 存在下で強い酸化状態となった YD35 株は、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (Pdh) と TCA 回路の酵素の遺伝子発現を上方制御し、回路内の還元酵素 (=NAD(P)⁺ の再還元) の活性を亢進させることを見出した (図1)。また、同応答では Pdh 複合体の反応によるアセチル CoA の供給が重要 (律速) であること²⁾、そして高酸化耐性アコニターゼ AcnA3 が回路内のクエン酸からイソクエン酸への効率的な変換に重要であることを明らかにした (図1)³⁾。これら結果は、生命活動の維持に必要な一次代謝を担う TCA 回路が酸化ストレス応答と耐性化に寄与していることを明らかにした。また、AcnA3 の

高い酸化耐性は、鉄硫黄クラスターを活性中心に有することから酸化傷害を受けやすいとされてきたアコニターゼの既存の特性を覆した。

2. 乳酸菌の還元ストレスに対する代謝応答とその応用

乳酸菌の異化代謝は、主に解糖系とピルビン酸代謝で構成される。*Enterococcus faecalis* はグリセロール資化能を特徴とする乳酸菌であり、動物の消化器官の常在菌のひとつである。本菌のグリセロール代謝では、1分子のグリセロールをピルビン酸に変換する際に2分子の NADH を生成する。これは解糖系によるグルコース代謝の2倍である (図2)⁴⁾。嫌気条件下で培養された *E. faecalis* では、グルコースは乳酸発酵を経て乳酸に、グリセロールはアルコール発酵を経てエタノールに変換された。筆者らは、この違いが代謝に伴って生成される NADH の収支に起因することを同定した (図2)⁵⁾。

筆者らは、高濃度のグリセロールを代謝する *E. faecalis* が当該代謝で産生される過剰な NADH (=還元ストレス) のため、好気条件下にもかかわらず高い変換効率で乳酸を生産 (乳酸発酵) することを発見した。この「好気性乳酸発酵」を行っている細胞では、還元ストレスによってピルビン酸の好気代謝 (アセトインと酢酸の生産) が、そして酸素によってアルコール発酵 [ピルビン酸ギ酸リアーゼ (Pfl), アルデヒド/アルコール脱水素酵素 (AdhE)] がそれぞれ阻害されることで、乳酸生産経路のみが機能していた (図2)⁶⁾。筆者らはこの好気性乳酸発酵を利用することで、ジャーファーメンターを用いた回分培養によって 150 g/L のグリセロールを 135 g/L の L-乳酸に変換することに成功した。さらに、本菌の遺伝子組換え株を用いて、同様に 171 g/L のグリセロールを 157 g/L の D-乳酸に変換することにも成功した。これらの変換量は、いずれも回分培養系での生産量における世界のトップデータを更新した。また、廃食油由来の廃グリセロールを原料とした L/D-乳酸の

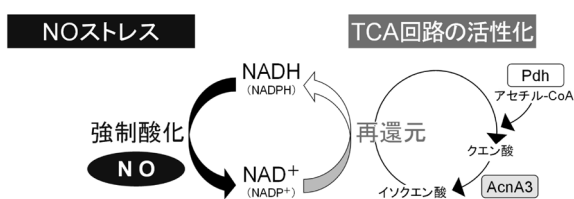


図1 YD35株の NO 起因性の酸化ストレス耐性化機

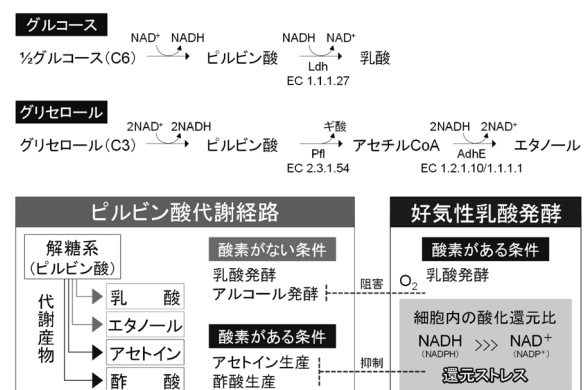


図2 *E. faecalis* のグルコースおよびグリセロール嫌気代謝経路と好気性乳酸発酵の発現メカニズム

生産も検証し、廃グリセロール中に残存する油成分を除去することによって、それに残存する過酸化脂質による代謝阻害（乳酸生産効率の低下）を低減できることを見出した⁷⁾。

3. 細菌による複素環式化合物の分解代謝

構造内に窒素原子を有する環式化合物には、核酸、アミノ酸、補酵素など、生体にとって必須な化合物が多数含まれる。ルミクロムは、リボフラビン（ビタミンB₂）の糖鎖部位が微生物酵素⁸⁾や紫外線等で乖離した複素環式化合物であるが、その環境動態は不明である。筆者らは植物根からルミクロム分解菌 *Rhodococcus* sp. LC-2 株（LC-2 株）を単離し、その線状プラスミド上にルミクロム分解を担う遺伝子群がコードされていることを同定した。アミノ酸配列に基づいた系統分類では、これらのルミクロム分解酵素はいずれも機能既知の酵素グループには含まれない新規な酵素であった。また、LC-2 株のルミクロム代謝物、当該遺伝子群の遺伝子破壊株や遺伝子にコードされている酵素タンパク質の機能を解析することで、本菌株はルミクロムを水酸化、ピリミジン環の開裂、脱カルバモイル、脱アミノ、酸化を経て分解することを同定した（図3）。

プテリンはピラジン環とピリミジン環が結合の一辺を共有した複素環式化合物で、葉酸（ビタミンB₉）、モリプトプテリンやビオプテリンなどの補因子の構成骨格である。さらに、ピラジン環部位の炭素に側鎖を有するプテリン化合物は昆虫色素として自然環境中に広く存在している。筆者らはいくつかの天然のプテリン化合物を用いて、それらを分解する土壌細菌を単離・解析した結果、ピラジン環部位の側鎖構造によって分解を担う細菌の属種が大きく異なることを見出した。その中で、モンシロチョウの翅やカイコ（幼虫）の外皮などに白色色素として含まれているイソキサントプテリン（IXP）を選択的に分解する土壌細菌 *Cupriavidus* sp. LA-1 株（LA-1 株）の IXP 分解機構を解析し、本菌株は IXP 誘導性の遺伝子群にコードされているプテリンデアミナーゼ（PDA）と3つの新規酵素によって IXP をキサンチンに変換した後、既知のキサンチン代謝経路でそれを分解・資化することを明らかにした（図4）。

おわりに

本研究では、細菌の新規な代謝と代謝応答を複数発見し、そのメカニズムを解明した。筆者らが解析した細菌は、いずれもごくありふれた環境細菌である。しかしながら、モデル生物として広く利用されている大腸菌（K-12株）でさえ、そのゲノムDNAにコードされている遺伝子の約4割が未同定あるいは機能未知である⁹⁾。このことは、身近な細菌にもまだまだ未知の代謝や代謝応答機構が潜在していることを示唆しており、細菌の機能の多様性と重要性を示している。これらを明らかにしていくことで、生物圏の物質循環における細菌の役割だけでなく、それらの機能、具体的には代謝や酵素を利用した物質生産や環境浄化など、様々な応用への展開が期待される。

（引用文献）

- Doi Y, Takaya N, Takizawa N. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 5186-5194 (2009).
- Doi Y, Shimizu M, Fujita T, Nakamura A, Takizawa N, Takaya N. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1910-1918 (2014).

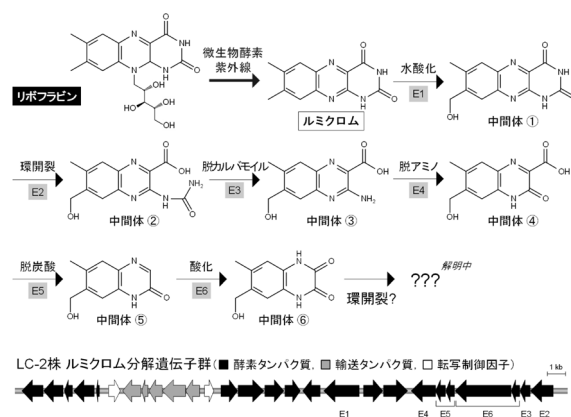


図3 LC-2株のルミクロム分解経路

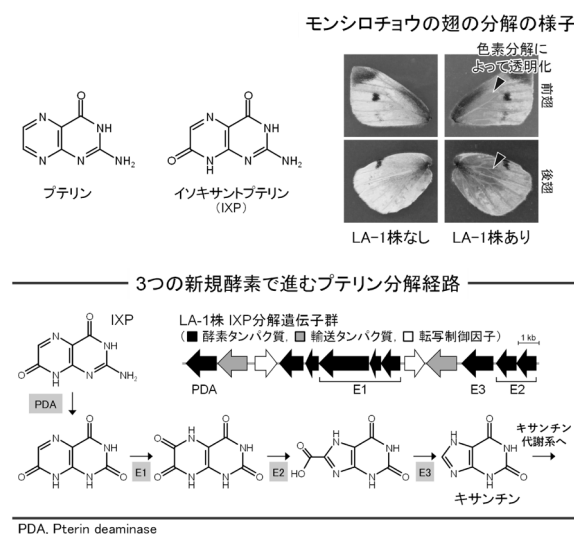


図4 LA-1株のイソキサントプテリン分解経路

- Doi Y, Takaya N. *J. Biol. Chem.*, 290, 1412-1421 (2015).
- Doi Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, review, 103, 5079-5093 (2019).
- Doi Y, Ikegami Y. *J. Bacteriol.*, 196, 2472-2480 (2014).
- Doi Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 10183-10192 (2018).
- Doi Y. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 2082-2089 (2015).
- Kanazawa H, Ozaki S, Doi Y, Masuo S, Takaya N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 84, 1056-1061 (2020).
- 加藤潤一. 化学と生物, 54, 575-579 (2016).

