

講座 食品生産工学

2.7.8 研究分野：生物機能変換学

構成員：	教授	村田 幸作
	准教授	橋本 渉
	助教	河井 重幸
	大学院博士後期課程	1名
	大学院修士課程	6名
	専攻4回生	2名
	博士研究員（PD）	3名
	研究員	7名

A. 研究活動（2010.4～2011.3）

A-1. 研究概要

a) 細菌細胞表層における高分子認識機構

Sphingomonas属細菌A1株は、細胞表層に巨大な孔「体腔」を形成し、そこから高分子多糖アルギン酸を直接細胞質に取り込む。A1株は運動性を示さず、鞭毛も形成しない。鞭毛繊維を形成するフラジェリンと相同性を示すA1株由来アルギン酸レセプターは細胞表層に局在し、アルギン酸と強固に結合する。そこで、レセプターの細胞表層への局在化機構について解析した。レセプターと相互作用するA1株の細胞表層タンパク質（SPH2681）及びその複合体（SPH2681/SPH2682）の立体構造を各々分解能2.4と3.0 Åで決定した。複合体は二つのヘテロ二量体（合計4サブユニット）を形成し、亜鉛要求性のペプチダーゼ活性を示した。その活性発現には、ヘテロ二量体におけるサブユニットドメインの開閉が重要である。従って、SPH2681は、単量体ではレセプターとの相互作用に機能するが、SPH2682とヘテロ二量体を形成するとペプチダーゼ活性を示すことが示唆された。

b) 多糖リアーゼの構造生物学

アルギン酸はグルロン酸 (G) とマンヌロン酸 (M) から構成されるヘテロ多糖であり、分子内に3つのブロック (ポリG、ポリM、ポリMG) 構造をもつ。全てのブロックに作用するエキソ型アルギン酸リアーゼ (Atu3025) は食品多糖アルギン酸のプロセッシングや緑膿菌バイオフィルムの除去に適しているため、その構造機能相関を解析した。活性を消失したAtu3025の部位特異的変異体H531Aとアルギン酸三糖 (Δ GGG) との複合体の立体構造を、分解能2.99Åで決定した。リガンドが結合していないAtu3025 (アボ型) の構造と比較すると、 Δ GGGを結合したAtu3025は α -ドメインと β -ドメインが閉じた構造に変化していた。つまり、リガンドが結合していない状態では活性クレフトはトンネル様の貫通した形状を示すが、基質が結合すると両ドメインの接近により活性クレフトはポケット状に構造変化する。このことから、本酵素の反応機構 (エキソ型活性) として、ポケットの底部にまで基質の直鎖アルギン酸が挿入され、触媒反応により末端糖が順次遊離することが明らかになった。

c) 大気窒素とグリセロールを用いた窒素固定細菌によるバイオポリマー生産

バイオディーゼル油製造の際に副生するグリセロールを炭素源として、空気中の窒素ガスを窒素源として、窒素固定細菌*Azotobacter vinelandii*による生分解性プラスチック素材 (ポリヒドロキシ酪酸: PHB) の生産系を解析した。*A. vinelandii*は、グリセロールを細胞内に取り込んだ後、キナーゼによりリン酸化し、脱水素酵素によりジヒドロキシアセトンリン酸に変換する。その後、TCAサイクルにて代謝する。スクロース或いはグリセロールを炭素源としてPHBの生産能を比較した。その結果、グリセロールで培養した場合に生育は低下したが、細胞内のPHB蓄積量は両者で同等であった。従って、大気窒素とグリセロールを用いた*A. vinelandii*による効果的なバイオポリマー生産の可能性が見出された。

d) 真核生物のNADP (H) 合成酵素 [NAD (H) キナーゼ] の構造

NADキナーゼ (NADK) は、 NAD^+ のリン酸化反応を触媒する。通常NADK (結核菌やヒト由来NADKなど) は、低いNADHリン酸化 (NADHキナーゼ: NADHK) 活性しか示さないが、例外的に、シロイヌナズナNADK3や出芽酵母のミトコンドリア局在型Pos5は高いNADHK活性を示すため、NADHKと呼ばれることもある。Pos5/NADH複合体の立体構造を決定し、結核菌由来NADK/ NAD^+ 複合体の立体構造などとの比較により、Pos5と結核菌由来NADKの基質結合部位の表面電荷の違いに大きく寄与する残基が見いだされた。本残基は一次構造上でも特徴的に保存されていた。Pos5の当該残基をNADK型に置換したところ、 NAD^+ に対する K_m とNADHに対する V_{max} が共に低下したことから、本残基が、Pos5が高いNADHK活性を示す構造要因の一つであると推察された。一方、シロイヌナズナNADK3遺伝子のホモログ (C5or33) をヒト第5染色体上に見出した。C5or33の機能解析を行った結果、本タンパク質が低 NAD^+ 濃度で機能する新奇NADKである可能性が示された。