謝 辞 本研究は、筑波大学大学院生命環境科学研究科、同大学生命環境系、および岡山理科大学工学部応用化学科で行われたものです。本賞への応募を後押しいただくとともにご推薦下さいました筑波大学生命環境系教授・小林達彦先生に厚く御礼を申し上げます。また、本研究をご支援いただきました筑波大学生命環境系教授・高谷直樹先生、本研究を開始する機会をいただきました岡山理科大学工学部応用化学科教授・滝澤昇先生に感謝申し上げます。さらに本研究成果の一部は、筑波大学および岡山理科大学の学生の皆様の努力の賜物であります。筑波大学生命環境系および岡山理科大学工学部応用化学科の教職員の方々には、本研究の実施にあたって多大なご理解とご協力を賜りました。皆様に深く感謝申し上げます。



帝京大学理工学部 宮 本 皓 司

イネの抗菌性二次代謝産物の生合成とその制御機構に関する研究

はじめに

植物は病原菌の感染に対して、抗菌性二次代謝産物ファイトアレキシンの生産を含む様々な病害抵抗性反応を示す。植物が病原菌の感染を認識すると、ジャスモン酸などを介したシグナル伝達によって、核へと情報が伝達される。その後、病害応答性転写因子の発現や活性化が誘導され、さらにファイトアレキシン生合成酵素遺伝子を含む防御関連遺伝子の発現が誘導されることで、様々な防御応答が誘導される。著者は、イネのファイトアレキシンの生合成とその制御機構の解明に取り組んだ。これまでに、イネにおける主要なジャスモン酸受容体の同定、ファイトアレキシン生合成の制御に関わる転写因子の機能の解明、イネ属植物におけるファイトアレキシン生合成の進化軌跡の解明を行ってきた。以下にその詳細を示す。

1. イネの主要なジャスモン酸受容体の同定

ジャスモン酸はストレス応答の誘導に関わるとともに、伸長成長の抑制、老化の促進、雄性生殖器官の発達などにも関わる植物ホルモンである。生体内における活性型分子はジャスモン酸イソロイシンであり、COI受容体によって認識される。モデル植物であるシロイヌナズナなどの双子葉植物では、COIをコードする遺伝子はゲノム中に1つが存在する。それに対して、イネを含む単子葉植物のCOIはゲノム中に複数コードされており、分子系統解析の結果からCOI1とCOI2に分類される。イネでは、COI受容体をコードする3つの遺伝子(*OsCOI1a*, *OsCOI1b*, *OsCOI2*)が存在する(図1)。まず、著者はゲノム編集を用いて、イネの3つのCOI遺伝子の変異体を作製した。その後、これらを用いてイネCOIの生理機能の解明に取り組んだ。*oscoi2*変異株においてジャスモン酸処理後のファイトアレキシンの生産が低下したことから、*OsCOI2*がファイトアレキシン生合成を制御する主要なジャスモン酸受容体であることを明らかにした。また、*oscoi2*変異株では、稔性の低下や老化の抑制も見られたことから、*OsCOI2*がイネのジャスモン酸応答を制御する主要な受容体であることを発見した(図1)。また、COIと受容体複合体を形成するJAZとの相互作用解析の結果から、*OsCOI2*と特異的に相互作用する

OsJAZ2 および *OsJAZ5* を見出した¹⁾。これらの発見は、イネのジャスモン酸シグナル伝達機構の解明に寄与するだけでなく、特定の受容体複合体をターゲットとして植物の成長に負の影響を与えずにストレス抵抗性を賦与する薬剤の開発するための基礎となる知見をもたらした。また、植物ホルモンが多様な生理作用を発揮する仕組みを解明する足掛かりとして植物生理学の発展にも貢献が期待できる。さらに、単子葉植物が複数のCOI受容体を持つ生理学的意義や植物ホルモンの受容体の進化を考える上でも学術的に重要な発見である。

また、著者は紫外線の暴露によって誘導されるファイトアレキシン生産におけるジャスモン酸の機能についても研究を行った。イネのファイトアレキシンはフラボノイド型とジテルペン型の二種に大別される。著者は、イネのジャスモン酸欠損変異体を用いて、フラボノイド型の生産誘導にジャスモン酸は必須であるがジテルペン型の生産誘導にはジャスモン酸は必須ではないことを示した²⁾。これらのことから、ストレス応答に対するファイトアレキシン生合成におけるジャスモン酸の機能の一端を明らかにした。

さらに、ジャスモン酸の簡便な光学分割法を開発し、数十mgのスケールで光学分割に成功した。調製した光学活性ジャスモン酸のイネにおける代謝と生物活性を異性体間で比較し、非天然型ジャスモン酸の活性が低い理由がジャスモン酸イソロイシンへの代謝効率が低いためであることを示した³⁾。この成果は、COI-JAZ受容体複合体とジャスモン酸イソロイシンとの相互作用解析に有用な分子プローブの原料となる天然型、非天然型ジャスモン酸の供給を可能にした。

2. イネのファイトアレキシン生合成を制御する転写因子の機能解析

著者が研究を開始した当初、イネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成を制御するbZIP型転写因子*OsTGAP1*が同定されていたが、*OsTGAP1*によるファイトアレキシン生合成酵素遺伝子の制御機構の詳細は明らかになっていなかった。まず、著者はクロマチン免疫沈降法と次世代シーケンズ解析によって、*OsTGAP1*のイネゲノム中における結合領域を網羅的に同定した。この結合領域には、ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に重要なメチルエリスリトールリン酸(MEP)経路の初発段階の酵素をコードする*OsDXS3*の転写開始点上流が含まれていた。この結合領域が下流遺伝子の転写に与える影響を解析し、*OsDXS3*が*OsTGAP1*により直接的に転写制御を受けていることを示した。また、ジテルペン型ファイトアレキシンであるファイトカサン類およびモミラクトン類の生合成酵素遺伝子は、イネゲノム中において遺伝子クラスターを形成している。著者は、*OsTGAP1*がクラスター中の遺伝子それぞれの近傍の上流域に結合するのではなく、クラスター内の遺伝

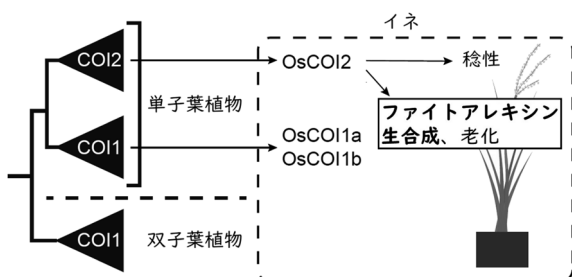


図1. ジャスモン酸受容体の進化とイネにおける機能

子間領域に結合することを発見した⁴⁾。これらのことから、OsTGAP1 がクラスター中の遺伝子を1対1で転写制御するのではなく、遺伝子間領域に結合した転写因子がクラスター全体の転写に影響を与えている可能性が考えられた(図2)。

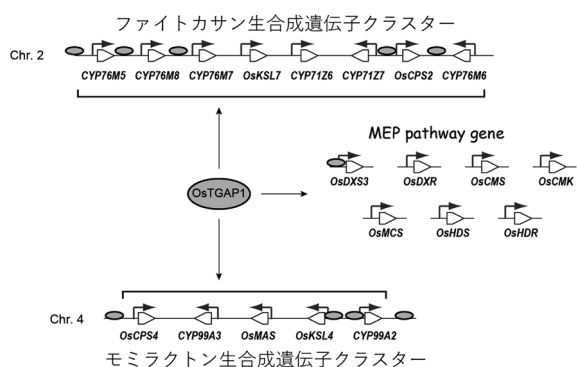


図2. OsTGAP1 によるファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御

次に、著者は OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索を行い、bZIP 型転写因子 OsbZIP79 を同定した。OsbZIP79 の過剰発現株を作製したところ、培養細胞においてジテルペン型ファイトアレキシン生産が減少することを発見した。このことから、OsbZIP79 がジテルペン型ファイトアレキシンの生合成を負に制御することを明らかとなった⁵⁾。これらに加えて、bHLH 型転写因子 DPF や WRKY 型転写因子 OsWRKY53 もジテルペン型ファイトアレキシンの生合成制御に関わることを他の研究者との共同研究によって明らかにし、著者はこれらの転写因子の機能や下流遺伝子の解明に貢献した^{6,7)}。

以上の成果は、イネの病害抵抗性反応の解明に貢献するだけでなく、転写因子の機能強化によるファイトアレキシン生産の増強といった応用も期待できる。特に、イネのファイトアレキシンは、病原抵抗性だけでなく、虫害抵抗性や周囲の雑草の生育抑制にも寄与しており、ファイトアレキシン生産の強化を介したストレス耐性イネの作出につながる事が期待できる。

3. イネ属植物におけるファイトアレキシン生合成の進化軌跡の解明

イネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成遺伝子は、イネゲノム中において遺伝子クラスターを形成している。この遺伝子クラスターの形成過程を解明するため、著者は野生イネやイネの近縁種を用いた比較ゲノム解析を行い、イネ属植物におけるファイトアレキシン生合成の進化軌跡の解析に取り組んだ。まず、イネ(栽培種)の野生原種である *Oryza rufipogon* が遺伝子クラスターを保持していることを明らかにした。このため、イネの栽培化以前に既に遺伝子クラスターが形成されていたことが示された。次に、イネ属の近縁種を用いて解析を行った。イネ属の植物は、染色体の構造から、AA, BB, FF ゲノムなどに分類される。モミラクトン類の生合成遺伝子クラスターは、栽培種と近縁な BB ゲノムの種においても保存され、モミラクトン類の生産能も有していた。このことから、AA および BB ゲノム種の共通祖先がモミラクトン類の生合成遺伝子クラスターを獲得したと考えられた。一方、ファイトカサン類の生合成遺伝子クラスターは、BB および FF ゲノムの種において見出されず、ファイトカサン類も検出されなかった。しかし、