e) 出芽酵母 NAD^+ 合成系の分子生物学

出芽酵母野生株ならびにNAD⁺ 合成系遺伝子欠損株を通常の完全合成 (SC) 液体培地 (3.3 μM ニコチン酸 [NA]を含む) および NA 非含有液体 SC 培地などで培養し、対数期および定常期におけるNAD⁺ 合成系遺伝子の転写量をqPCRで調べたところ、細胞内 NAD⁺ 濃度維持におけるキヌレニン経路の重要性を示す結果が得られた。さらに、tna1 (NA と QAの取り込み能が欠損) では、野生株では抑制される条件においても、BNA4 (NAD⁺ 合成系遺伝子の一つ) の転写量が高く保たれていた。これは、自らが細胞外に分泌した QA の再利用能が損なわれた結果と推察された。各欠損株をNA非含有液体 SC 培地で培養したところ、とりわけ tna1 の定常期における生存率 (経時寿命) が著しく低下した。本結果は、細胞外 QA の再利用の生理的重要性を支持した。

f) 出芽酵母を用いた酸素生物学

酸素ガス、とりわけ高濃度酸素ガスは、医療や健康促進の目的で頻用されているが、高濃度酸素に対する細胞の応答機序には未解明な点が多い。本機序解明のため、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を液体培地で対数増殖期まで好気培養し、100%酸素ガスに短時間 (5、15分間) 曝した。これにより転写量が変動する遺伝子をマイクロアレイで解析した。その結果、幾つかの遺伝子の転写量が上昇した。特に、ペルオキシレドキシンの修復反応に関わるSRX1の転写量が約30倍に増大した。100%酸素に曝した出芽酵母におけるSrx1の高発現を、ウェスタンブロッティングおよびGFP標識Srx1の蛍光顕微鏡観察により確認した。TSA1欠損株酵母を100%酸素ガスに曝すと、ミトコンドリア (呼吸鎖の複合体III) 阻害剤であるアンチマイシンA存在下でのみ、固体培地および液体培地で共に生育阻害を示した。したがって、高濃度酸素防御におけるミトコンドリアの機能およびSrx1/Tsa1の重要性が示唆された。

g) 海性バイオマスからの生物燃料生産

アルギン酸資化性細菌 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株に *Zymomonas mobilis* 由来ピルビン酸脱炭酸酵素 PDC とアルコール脱水素酵素 ADH の遺伝子を導入した改変株を用いて、アルギン酸からのエタノール生産系を至適化した。アルギン酸で培養した A1 株細胞を用いて、DNA マイクロアレイにより強力プロモーター SPH2987s を同定し、メタボロミクスにより乳酸蓄積の明らかにした。乳酸蓄積を抑制するため、乳酸脱水素酵素 LDH 遺伝子を破壊した A1 株を育種した。PDC と ADH 遺伝子の発現を SPH2987s により制御し、かつ PDC 遺伝子をマルチ (8) コピー化したプラスミドを作製し、LDH 遺伝子破壊 A1 株に導入した。本菌株は、培養 3 日間で最大 1.3% (w/v) のエタノールを培地中に蓄積した。また、別の海性バイオマス (マンニトール) 資化性酵母の探索を行った。その結果、マンニトール資化性酵母 14 株を見いだした。これらの株のマンニトールからのエタノール生産性を調べたところ、6 株がエタノールを生産した。本 6 株は、5% エタノール存在下でも生育したが 10% 存在下では生育できなかった。