イネ属と近縁のサヤヌカグサ (*Leersia*) 属の植物において、ファイトカサン類の生合成遺伝子が見出され、ファイトカサン類の生合成も検出された⁸⁾。このため、イネ属とサヤヌカグサ属の共通祖先において遺伝子クラスターが形成されており、種分化の過程でクラスターを脱落した種がいると考えられた(図3)。これらの成果は、植物の二次代謝や化学防御機構の進化を解明する上で基盤となる重要な知見である。

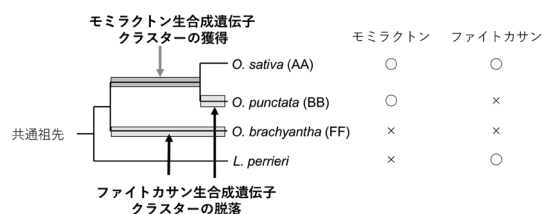


図3. イネのファイトアレキシン生合成遺伝子クラスターの進化軌跡

おわりに

以上のように、著者は、分子遺伝学的手法や天然物化学的手法を用いて、イネのファイトアレキシンの生合成の制御機構についてジャスモン酸の受容および下流の転写因子によるシグナル伝達機構の解明を行うとともに、ファイトアレキシン生合成の進化軌跡を明らかにした。今後も植物のストレス防御機構について、遺伝子と化合物の両面から研究を行い、植物の生存戦略の解明を行っていききたい。そして、得られた成果の農業分野などへの応用も視野に入れ、農芸化学分野の研究を通して社会に貢献していきたい。

(引用文献)

- 1) Inagaki et al., *Plant Cell Physiol*, **64**, 405–421 (2023)
- 2) Miyamoto et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, **80**, 1934–1938 (2016)
- 3) Miyamoto et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, **83**, 876–881 (2019)
- 4) Miyamoto et al., *PLoS One*, **9**, e105823 (2014)
- 5) Miyamoto et al., *J Plant Physiol*, **173**, 19–27 (2015)
- 6) Chujo et al., *PLoS One*, **9**, e98737 (2014)
- 7) Ishikawa et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, **88**, 1344–1348 (2024)
- 8) Miyamoto et al., *Plant J*, **87**, 293–304 (2016)

謝 辞 本研究は、東京大学生物生産工学研究センター(現・アグロバイオテクノロジー研究センター)環境保全工学研究室および帝京大学理工学部バイオサイエンス学科植物化学研究室において行われたものです。両所属において、研究の機会をいただき、多大なご指導を賜りました山根久和先生(現東京大学名誉教授)に心から御礼申し上げます。東京大学在籍時に研究、実験のご指導をいただきました岡田憲典先生、研究の面白さと厳しさを教えていただいた野尻秀昭先生に深く感謝申し上げます。東京大学および帝京大学でお世話になった先生方、先輩方、スタッフ、学生の方々にもお礼申し上げます。また、本研究の実施においてご協力、ご支援をいただきました多くの共同研究者の皆様に感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部支部長、東京大学大学院農学生命科学研究科・伏信進矢先生に心より御礼申し上げます。



東京農業大学生命科学部 若 森 晋之介

立体構造に着目した分子設計に基づく含酸素有機化合物の化学研究

はじめに

生物活性を有する有機化合物において、その立体構造や空間的な原子配置は、分子間の相互作用や反応性に直接影響する。例えば、標的物質との適切な相互作用を得るためには生物活性有機化合物の特定の立体構造が必須となる。また立体構造を調整することで、生物活性の強度や構造そのものの安定性を向上させることができる。そのため有機化合物に関する研究には、その三次元的な分子形状を考慮する必要がある。筆者は、立体構造に着目した独自の分子設計を取り入れ、含酸素有機化合物について有機化学的アプローチから研究を実施した。その中でも代表的な研究を取り上げ、以下にその概要を述べる。

1. エラジタンニン

エラジタンニンは、植物に含まれるポリフェノールの一種である¹。古くから、野菜や果物の摂取が疾病の予防になると経験的に知られており、エラジタンニンには収れん作用や抗酸化作用のほか、抗ウイルス・抗菌・抗腫瘍・免疫調節活性が確認されている。その基本構造は、D-グルコースにエステル結合したヘキサヒドロキシジフェノール (HHDP) 基であり、1,000 を超える構造が知られている。エラジタンニンの実用化を目指すには、多彩な生物活性と多様な立体構造の関連性を解明することが重要である。本研究では、有機合成化学的手法を用いて特有な構造に焦点をあてた研究を実施した。

1-1. 2,4-O-HHDP 基

Phyllanemblinin B (1) は、*Phyllanthus emblica* L. から単離されたエラジタンニンである。D-グルコースの2,4位酸素上に HHDP 基を含み、11員環ビスラクトン構造の歪みによってピラノース環がねじれ舟型に変形している。2,4-O-HHDP 基を構築するために、自由度の高い鎖状グルコースを有する2を設計し、酸化的カップリングを検討した(図1)²。塩化銅・ブチルアミンを用いた従来法³では2,4-O-HHDP 基が構築されたものの、目的の3

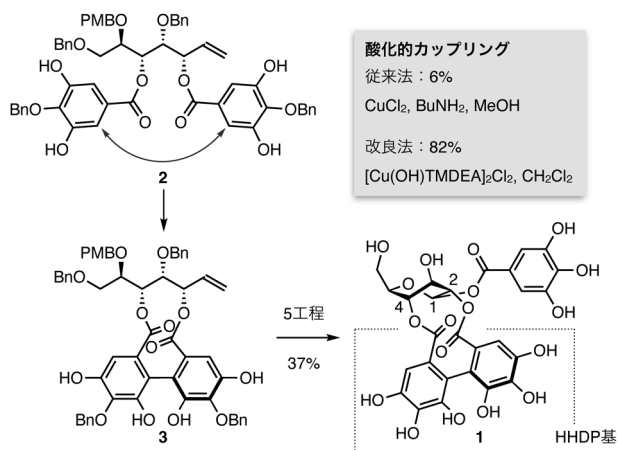


図1. 改良法による2,4-O-HHDP基の構築と天然物の全合成

の収率は6%にとどまった。改良法として[Cu(OH)TMDEA]₂Cl₂を用いたところ、3の収率が82%と劇的に向上した。続いて、D-グルコースの閉環、1位酸素上へのガロイル基の導入、保護基の除去を経て、1の全合成を達成した。本研究によって、改良したHHDP基構築法の高い有用性が示された。

1-2. 4,6-O-HHDP 基

HHDP基は軸不斉を有しており、D-グルコース上の位置によって優先される軸不斉が存在する。例えば、4,6位酸素上のHHDP基では、軸不斉がSであることがほとんどである。その一方で、軸不斉がRの4,6-O-HHDP基も4例のみ知られている。このようにD-グルコースの位置によって、“マッチ型”の軸不斉が大勢を占めるものの、“ミスマッチ型”も一部存在し、そもそも軸不斉がどのように発現しているのか、不明であった。なぜ優先する軸不斉が存在するのか解明するため、開発した改良HHDP基構築法を用いて、軸不斉の形成機構の検証に取り組んだ(図2)⁴。4,6位酸素上にガロイル基を有する4を調製し反応機構を解析したところ、まず“ミスマッチ型”の(R)-HHDP基を有する(R)-5が生成していた。反応時間の経過に伴い、軸不斉がRからSへ異性化し、収率84%で(S)-5に変換されることが明らかとなった。本結果によって、エラジタンニンの“ミスマッチ型”から“マッチ型”へのアトロプ異性化が初めて示された。他の位置のHHDP基においても同様の過程によって軸不斉が制御されていると考えられ、HHDP基の生合成にも酸化的カップリング-異性化の過程が含まれることが想定される。

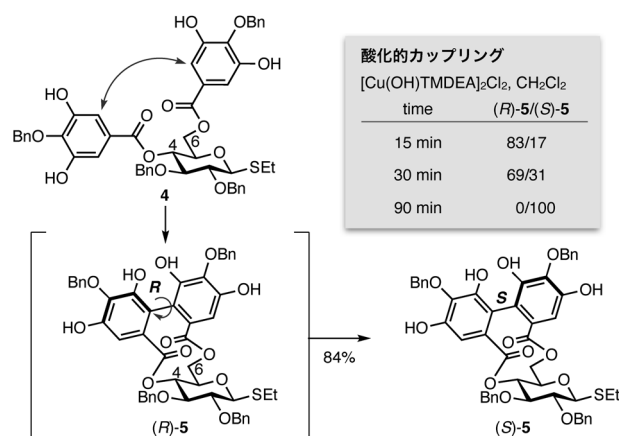


図2. 4,6-O-HHDP基における軸不斉発現の検証

1-3. 3,6-O-マカラノイル基

Macaranin B (6) は、オオバギの一種*Macaranga sinensis* から単離されたエラジタンニンである。その構造上の特徴は、D-グルコースの3,6位酸素上に架橋したマカラノイル基である。マカラノイル基は、HHDP基とガロイル基の結合様式として最も混み合ったパターンであり、オルト四置換ビアリールエーテル構造を含む。この構造は、置換基の存在によってエーテル

結合の回転が阻害されてしまうほど高々、その構築は困難が予想される。そのため、反応性の高い共役オルトキノモノアセタールを設計し、マカラノイル基の構築を試みた(図3)⁵。すなわちD-グルコースの3,6位酸素上にHHDP基を導入した**7**と、**8**とのオキサマイケル付加・脱離および還元的芳香環化により、3,6-O-マカラノイル基を構築し、収率66%で**9**へと導いた。続いて、1位酸素上へのガロイル基の導入と保護基の除去によって、**6**の全合成を初めて達成した。本研究により、開発したマカラノイル基の構築法の実用性が実証された。