h) 病原性細菌による宿主細胞外マトリックスの分解

連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼUGLは、哺乳動物の細胞外マトリックス（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、及びヘパリン）から、多糖リアーゼ反応により生じる不飽和二糖の全てに作用した。従って、本酵素はグルクロン酸とイズロン酸を含む全てのグリコサミノグリカンに由来する不飽和二糖を分解することが示された。連鎖球菌ゲノムにおいて、UGL遺伝子の近傍にヘパリンリアーゼIII（HepC）遺伝子を見出した。HepCの分子多様性を解析するため、各種DNA/タンパク質データベースを用いて、ホモログ遺伝子をもつ生物種を検索した。その結果、多数の連鎖球菌を始め、腸球菌、ウェルシュ菌やバクテロイデス菌など、哺乳類の細胞に感染する細菌群がHepC遺伝子をゲノムにもつことが分かった。また、それらのゲノムにおけるHepCの遺伝子座位がUGL遺伝子の近傍に位置することを明らかにし、ヘパリン分解系に関わるUGL遺伝子クラスターが病原性細菌と哺乳類細胞との相互作用に深く関わることを示唆した。

i) エンドファイティック窒素固定酢酸菌の分子生物学

Gluconacetobacter diazotrophicus (Gdi) は、サトウキビから単離されたエンドファイティック窒素固定酢酸菌であり、非マメ科植物体内に生息し、窒素固定などにより宿主植物体の生育に寄与する。Gdiを用いた非マメ科植物への窒素固定能などの賦与技術（Gdiを非マメ科植物へ定着させ、本宿主内でGdiの窒素固定能などを高発現させる技術）の確立が期待されるが、そのためにはGdiの生育挙動や窒素固定能の発現条件に関する理解が必要である。本研究により、窒素源存在下では高濃度のリン酸がGdiの生育を抑制し、低濃度のリン酸がGdiの生育を促進すること、および、窒素源非存在下では高濃度のリン酸がGdiの生育を促進し、低濃度のリン酸がGdiの生育を抑制することが明らかとなった。なお、これらの生育性の違いはpHではなく、リン酸濃度のみに依存した。以上の結果は、Gdiを用いて非マメ科植物に窒素固定能を賦与するためには、宿主植物中の窒素源濃度だけでなく、リン酸濃度も重要な因子となることを示唆した。

A-2. 研究業績（国内・国外含む）

a) 成果刊行

原著論文（書評論文を含む）

・Maruyama, Y., A. Ochiai, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Crystal structure of bacterial cell-surface alginate-binding protein with an M₇₅ peptidase motif. 査読有り Biochemical and Biophysical Research Communications 405; 411-416, 2011

・Nakamichi, Y., Y. Maruyama, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Structural determinants in streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase for recognition of glycosaminoglycan sulfate groups. 査読有り Journal of Biological Chemistry 286; 6262-6271, 2011

・Maruyama, Y., A. Chuma, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Heterosubunit composition and crystal structures of a novel bacterial M16B metallopeptidase. 査読有り Journal of Molecular Biology 407; 180-192, 2011

・Ochiai, A., M. Yamasaki, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*.
査読有り Journal of Biological Chemistry 285; 24519–24528, 2010

・Takase, R., A. Ochiai, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate
metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. 査読有り Biochimica et Biophysica Acta 1804;
1925–1936, 2010

・Maruyama, Y., A. Ochiai, T. Itoh, B. Mikami, W. Hashimoto and K. Murata:
Mutational studies of the peptidoglycan hydrolase FlgJ of *Sphingomonas* sp. strain
A1. 査読有り Journal of Basic Microbiology 50; 311–317, 2010

・Pham, T. A., S. Kawai, E. Kono, & K. Murata:
The role of cell wall revealed by the visualization of *Saccharomyces cerevisiae*
transformation. 査読有り Current Microbiology 62; 956–961, 2011

総説

・落合秋人、高瀬隆一、橋本 渉、村田幸作:
アルギン酸代謝酵素の構造と機能. ビタミン 84; 525–531, 2010

・Kawai, S., W. Hashimoto & K. Murata:
Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: Methods and possible
underlying mechanism. Bioengineered Bugs 1; 395–403, 2010

報告書・その他

・Nakamichi, Y., Y. Maruyama, R. Takase, Y. Nishitani, B. Mikami, W. Hashimoto and
K. Murata:
Loop movement over the active cleft in streptococcal unsaturated glucuronyl
hydrolase. SPring-8 User Experiment Report, 2010A1279

・Nakamichi, Y., Y. Maruyama, R. Takase, Y. Nishitani, B. Mikami, W. Hashimoto and
K. Murata:
The flexible catalytic residues prerequisite for activity expression in bacterial
glycosaminoglycan-degrading enzyme. SPring-8 User Experiment Report, 2010B1149

b) 学会発表

- ・日本農芸化学会2010年度大会(9件)
- ・日本農芸化学会関西支部大会(3件)
- ・第11回関西グライコサイエンスフォーラム(1件)
- ・日本ビタミン学会第62回大会 (1件)
- ・第83回日本生化学会大会 (1件)
- ・日本生物工学会2010年度大会 (1件)