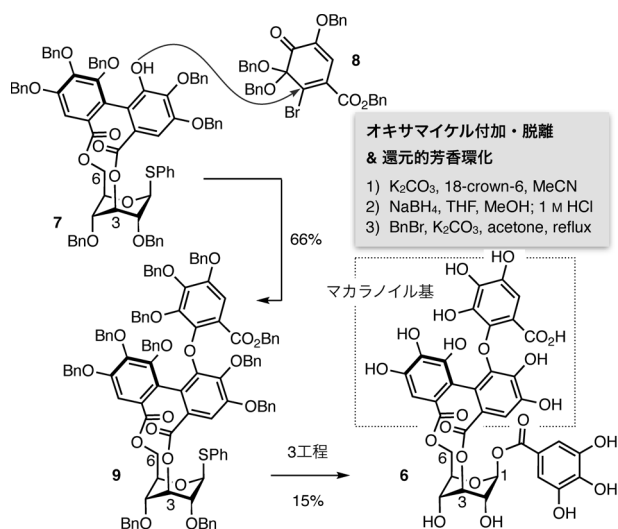


図3. 3,6-O-マカラノイル基の構築と天然物の全合成

1.4. C-グリコシド結合

Stachyurin (**10**) および 1位ヒドロキシ基の異性体である casuarinin (**11**) は、モクマオウから単離されたC-グリコシドエラジタンニンである。2,3位酸素上の電子豊富なHHDP基と結合した1位炭素が特有な構造で、このC-グリコシド結合の存在は、類縁体の生成や生物活性の発現に大いに影響する。本研究では、分子構造に特化したC-グリコシル化を開発した(図4)^{6,7}。すなわち、オキシム**12**を利用した熱力学的支配によるC-グリコシル化によって、 α -選択的にC-グリコシド結合を形成し、収率93%で**13**を合成した。得られた**13**の全ての保護基を除去することで、casuarinin (**11**)を全合成した。一方で、**13**の立体構造に起因する β -選択的ベンジルオキシ基の導入によって、**14**に変換できることを見出した。同様に保護基を除去し、stachyurin (**10**)の全合成を達成した。確立したC-グリコシドエラジタンニンの発散合成法は、他の類縁体の化学合成にも適用可能と考えられ、C-グリコシドエラジタンニンの新たな機能の開発や構造活性相関の解明への貢献が期待される。

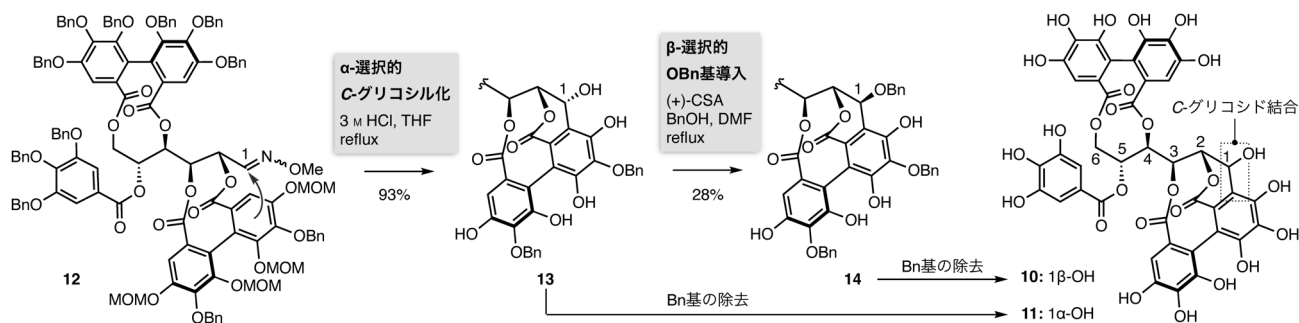


図4. オキシムを用いた立体選択的なC-グリコシル化とC-グリコシドエラジタンニンの発散合成

2. ミニシクロデキストリン

ピラノース環の立体配座の迅速解析法を開発し、糖の柔軟化法を創出した⁸。すなわち、D-グルコースの3位酸素と6位酸素を架橋すると、最も安定な型から不安定なねじれ舟型など、糖の立体配座がさまざまな形に変形することを明らかにした。本現象を応用し、これまで存在し得ないと考えられてきた小さなシクロデキストリンの化学合成に成功した。

おわりに

著者は有機化合物の立体構造に着目し、独自の分子設計を施すことで有機化学的アプローチから研究を推進した。伝統的な生物有機化学の学問分野に、立体構造に基づく分子設計という概念を組み合わせることで、独自性の高い成果が得られたと考えられる。天然物の立体構造に由来する特異な化学反応の仕組みや化学的特性を、天然物合成の技術を基盤にして解明し、生命現象の理解につなげることで、今後の農芸化学分野の発展へ寄与したい。

(引用文献)

- 1) *Chemistry and biology of ellagitannins: An underestimated class of bioactive plant polyphenols*, ed. by S. Quideau, World Scientific, Singapore, **2009**.
- 2) S. Matsumoto, S. Wakamori, K. Nishii, T. Tanaka, H. Yamada, *Synlett* **2020**, 31, 1389–1393.
- 3) H. Yamada, K. Nagao, K. Dokei, Y. Kasai, N. Michihata, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7566–7567.
- 4) S. Wakamori, R. Osada, S. Matsumoto, R. Kusuki, K. Murakami, *Org. Lett.* **2022**, 24, 8130–8135.
- 5) S. Matsumoto, A. Aoyama, S. Wakamori, H. Yamada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021**, 85, 1937–1944.
- 6) S. Wakamori, S. Matsumoto, R. Kusuki, K. Ikeuchi, H. Yamada, *Org. Lett.* **2020**, 22, 3392–3396.
- 7) R. Kusuki, K. Murakami, R. Katsuta, K. Ishigami, S. Wakamori, *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202301096.
- 8) D. Ikuta, Y. Hirata, S. Wakamori, H. Shimada, Y. Tomabechi, Y. Kawasaki, K. Ikeuchi, T. Hagimori, S. Matsumoto, H. Yamada, *Science* **2019**, 364, 674–677.

謝 辞 以上に代表される研究は、関西学院大学および東京農業大学において実施しました。志半ばで急逝されました関西学院大学・故 山田英俊先生のご冥福をお祈りいたします。また、本研究をご支援いただきました関西学院大学・村上慧先生、東京農業大学・石神健先生ならびに勝田亮先生に厚く御礼申し上げます。学生時代に研究者としてのいろはをご教授いただきました早稲田大学・鹿又宣弘先生、東京大学・渡邊秀典先生に深謝いたします。本研究成果は、多くの共同研究者の皆様のご助力と、学生たちによる不断の努力の結晶です。心より敬意を表し、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました東京大学・伏信進矢先生に御礼申し上げます。

講演番号：3D021

発表日時：3月6日 13:15～14:15、発表場所：ポスター発表会場エリア D

抗おいしいペプチド抗体による熟成牛肉の食べ頃評価技術の開発

Anti-delicious peptide antibody-based techniques for evaluating the optimal aging period of dry-aged beef

○飯嶋 益巳、田辺 明子（東農大・応生・健康）

○Masumi IIJIMA, Akiko TANABE (Dept. Nutr. Sci. Food Saf., Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

熟成肉等の熟成食品は、各製造者の経験や感覚で、熟成度合いや食べ頃が決定されており、品質管理に関する国の基準は設けられていない。本研究では、熟成牛肉を例に、熟成過程における食べ頃を客観的に評価できる新規測定技術の開発を目指した。まず、牛肉の肉汁中の「おいしいペプチド」¹に着目し、「おいしいペプチド」に対する抗体の作製を試み、これに成功した（親和性 $\sim 2 \times 10^{-8}$ M）。また本抗体は、酵素免疫測定法（ELISA）に適用可能であり、「おいしいペプチド」の定量法の確立にも成功した。次に我々は、熟成肉作製装置（DRY AGER DX500）を用いて熟成日数が 0-90 日間の熟成牛肉を作製し、肉片 500 mg の水抽出物をサンプルとして、「おいしいペプチド」の存在の有無と定量を、確立した ELISA で行った。その結果、熟成牛肉中には $\sim 3-15$ ng/mL で「おいしいペプチド」が存在し、その濃度は、熟成肉製造装置の食べ頃、官能評価で最もおいしいと評価された時期と一致する、30 日で最大になることを見出した。以上から、我々が作製に成功した「抗おいしいペプチド抗体」は、熟成牛肉の「熟成過程における食べ頃」を決定可能な抗体であることが強く示唆された。さらに我々は、各種免疫測定法の抗原検出を高感度化できる独自のナノ粒子（ZZ-BNC）²を本 ELISA に活用することで、「おいしいペプチド」並びに熟成牛肉中の「おいしいペプチド」の定量感度を、約 2 倍に向上させることにも成功して、現在本技術の実用化を検討している（特願 2024-158236; Iijima ら投稿中）。

Our research aims to develop a novel measurement technique that can objectively evaluate the optimal aging period, using dry-aged beef, for which quality control is subjective and no national standards exist, as a model. We first succeeded in producing an antibody (affinity $\sim 2 \times 10^{-8}$ M) to a "delicious peptide"¹ found in gravy of beef meat and also in establishing a quantitative detection method for this delicious peptide by ELISA. Then, we found that "delicious peptide" was present at concentrations of $\sim 3-15$ ng/mL in our produced 0-90 days of dry-aged beef (water extract of 500 mg meat pieces), peaking at 30 days, which corresponded with the recommended eating period indicated by the dry-aging machine and the period most highly rated in sensory evaluations. These findings strongly suggest that our anti-delicious peptide antibody can effectively determine the optimal aging period of dry-aged beef. Furthermore, by applying our unique nanoparticle (ZZ-BNC)² to ELISA, we have succeeded in quantifying "delicious peptide" in dry-aged beef with double the sensitivity (Japanese Patent Appl. No. 2024-158236; Iijima et al., submitted), and this technique is expected to be practical application. 1. Yamasaki ら, Agric. Biol. Chem. 42, 1761-1765 (1978); 2. Iijima ら, Biocatalyst immobilization. Academic Press (2022).

dry-aged beef, delicious peptide, ELISA

発表責任者：飯嶋 益巳（mi206786@nodai.ac.jp）

講演番号：4E071

発表日時：3月7日 13:15~14:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

オカダンゴムシの腸内細菌が真菌を抑制する

Intestinal bacteria of *Armadillidium vulgare* inhibits fungi

○片岡 柁人¹、永久保 利紀^{2,3}、野村 暢彦^{2,3}、上野 誠⁴、豊福 雅典^{2,3} (1筑波大・生物、2筑波大・生命環境系、3筑波大・MiCS、4島根大・生物資源)

○Masahito KATOKA¹, Toshiki Nagakubo^{2,3}, Nobuhiko Nomura^{2,3}, Makoto Ueno⁴, Masanori Toyofuku^{2,3} (1Col. Biol. Sci., Univ. Tsukuba, 2Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, 3MiCS, Univ. Tsukuba, 4Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

土壤中に生息するオカダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)は、動植物の枯死体を食べて分解・排出することで、土壤への炭素供給に大きな影響をもたらす。またこのような生息環境や食性から、多くの微生物と相互作用していると考えられている。当グループではオカダンゴムシの糞便から、真菌の生育を抑制する細菌 *Brevibacterium sediminis* H4 株を単離した。同一シャーレ内で本細菌と真菌を隔離培養した際にも真菌の生育抑制がみられたことから、揮発性の抗真菌物質を産生していることが示された。ガスクロマトグラフィー質量分析によって、本細菌の培養ヘッドスペースから dimethyldisulfide (DMDS) が検出され、DMDS の標品においても抗真菌活性が確認された。これらのことから、H4 株が産生する揮発性抗真菌物質のひとつとして DMDS が同定された。また *Brevibacterium* 属特異的プライマーを用いた PCR および定量 PCR によって、調査したほとんどのオカダンゴムシ個体の糞便および後腸から同属細菌が検出された。このことから、本属の細菌はオカダンゴムシにおいて一般的に存在する腸内細菌であることが示唆された。本研究の成果は、揮発性物質が関与する細菌・真菌・動物の新たな相互作用モデルの提案につながる可能性がある。

Armadillidium vulgare, which is a soil animal has a significant impact on the soil nutrition by feeding on dead plant and animal matter and expelling the decomposed matter. Hence, *A. vulgare* may interact with microorganisms due to their habitats, which is poorly understood. Our group isolated a bacterium *Brevibacterium sediminis* H4 from the feces of the *A. vulgare*, which inhibits the growth of fungi. This bacterium inhibited fungi growth even when it was inoculated in another medium from where fungi was grown, indicating that it produces a volatile antifungal substance. Gas chromatography-mass spectrometry detected dimethyldisulfide (DMDS) in the culture headspace of this bacterium, and anti-fungal activity was confirmed by chemically synthesized DMDS. These results identified DMDS as one of the volatile antifungal substances produced by strain H4. PCR and qPCR using *Brevibacterium*-specific primers detected the genus in the feces and hindgut of most of the individual *A. vulgare* examined suggesting that this bacterium is a common intestinal bacterium in *A. vulgare*. The results of this study may lead to a new model for interactions among bacteria, fungi, and animals involving volatile substances.

bacteria, volatile, antifungi

講演番号：4E085

発表日時：3月7日 13:15～14:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

マツタケの完全人工培養による菌糸塊形成法の開発

Development of a method for producing mycelium masses through complete artificial cultivation of *Tricholoma matsutake*

○沓掛 登志子¹、辻 俊一²、岩崎 健太郎¹ (¹麒麟 HD・飲料未来研、²麒麟 HD・中央研)

○Toshiko KUTSUKAKE¹, Toshikazu TSUJI², Kentaro IWASAKI¹ (¹Institute for Future Beverages, Kirin Holdings Co., Ltd., ²Kirin Holdings Co., Ltd)

マツタケは生きた樹木の根と共生する「菌根菌」であるため、人工栽培が困難であることが知られている。マツタケを単独で栽培する完全人工栽培法についても、これまで種々の検討が行われてきているが、菌糸から子実体への分化のメカニズムについては不明である。

我々は、マツタケの子実体から分離された菌株の中から、一定濃度以上の遊離アミノ酸を含む寒天培地で培養することで、再現良く菌糸塊を形成する株を見出した。この株から得られた菌糸塊の形態について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、菌糸が分岐しながら水平および鉛直のあらゆる方向へ伸長する特徴を持つことが明らかになった。培養条件を検討した結果、この菌糸塊は、高い水分保持能を有する培養支持体を含む培地へ植え替えることで、再現良く伸長してきのこの傘部に類似した形態となり、さらに同形態のままマッシュルーム大のサイズにまで生育することなどが明らかになった。

本研究により、子実体への分化は未熟であると考えられるが、完全人工栽培法で食用サイズのマツタケ菌糸塊形成が可能となったことから、菌根性きのこのあらたな産業利用の可能性を見出すことができた。また、今後は子実体への分化のメカニズム解明にも役立てることができると考えている。

Tricholoma matsutake is a mycorrhizal fungus that lives in symbiosis with the roots of living trees and is therefore notoriously difficult to cultivate artificially. We discovered a strain among those isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake* that consistently forms mycelial masses when cultured in agar media containing above a certain concentration of free amino acids. Using confocal laser microscopy to observe the morphology of the mycelial masses obtained from this strain, we observed intriguing structures. Results of examining culture conditions, it was found that these mycelial masses could consistently grow to champignon-sized proportions when transplanted into a medium containing a cultivation support with high moisture retention capability. Although this study suggests that differentiation into fruit bodies is immature, it has become possible to form edible *Tricholoma matsutake* mycelium masses using a completely artificial cultivation method, which has revealed new possibilities for industrial use of mycorrhizal mushrooms. It is also believed that this research will be useful in elucidating the mechanism of differentiation into fruit bodies in the future.

Mycorrhizal fungi, *Tricholoma matsutake*, Confocal Laser Microscope

講演番号：3B042

発表日時：3月6日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア B

放線菌が生産するマクロラクタム系二次代謝物は細胞膜を安定化させ高温耐性を促進する

Macrolactam-type secondary metabolite produced by actinomycete stabilizes cell membranes and promotes thermotolerance

○齋藤 駿¹、奥村 薫里香¹、深谷 圭介²、占部 大介²、荒井 緑¹ (¹慶應義塾大理工、²富山県立大工)

○Shun SAITO¹, Yurika OKUMURA¹, Keisuke FUKAYA², Daisuke URABE², Midori ARAI¹ (¹Keio Univ., ²Toyama Prefectural Univ.)

我々はこれまで、放線菌を高温で培養すると常温では生産されない高温培養特異的物質が生産される現象を発見し、このような代謝物を「熱ショック代謝物 (Heat Shock Metabolite: HSM)」と命名した¹。本研究では、放線菌が生産する HSM は、どのような物質なのか (What)、どのように生産されるのか (How)、なぜ生産されるのか (Why) 解析することで、新規天然物の探索、および、HSM 生産における制御システムや生理的意義の解明を目指している。今回、*Streptomyces* sp. JA74 が生産する HSM について解析を行い²、26 員環マクロラクタム構造中に 4-6 員環構造を有する新規化合物 streptolactam D (STD) を単離・構造決定した。STD の絶対立体構造については、NMR 計算および類縁物質の生合成遺伝子との比較解析、CD スペクトルの計算と実測の比較により決定した。

次に、JA74 株はなぜ STD を生産するのか、その生理的意義について解析を試みた。まず、STD を含む寒天培地にて JA74 株を培養したところ、STD は高温での生育を促進し、生育限界温度を向上させる活性を示した。続いて、STD の作用機序を明らかにするため、超遠心を用いた STD の細胞内局在および走査電子顕微鏡により表現型を解析したところ、STD は細胞膜に局在し、高温培養により菌糸が太く短くなる様子が観察された。このことは、高温で不安定となった細胞膜を STD が安定化させることを示唆している。そこで、共焦点顕微鏡による膜相状態の観察および人工脂質膜中の蛍光色素の異方性に与える影響の評価を試みたところ、STD による膜の安定化作用が確認された。以上より JA74 株は、高温環境下での生存のため STD の生産を活性化させることが示唆された。

We have discovered that actinomycetes produce a high-temperature culture-specific substance that is not produced at room temperature, and have named such a metabolite “Heat Shock Metabolite (HSM)”¹. This research aims to explore novel natural products and to elucidate the regulatory system and physiological significance of HSM production by analyzing what, how, and why HSMs are produced by actinomycetes. In this conference, we will present the isolation, structure determination and thermotolerance-promoting activity of HSM, streptolactam D (STD) with a 26-membered ring macrolactam structure, produced by *Streptomyces* sp. JA74. This study suggested that STD promotes the growth of strain JA74 at high temperature through cell membrane stabilization.

1. Saito, S. *et al.*, *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 203-210 2. Saito, S. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 2583-2591

Actinomycetes, Heat shock metabolite (HSM), Thermotolerance

発表責任者：齋藤 駿 (ssaito@bio.keio.ac.jp)

講演番号：5E104

発表日時：3月8日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

ダイズ播種期の湿害を緩和するダイズ内生細菌の発見

Discovery of soybean endophytic bacteria that suppress flooding stress at soybean sowing stage.