A-3. 国内における学会活動など①

所属学会等 (役割)

・村田 幸作：日本農芸化学会（全国評議員・「化学と生物」編集委員長）、日本農芸化学会（倫理に関する特別委員会委員）、日本農芸化学会（全国評議員）、日本農芸化学会（役員選考委員会委員）、日本農芸化学会（和文誌「化学と生物」編集委員長、日本農芸化学会（関西支部評議員）、日本農芸化学会（（財）農芸化学研究奨励会評議員、日本農芸化学会（鈴木梅太郎先生ビタミンB1発見100周年記念事業実行委員会委員、日本生物工学会（評議員）、日本生化学会（評議員）、日本ビタミン学会（評議員）、日本食品科学工学会（関西支部評議員）

・橋本 渉：日本農芸化学会（代議員・2011年度大会プログラム委員、シンポジウム委員）、日本生物工学会（代議員）、酵母研究会（運営委員）

・河井 重幸：日本農芸化学会（日本農芸化学会2011年度大会 プログラム編成委員会委員）

A-3. 国内における学会活動など②

競争的資金等獲得状況

①科学研究費補助金

・基盤研究(B)：村田 幸作：細菌鞭毛フラジェリンの構造機能相関と細胞表層局在化機構

・挑戦的萌芽：村田 幸作：窒素輸送タンパク質の同定による細菌の窒素固定反応制御機構の解析

・基盤研究(C)：橋本 渉：連鎖球菌におけるヘパリン分解・輸送系の構造・機能相関とその感染症への関与

・若手研究(B)：河井重幸：出芽酵母におけるNADP(H) 合成および分解系の制御機構

②その他の競争的資金

・生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業：村田幸作：海性バイオマス（アルギン酸）からのエタノール生産基盤

・文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム：橋本 渉：多糖の輸送・分解に関わる細菌由来超分子の構造生物学とその食品・環境分野への応用

・最先端・次世代研究開発支援プログラム：河井重幸：酸化還元系制御細菌による海洋バイオマスからの実用的エタノール生産

・社団法人 発酵研究所 平成22年度一般研究助成：河井重幸：キノリン酸の利用ならびに合成に着目した出芽酵母の新規NAD合成経路

A-4. 国際交流・海外活動①

所属学会等（役割）

・村田 幸作：Bioengineered Bugs（International Editor）、American Society for Microbiology（Member）、American Society for Biochemistry and Molecular Biology（Member）

・橋本 渉：Applied Microbiology and Biotechnology（Editor）、American Society for Microbiology（Member）

B. 教育活動（2010. 4～2011. 3）

B-1. 学内活動

a) 開講授業科目（担当教員）

・学部：食品微生物学（村田）、生物機能変換学（村田・橋本）、食品生物科学入門及び演習（村田・橋本）、専門外国書講読II（橋本分担）微生物学実験及び実験法（橋本・河井分担）

・大学院：食品生産工学特論（村田分担）、生物機能変換学特論（村田・橋本）、生物機能変換学演習（村田・橋本）、生物機能変換学専攻実験（村田・橋本）

C. その他

・村田幸作：（財）応用菌学研究所（理事）、文部科学省科学技術政策研究所 科学技術動向研究センター（専門調査員）、（独）日本学術振興会「最先端・次世代研究開発支援プログラム」審査委員会委員、（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構産業技術実用化開発助成事業に係る申請者の事前評価（委員）、（独）農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター 「イノベーション創出基礎的研究推進事業」（書類審査専門委員）、（財）アサヒビール学術振興財団（選考委員）、World Innovation Foundation (Fellow)、Deputy Director General of the International Biographical Center (Director)、京都市保健福祉局 京・食の安全衛生管理認証制度（委員長）

特記事項：

平成21年度日本農芸化学会大会において、本分野から発表した下記の研究がトピックス賞に選ばれた。

演題：体腔形成細菌の分子育種による海洋バイオマスアルギン酸からのエタノール生産

この研究は、その後、日本の全国紙（朝日・読売・毎日新聞）、京都新聞（TV報道もあり）や産業関連新聞にて報道され、広く社会の関心を得た。また、NHKから全世界に向けて発信される準備が進んでいる。