○提箸 祥幸¹、渡邊 陸¹、香西 雄介¹、内藤 健²、秋本 千春¹ (¹農研機構・生物研、²農研機構・資源研)

○Yoshiyuki SAGEHASHI¹, Riku WATANABE¹, Yusuke KOUZAI¹, Ken NAITO², Chiharu AKIMOTO-TOMIYAMA¹ (¹Institute of Agrobiological Sciences, NARO, ²Research Center of Genetic Resources, NARO)

ダイズは農林水産省の食料・農業・農村基本計画において、平成30年から令和12年までにおよそ1.5倍の増産が生産努力目標となっている。しかし、国内のダイズの約8割は、保水性が高く、排水性の劣る水田転換畑で栽培されており、また播種期が梅雨と重なるため、湿害による減収が問題となっている。我々は、湿害耐性を持つダイズ系統（Peking）に生息する内生微生物の中から、冠水による発芽時の浸水ストレスを抑え、出芽率を向上させる効果のある細菌を8菌株単離することに成功し、SSB（Soybean seed-born）と命名した。このうち3菌株は、これまで報告のない新種のアグロバクテリウム属細菌であることが全ゲノム配列解析にて明らかとなった。ポット栽培による市販培土を用いた屋内試験に加え、屋外圃場においてもSSB処理によりダイズの出芽率がおよそ30%向上した。さらに、このメカニズムについて解析を進め、SSBはダイズの吸水速度を緩やかにすることで急激な吸水による種子の物理的な損傷を抑える働きがあり、生菌そのものがその効果の主体を担っていることを明らかにした。ダイズの播種時の浸水ストレスを抑える細菌の報告は世界初であり、バイオスティミュラント資材としての活用が期待されるだけでなく、メカニズムを応用した浸水ストレスの緩和技術や新品種の開発につながる。

In Japan, soybean production aims to increase yields by 1.5 times from 2008 to 2030. However, approximately 80% of soybeans in Japan are grown in converted paddy fields, and where yield loss due to flooding have become a significant issue. Here, we successfully isolated eight strains of endophytic bacteria from a flooding-tolerant soybean variety Peking. These strains suppressed flooding stress during germination and improved emergence rates. We named these strains SSB (Soybean seed-born), and whole genome sequence analysis identified three of them as a new species within the *Agrobacterium* genus. In field tests, treating seeds with SSBs enhanced seedling emergence rate by approximately 30%. Furthermore, SSB treatment slowed water absorption rates, thereby reducing physical damage to the seeds. We identified that the viable SSB cells play a major role in this protective effect. This study is the first report of bacteria that suppresses flooding stress in soybeans. Our findings may lead to the development of novel biostimulant, new technologies for mitigating flooding stress, and new varieties of soybeans.

endophytic bacteria, soybean, flooding stress

発表責任者：提箸祥幸（sagehasi@affrc.go.jp）

講演番号：5E074

発表日時：3月8日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

高純度(S)-S-adenosyl-L-methionine の実践的な製造法の開発

Development of Practical Preparation Methods for High-Purity (S)-S-adenosyl-L-methionine

○竹村 時空、石毛 和也 (ヤマサ醤油株式会社 医薬・化成品事業部)

○Tokiaki TAKEMURA, Kazuya ISHIGE (Yamasa corporation, Biochemicals division)

S-adenosyl-L-methionine (SAM) は、DNA や RNA、タンパク質や脂質など様々な生体分子のあらゆるメチル化修飾に用いられるメチル基供与体である。SAM は以前からサプリメントとして高い需要があったが、近年では、mRNA ワクチンの原薬となる mRNA の翻訳効率や安定性に重要な Cap 構造のメチル化修飾に不可欠な原料として脚光を浴びており、より高純度な SAM の実践的な製造法の開発が求められていた。SAM には鏡像異性体 (S 体, R 体) が存在し、メチル基供与体として機能するのは S 体のみである。一般的に市販されている SAM は酵母から抽出されたもので、S 体の含有率は 60%程度に留まる。一方、酵素法で SAM を合成した場合には純粋な S 体の SAM が得られるが、SAM 合成酵素は著しい生成物阻害を受けるために実践的な合成は困難であった。本研究では、酵素法での SAM の生産性を高めるべく様々なストラテジーを検討し、その結果、ホウ酸と尿素が SAM 合成酵素の生成物阻害を解除することを見出し、SAM の生産性を飛躍的に高めることに成功した。SAM の精製方法についても検討を重ねて精製中の S 体の R 体への異性化変換を抑制することに成功し、S 体含有率 95%以上の高純度 SAM の実践的製法を確立した。実際の mRNA のメチル化修飾において、この高純度 SAM は市販品と比較してメチル化反応効率を顕著に高めることが確認された。

S-adenosyl-L-methionine (SAM) is a biological methyl group donor to various biomolecules such as DNA, RNA, proteins, and lipids. In addition to its demand as dietary supplements, in recent years it has been highlighted as an essential material for the methylated Cap structure of mRNA for mRNA vaccines, requiring the development of practical preparation methods for higher purity SAM. SAM has enantiomers (S- and R-forms), and only the S-form functions as a methyl group donor. The S-form content of commercially available SAM prepared by extraction from yeast is limited to only about 60%, whereas enzymatically synthesized SAM is strictly S-form. However, practical enzymatic synthesis of SAM was not feasible due to severe product inhibition of SAM-synthetase. In this study, we found that boric acid and urea lifted the product inhibition of the enzyme and dramatically increased SAM productivity. We also established purification processes that suppressed the racemization of S-form to R-form, which enabled the practical preparation of high-purity SAM with an S-form content of above 95%. The obtained high-purity SAM significantly increased the mRNA-methylation efficiency compared to commercial SAM.

S-adenosyl-L-methionine (SAM), Boric acid, Enantiomer

発表責任者：竹村 時空 (takemura@yamasa.com)

講演番号：5B001

発表日時：3月8日 13:15～14:15、発表場所：ポスター発表会場エリア B

超臨界流体クロマトグラフィーと結晶スポンジ法を用いた龍涎香香気成分の構造決定

Structural analyses of ambergris odorants by crystalline sponge X-ray analysis coupled with supercritical fluid chromatography

○谷口 慈将¹、木村 優太²、竹花 稔彦³、松本 理恵¹、上田 大次郎²、佐藤 努² (¹キリン HD キリン中央研、²新潟大院自然、³ADEKA ライフサイエンス開発室)

○Yoshimasa TANIGUCHI¹, Yuta KIMURA², Toshihiko TAKEHANA³, Rie MATSUMOTO¹, Daijiro UEDA², Tsutomu SATO² (¹Kirin Holdings, ²Niigata Univ., ³ADEKA Corp.)

龍涎香は、マッコウクジラ由来の動物性希少天然香料であり、その特徴的な香りは主成分であるトリテルペンアルコールのアンブレイン (**1**) が光酸化分解されて生じる化合物群に由来する。我々は **1** の発酵生産と続く光増感剤存在下での香気成分群への酸化分解により、龍涎香を人工生産する開発を進めてきた¹⁾。人工龍涎香には ambroxide などの香気成分が含まれることを確認したが、未同定の化合物も多数含まれていた。そこで、我々が開発した超臨界流体クロマトグラフィー（以下 SFC）と、結晶スポンジ（以下 CS）法を組合せた分析法（SFC-CS 法）²⁾を活用することで、限られたサンプル量の人工龍涎香に含まれる香気成分の構造決定を試みた。結果、1 g 未満の僅な出発材料から、2 種の新規化合物を含む 5 種香気成分を単離することができ、いずれの化合物も絶対立体配置を含む構造決定に成功した。SFC-CS 法による構造解析は、開発初期段階で十分なサンプル量を確保することが難しいケースや、揮発性が高く微量のため精製途中で失われてしまうことが多いような化合物をターゲットとする際に威力を発揮することを示した。また、構造情報をもとにこれら香気成分の生成メカニズムの考察が可能となり³⁾、人工龍涎香の産業応用に必要な製法最適化、品質規格の設定などに繋がる重要な知見を得ることが出来た。

Ambergris, a sperm whale metabolite, is truly rare and valuable natural fragrance. The odor components of ambergris are derived from the photooxidative degradation of the major component, ambrein (**1**). We have succeeded the bioproduction of **1**, and its photooxidative conversion to a range of volatile compounds, demonstrating possibility of stable production of ambergris. However, few volatile compounds have been identified in “artificial ambergris”, as well as “natural ambergris”. To structurally reveal unidentified volatile compounds in ambergris, we analyze “artificial ambergris” by crystalline sponge (CS) X-ray analysis coupled with supercritical fluid chromatography (SFC). As a result, 5 compounds, including 2 novel ones, were identified with complete assignment of their absolute configurations by this method from only less than 1 g of starting material. We will discuss the results at JSBBA 2025.

1) Yamabe, Y. *et al. Sci. Rep.* **2020**, 10(1), 19643.

2) Taniguchi, Y. *et al. Analyst* **2021**, 146 (17), 5230–5235.

3) 天野ら、農芸化学会 **2025** 一般講演発表予定。

ambergris, crystalline sponge method, supercritical fluid chromatography

発表責任者：谷口慈将 (Yoshimasa_Taniguchi@kirin.co.jp)

講演番号：4G026

発表日時：3月7日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア G

Short-term exposure to volatile compounds from waste shiitake fungi beds shows lasting growth-promoting effects on rice

○Clever Nkhokwe Kanga¹, Masanori YAMASAKI², Kimiko Itoh² (¹Niigata Univ. Graduate School of Science and Technology, ²Niigata Univ. Faculty of Agriculture-Institute of Science and Technology)

Our previous studies revealed that volatile compounds (VCs) derived from solid waste shiitake fungi beds can enhance growth and biomass accumulation in rice seedlings. Further investigation showed that rice seedlings treated with these VCs exhibited increased grain weight and fewer chalky grains compared to untreated controls after paddy transplantation under high-temperature stress conditions. To understand the mechanisms underlying these effects, we used quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) to examine the relative expression levels of several genes of interest. The results indicated increased expression levels of genes associated with cytokinin response and signal transduction, protection against oxidative damage and metal ion stress, and enhanced transpiration and cooling by suppressing H₂O₂ accumulation in the VCs treated rice plants when compared with the untreated control plants. These changes help prevent heat stress and promote tolerance. Additionally, gas exchange analysis revealed increased photosynthetic rates in VC-treated plants, indicating a strong source strength despite heat stress, which promoted biomass accumulation and better growth. Overall, our findings provide evidence that fungal VCs from waste shiitake fungi beds can promote plant growth and enhance abiotic stress tolerance without direct application.

Acknowledgement. Research supported by the A-STEP Tryout (JPMJTM22CA, JST) and the Niigata University Fellowship (J23H0004, MEXT). Special thanks to Mr. Takahashi, the Faculty of Agriculture at Niigata University, Field Science Education and Research Centre Arable Land Production Department, for granting us access to their research rice paddy fields at Shindoli Station, Niigata, Japan.

Volatile compounds, Shiitake fungi beds, Cytokinin

発表責任者：Kimiko Itoh (kimi.agr@niigata-u.ac.jp)

講演番号：5D012

発表日時：3月8日 14:15～15:15、発表場所：ポスター発表会場エリア D

ビフィズス菌や乳酸菌刺激による宿主免疫応答の個人差に関する研究

Analysis of Individual Differences Induced by Bifidobacteria and Lactobacilli Stimulation

○西村 龍貴、石原 沙耶花、菱田 幸宏、田中 美順、小田巻 俊孝（森永乳業株式会社）

○Tatsuki NISHIMURA, Sayaka ISHIHARA, Yukihiro HISHIDA, Miyuki TANAKA, Toshitaka ODAMAKI (Morinaga milk industry co.,LTD.)

プロバイオティクスなどの菌体素材の摂取は宿主の免疫応答を誘発するが、その効果には個人差がある。しかし、どのような背景因子が関与しているかその詳細は明らかではない。本研究では、菌体素材摂取時の宿主免疫応答に影響を与える因子を明らかにすることを目的とし、50名の健常成人から単離した末梢血単核細胞由来の樹状細胞(moDC)をビフィズス菌や乳酸菌で刺激する実験を行った。その結果、菌種非特異的に IL-6 などのサイトカイン産生量に個人差が認められた。これらの結果と年齢や腸内細菌叢等の背景因子との関連性を解析したところ、当該応答性と腸内の *Bifidobacterium* 属の相対存在量との間に有意な負の相関が認められた。このことから *Bifidobacterium* 属細菌が、非特異的な菌体に対する自然免疫記憶の誘導に関与している可能性が考えられた。そこで、ヒト末梢血単核細胞由来単球を *Bifidobacterium* 属細菌破碎液で刺激し、moDC に分化させた後、再度ビフィズス菌や乳酸菌で刺激する検証実験を行った結果、コントロール群と比較して有意にサイトカイン産生が低下することが確認された。以上の結果から、ヒト腸管に住むビフィズス菌の相対存在量が、菌体に対する宿主の自然免疫寛容に寄与する可能性が示唆された。

Different people have different immune responses to dietary probiotics, however, the mechanisms underlying these individualized variations remain unclear. In this study, we show that residual microbial species can regulate individual host immune response. When PBMCs-derived moDCs from 50 healthy adults were stimulated with either *Bifidobacterium* or *Lactobacillus*, individual differences in cytokine production were observed irrespective of bacterial species, implying presence of innate immune memory. Resulting in exploring the background factors that regulate immune response, we found a significant negative correlation between the immune response and the relative abundance of *Bifidobacterium* in the gut. These led us to focus on the innate immune memory by *Bifidobacterium*. To validate this, moDCs differentiated from PBMCs-derived monocytes were activated by *Bifidobacterium* lysate prior to the stimulation with either *Bifidobacterium* or *Lactobacillus*. As a result, cytokine production in the group activated by *Bifidobacterium* before differentiation was significantly decreased compared with the control group. Therefore, the relative abundance of *Bifidobacterium* in the gut may contribute individual differences in immune response against probiotics via inducing host innate immune tolerance.

Bifidobacterium, Individualized variations, Innate immune memory

発表責任者：西村 龍貴 (tatsuki-nishimura871@morinagamilk.co.jp)

講演番号：3E095

発表日時：3月6日 13:15~14:15、発表場所：ポスター発表会場エリア E

低インプット細菌 RNA-seq を用いた大腸菌の遺伝子発現動態解析

Gene expression dynamics of *E.coli* using low-input bacterial RNA-seq

○西村 美郁^{1,2}、高橋 一樹³、相川 香織³、林 哲太郎⁴、久世 真理子⁴、二階堂 愛^{4,5}、竹山 春子^{1,2,3,6}、細川 正人^{1,2,3,6} (1 早大院・先進理工、2 産総研・早大 CBBDOIL、3 早大・ナノライフ創新研、4 理研 BDR、5 東京医科歯科大・難治疾患研、6 早大・生命動態研)

○Mika NISHIMURA^{1,2}, Kazuki TAKAHASHI³, Kaori AIKAWA³, Tetsutaro HAYASHI⁴, Mariko KUSE⁴, Itoshi NIKAI^{4,5}, Haruko TAKEYAMA^{1,2,3,6}, Masahito HOSOKAWA^{1,2,3,6} (1 Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2 CBBDOIL, AIST-Waseda Univ., 3 Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., 4 RIKEN BDR, 5 Med. Res. Inst., Tokyo Med. and Dent. Univ., 6 Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

細菌培養中の遺伝子発現動態の把握は、増殖や物質生産における細菌集団の挙動を理解し制御する上で重要である。バルク RNA-seq は遺伝子発現を網羅的に解析する強力な手法だが、従来法では 10⁶ 細胞以上の RNA 抽出を要し、多試料処理におけるコストと効率性に課題があった。細菌培養の全過程を高時間分解能で追跡するには、低インプット・多試料に適合した技術的革新が不可欠である。

本研究では、我々が開発した高感度な細菌 1 細胞 RNA-seq 技術 (Nishimura et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2023) を基盤として、多試料解析に適した低インプット RNA-seq 法を確立した。本法では、1000 細胞相当の細菌培養液から直接的に cDNA 増幅とシーケンスを実行する。本手法を用いて、大腸菌の増殖過程における遺伝子発現を 10 分間隔で 8 時間追跡し、代謝、運動性、ストレス応答に関与する遺伝子群の特徴的な発現パターンを同定した。さらには、大腸菌以外の菌種への本手法の拡張を進めている。本技術は細菌の生理学的理解を深め、バイオものづくりなどの産業応用に貢献することが期待される。

Understanding gene expression dynamics during bacterial cultivation is crucial for controlling bacterial population behavior in growth and material production. While bulk RNA-seq is a powerful method for comprehensive gene expression analysis, conventional approaches require RNA extraction from more than 10⁶ cells and are challenged by the cost and efficiency for multiple sample processing. Technical innovation compatible with low-input and high-throughput RNA-seq was essential for tracking the entire bacterial cultivation process with high temporal resolution.

In this study, we established a low-input RNA-seq method suitable for multiple sample analysis based on our previously developed highly sensitive single-cell bacterial RNA-seq technology (Nishimura et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2023). This method enables direct cDNA amplification and sequencing from bacterial cultures equivalent to 1,000 cells. Using this method, we tracked gene expression during *E. coli* growth at 10-minute intervals over 8 hours, identifying characteristic expression patterns of genes involved in metabolism, motility, and stress response. Furthermore, we are expanding this method to other bacterial species beyond *E. coli*. This technology is expected to deepen our physiological understanding of bacteria and contribute to industrial applications such as biomanufacturing.

bacteria, RNA-seq, time-course analysis

発表責任者：細川正人 (masahosokawa@aoni.waseda.jp)



東京科学大学 永 鳶 鮎 美

動植物の低分子化合物認識や輸送機構の分子生物学的研究

はじめに

生物は、様々な刺激を通じて外部環境および内部環境を認識し、適切な応答により体内の恒常性を保っている。筆者らは、外部環境を感知するセンサーの役割を担うタンパク質や、体内における物質輸送を担う輸送体タンパク質に着目して研究を行ってきた。動物が感知する外界の化学物質のうち、匂い物質と呼ばれるものは、分子量約300以下の揮発性有機化合物である。動物は嗅覚によってこれを受容し、適切な応答をする。筆者らは、この応答の最上流、すなわち受容体到達よりも前に匂い物質に作用する因子を明らかにした。また、植物が外界の揮発性化合物をどのように受容しているのかは不明であったため、植物における揮発性化合物受容因子の同定を行った。これらの成果から、筆者は環境応答の「最上流」に関わる因子の重要性や、生体内で局所的に基質濃度が高くなる状況に注意する必要性を認識した。そして、物質輸送を担う輸送体の分子系統解析や活性測定によりその性質を明らかにすることに取り組んでいる。このように、情報処理や物質の流れの上流に位置し、生体の反応を大きく変化させうる因子に関する研究について解説する。

1. 動植物の低分子化合物認識に関する研究

1-1. マウス嗅粘液中で起こる匂い物質変換反応は匂い知覚に影響を与える

鼻腔内に入った匂い物質は、嗅粘液に溶け込み、嗅覚受容体に結合し、嗅神経細胞を活性化することで匂いとして知覚される。いくつかの嗅覚受容体は、生体と培養細胞系で応答特性に違いがあるが、その理由は不明であった。そこで、嗅粘液中の酵素が匂い物質を変換し、その結果匂い知覚に影響を与えるという仮説を立てた。まず、マウス嗅粘液と匂い溶液を混合し、GC/MS分析によって嗅粘液には匂い物質を代謝する酵素活性があることを見出した。次に、酵素の阻害剤処理前後で、嗅覚一次中枢である嗅球における匂い応答を比較した結果、嗅粘液中の酵素反応は活性化する嗅神経細胞の組み合わせに影響を与えていることが示唆された。最後に、変換を受ける匂い物質に

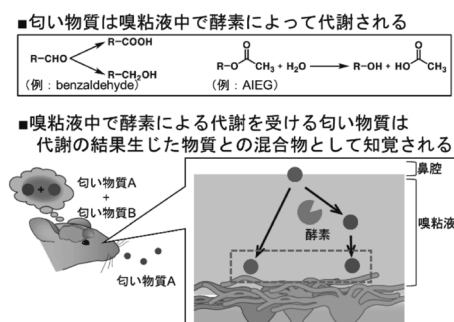


図1. 嗅粘液中の酵素は匂い知覚に影響を与える

対する知覚が阻害剤処理前後で変化するか行動実験により検証した。以上より、匂い物質が嗅粘液中で酵素によって代謝され、この反応が活性化される嗅覚受容体の組み合わせ、および匂い知覚に影響を与えることを明らかにした [1] (図1)。さらに、ヒトにおいても同様の現象が示された [2]。本研究は、匂い世界の少なくとも一部が嗅粘液というフィルターを通して作られているという新しい概念を提唱するものである。

1-2. 植物における揮発性化合物受容機構の解明

食害を受けた植物が放出する揮発性有機化合物によって周囲の無傷な植物の遺伝子発現が誘導され、抵抗性が上昇するといった植物における化学コミュニケーションの存在が明らかになってきた。しかし、その分子機構は明らかになっていない。そこで、分子の同定とその機能解析を目的とし、タバコ培養細胞および植物体を用いて、ストレス応答によって放出される揮発性化合物のうち (*E*)- β -caryophyllene とその構造類似体の分子構造を認識する受容体様因子を同定した [3] (図2)。

caryophyllene構造類似体と結合するタンパク質を同定するため、プルダウンアッセイを計画したが、(*E*)- β -caryophyllene には反応性の高い官能基がなく、プローブ作製が困難であった。そこで反応性の高い官能基を導入した (*E*)- β -caryophyllene 誘導体を2種類合成し、これを可能にした。プルダウンアッセイの結果が突破口となり、caryophyllene化合物群が細胞に入り、TOPLESS と結合することで転写因子複合体の形成を阻害し、転写抑制を解除するというモデルを提唱できた。

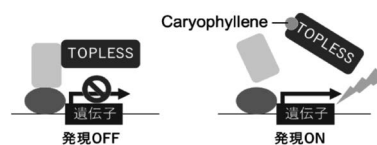


図2. 転写制御因子が揮発性化合物を受容する

2. 動物の低分子化合物輸送機構に関する研究

2-1. Aqp10 タンパク質の尿素・ホウ酸輸送活性の減弱が生じた進化上のタイミングを同定

アクアグリセロポリンは、水および電荷を持たない低分子化合物を通す輸送体であり、生体のグリセロールや尿素輸送において重要な役割を担う。これまでに、ヒト Aqp10 は水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送するが、トラフグ Aqp10 パラログである Aqp10.2b は尿素およびホウ酸を輸送しないことが示された [4, 5]。しかし、どちらの活性が祖先型であるか、また進化の過程でいつ基質特異性が変化したのかは不明であった。そこで、肉鰭類、条鰭類の古代魚、真骨魚類の Aqp10 の輸送活性を解析した。その結果、水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送する活性が共通した祖先型の性質であ

ること、また、水、グリセロールのみを輸送する活性が条鰭類のAqp10.2のみに限定された性質であることを明らかにした。これらの結果から、条鰭類Aqp10.2は進化の過程で尿素およびホウ酸の輸送活性を減弱させたことが示唆された [6] (図3)。

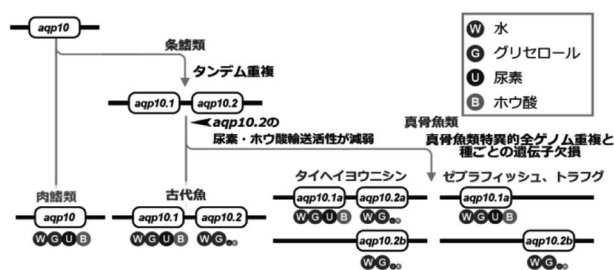


図3. *aqp10* 遺伝子の進化と輸送活性の変化

2.2. 脊椎動物における *slc12a10* 遺伝子の発現と偽遺伝子化および輸送活性の解析

進化の過程で海から淡水環境や陸に進出した脊椎動物は、低塩分環境において体液の塩濃度を保つため、 Na^+ - Cl^- 共輸送体である *Slc12a3* により尿中 NaCl を再吸収する。真骨魚類はさらに *Slc12a10* により、淡水中の塩を能動的に取り込む。*slc12a10* 遺伝子は真骨魚類が四肢動物と分岐した後に獲得したと考えられてきた。四肢動物は *Slc12a10* を持たないのか検証するため、真骨魚類の *slc12a10* 遺伝子と相同な四肢動物の遺伝子座を解析し、*slc12a10* 候補遺伝子を同定した。また、分子系統解析や Dot plot 解析を行い、*slc12a10* 遺伝子は一部の哺乳類、非鳥類型爬虫類、両生類にも存在し、偽遺伝子化や欠失は進化的・地理的に広く分布する様々な系統において独立に生じたことを明らかにした [7]。*slc12a3* 遺伝子と *slc12a10* 遺伝子の配列の類似性が高いことから、BLAST による相同性検索だけで *slc12a10* 候補遺伝子が *slc12a10* 遺伝子であると結論付けず、ゲノム上で遺伝子の並びが保存されているか確認し、さらに分子系統解析を行うことで確認を得た。

輸送活性の確定には複数の報告が重要であるが、*Slc12a10* についてはこれまで1グループからのウナギの例しかなく、筆者らの報告により *Slc12a10* が Na^+ - Cl^- 共輸送体であると確定した [8]。

おわりに

動物の匂い知覚に関する研究は、受容体から行動に至るまでの情報カスケードの解明が進んでいるが、受容体結合以前の反応については未解明であった。また、食害を受けた植物が放出する揮発性有機化合物によって周囲の無傷な植物の遺伝子発現が誘導され、抵抗性が上昇するといった現象が報告されているが、受容メカニズムは不明であった。筆者らの成果により、今後、嗅粘液中の酵素量の多寡に由来する匂い認識の個人差に左右されない香料の合成が可能となる可能性がある。また、香りを利用して抵抗性遺伝子の発現を誘導し、食害や病害に強い植物や有用な二次代謝物の産生を促進させた植物など、付加価値のある植物の作出といった農業への応用も期待できる。

膜輸送体の研究に関しては、Aqp10の活性が変化したタイミングを同定することで、配列や構造の比較を適切に行い、輸送基質選択に影響を与えるアミノ酸を見出せる可能性がある。

アクアグリセロポリンにおける水以外の輸送基質選択性を生み出す分子機構については未だ明らかになっておらず、本成果は他のアクアグリセロポリンの基質選択性に関する理解も大きく前進させる。将来的には新規基質の発見や、薬剤による輸送制御への応用が見込まれる。現在、本成果を活用し、輸送基質選択性を決めるアミノ酸残基の一部を同定して配列から活性を予測する研究に取り組んでいる。

(引用文献)

- 1) Nagashima, A. and Touhara, K., "Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception." *Journal of Neuroscience*, 30, pp16391-16398 (2010)
- 2) Ijichi, C., Wakabayashi, H., Sugiyama, S., Ihara, Y., Nogi, Y., Nagashima, A., Ihara, S., Niimura, Y., Shimizu, Y., Kondo, K., Touhara, K., "Metabolism of Odorant Molecules in Human Nasal/Oral Cavity Affects the Odorant Perception." *Chemical Senses*, XX, ppl-17 (2019)
- 3) Nagashima, A., Higaki, T., Koeduka, T., Ishigami, K., Hosokawa, S., Watanabe, H., Matsui, K., Hasezawa, S. and Touhara, K., "Transcriptional regulators involved in responses to volatile organic compounds in plants." *Journal of Biological Chemistry*, 294, 2256-2266. (2019)
- 4) Kumagai, S., Watanabe, E., Hayashi, N., Kimura, Y., Kamiya, T., Nagashima, A., Ushio, K., Imaizumi, G., Kim, J., Munakata, K., Umezawa, T., Hirose, S., Kasai, K., Fujiwara, T., Romero, M. F., Kato, A., "Boric acid transport activity of marine teleost aquaporins expressed in *Xenopus* oocytes." *Physiological Reports*, 11 (6), 15655 (2023)
- 5) Ushio, K., Watanabe, E., Kamiya, T., Nagashima, A., Furuta, T., Imaizumi, G., Fujiwara, T., Romero, M. F., Kato, A., "Boric acid transport activity of human aquaporins expressed in *Xenopus* oocytes." *Physiological Reports*, 10 (1), e15164 (2022)
- 6) Imaizumi, G., Ushio, K., Nishihara, H., Braasch, I., Watanabe, E., Kumagai, S., Furuta, T., Matsuzaki, K., Romero, M. F., Kato, A., Nagashima, A., "Functional divergence in solute permeability between ray-finned fish-specific paralogs of *aqp10*." *Genome Biology and Evolution*, 16 (1), evad221 (2024)
- 7) Motoshima, T., Nagashima, A., Ota, C., Oka, H., Hosono, K., Braasch, I., Nishihara, H., and Kato, A., " Na^+ / Cl^- cotransporter 2 is not fish-specific and is widely found in amphibians, non-avian reptiles, and select mammals." *Physiological Genomics*, 55 (3), 113-131 (2023)
- 8) Ota, C., Nagashima, A., Kato, A., "Electroneutral Na^+ / Cl^- co-transport activity of zebrafish *Slc12a10.1* expressed in *Xenopus* oocytes." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 327 (2), R152-R163 (2024)

謝 辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科生物化学研究室および東京科学大学生理工学院加藤研究室で行われました。研究の遂行にあたり、多大なご指導ご鞭撻を頂きました東原和成先生、加藤明先生に心から感謝申し上げます。また、共同研究者の檜垣匠先生、肥塚崇男先生、石神健先生、渡邊秀典先生、松井健二先生、馳澤盛一郎先生、西原秀典先生、古田忠臣先生、Ingo Braasch先生、松崎浩二様、Michael F. Romero先生に心より御礼申し上げます。一緒に研究してくれた学生の皆様に心より感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました小林彰子先生ならびに、いつも励ましてくださった東京科学大学の方々に深く感謝申し上げます。