

参 考 資 料

資料 1 内部評価資料(中間)

資料 2 内部評価資料(最終)

資料 3 外部評価資料(中間)

資料 4 外部評価資料(最終)

資料 5 商品化事例

資料 6 技苑「プロジェクト研究報告概要」

資料1. 内部評価（中間）

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に係る
研究プロジェクトの進展状況チェックシート

（評価者）

プロジェクト名：次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究	
研究期間：平成 25 年度 ～ 平成 29 年度	研究代表者（評価責任者）：老川 典夫
評価対象期間：平成 25 年4月 ～ 平成 28 年 9 月	評価日：平成 26 年 9 月 9 日

上記の評価対象期間における本研究プロジェクトの研究進捗状況等は、以下のとおりである。

1.研究組織について

- ①研究プロジェクトを効率的・効果的に遂行するための責任ある研究体制となっているか。

☒はい【状況について：専任教員 5 名、先端科学技術推進機構研究員 1 名、客員研究員 1 名、学外研究員2名、ポスドクトラルフェロー1 名、定時職員2名の効率的・効果的に研究プロジェクトを遂行できる研究体制となっている。】

☐いいえ【理由と対応策】
- ②研究者間・研究チーム間の調整・連携はとられているか。

☒はい【状況について：定期的にプロジェクトミーティングを開催し各研究者の研究の進捗状況の確認を行うとともに研究チーム間で情報共有と連携を行っている。】

☐いいえ【理由と対応策】
- ③研究支援体制は整っているか。

☒はい【状況について：本学先端科学技術推進機構に所属する専任の事務職員が予算管理や物品調達を支援している。】

☐いいえ【理由と対応策】
- ④大学院学生・PD 等を活用し、若手研究者の育成を行っているか。

☒はい【状況について：本研究プロジェクトに専従の PD を雇用し、次世代ベンチトップ型シーケンサーのオペレーションができる生命科学の次世代を担う若手研究者の育成を行っている。】

☐いいえ【理由と対応策】
- ⑤共同研究機関等との連携はとられているか。

☒はい【状況について：大阪大学蛋白質研究所、倉敷紡績（株）技術研究所と連携を行っている。】

☐いいえ【理由と対応策】

2.研究施設・設備等の利用について

- ①研究施設の整備、プロジェクトに適合した装置設備の整備、装置・設備の利用はなされているか。

☒はい【状況について：本学ハイテクリサーチコアに本研究プロジェクトの拠点実験室を設け、次世代ベンチトップ型シーケンサーをはじめ本プロジェクトの遂行に必要な機械装置類を適切に配置し利用している。】

☐いいえ【理由と対応策】

3.研究計画の進捗(達成)状況、これまでの研究成果等について

- ①構想調査提出時（中間評価を終えた拠点では進捗状況報告書提出時）の計画と対比して、研究は進展しているか（達成度）

☒はい【状況について：当初計画よりも早く次世代ベンチトップ型シーケンサーを用いてサンプルの解析を開始し新規なデータを得つつある。】

☐ いいえ【理由と対応策】	】
②当初計画と差異が生じているか。 ☒ 生じていない ☐ 生じている【理由と対応策】	
】	
③克服すべき問題点は生じているか。 ☒ 生じていない ☐ 生じている【理由と対応策】	
】	
④今後の研究方針(最終年度の場合は、期間終了後の展望)は確立しているか。 ☒ はい【方策について: 当初研究計画通り研究を実行し構想調書提出時の目標を達成する。】 ☐ いいえ【理由と対応策】	
】	
⑤構想調書に記載したメンバー全員の研究成果は公開されているか。 ☒ はい【状況について: 各メンバーがそれぞれ研究成果を公表している。】 ☐ いいえ【理由と対応策】	
】	
4.評価体制について ①自己評価は実施しているか。 ☒ はい【状況について: 定期的にプロジェクトミーティングを開催し各研究者が研究の進捗状況について自己評価を行っている。】 ☐ いいえ【理由と対応策】	
】	
②外部評価は実施しているか。 ☐ はい【状況について】 ☒ いいえ【理由と対応策: 構想調書記載の通り研究開始後 3 年目及び 5 年目に実施する。】 ※3 年目及び 5 年目の年度当初のみ、外部評価結果の概要を添付してください。	
】	
③評価結果を反映しているか。 ☒ はい【状況について: 評価結果を反映して研究計画に遅れを生じないように研究を遂行している。】 ☐ いいえ【理由と対応策】	
】	
5.外部の研究資金の導入状況について ①当該プロジェクトに関連する受託研究等、指定寄付、科研費等について獲得しているか。 ☒ はい【状況について: 平成26年度受託研究2件、科研費1件を獲得している。】 ☐ いいえ【理由と対応策】	
】	
6.留意事項への対応について ①採択時の意見または留意事項への対応について(該当の有無) 該当なし ☐ はい【対応内容:】 ☐ いいえ	
】	
②中間評価時の留意事項について(中間評価を終えた拠点のみ)(該当の有無) 該当なし ☐ はい【対応内容:】	
】	

☐いいえ

7.特記事項

研究者の変更が生じた場合はその旨を記入

【土戸哲明教授が定年退職のため本プロジェクトの研究者として研究に従事できなくなり、研究プロジェクト全体の研究力をさらに向上させるため細見亮太助教を本プロジェクトの研究者として追加した。】

※用紙が足りない場合は適宜複写してください。

外部資金審査・評価部会からの意見等

平成 26 年 12 月 22 日

研究代表者

先端科学技術推進機構

理工学研究科

老川 典夫 教授

研究推進委員会 外部資金審査・評価部会長

(戦略的研究基盤形成支援事業関係)

前田 裕

研究代表者の先生におかれましては、ご多用中、種々ご協力をいただき、誠にありがとうございます。

貴プロジェクトにおかれましては、平成 27 年度に中間評価を迎えることとなりますので、学内における研究プロジェクト支援（進捗管理）の一環として「進捗状況チェックシート」及び「研究成果の概要（3 年目）」をご提出いただきました。

外部資金審査・評価部会において、研究の進捗状況について検討させていただきました結果、各委員から以下のようなご意見を頂きましたので、ご報告申し上げます。

なお、今回は、専門的な研究内容よりも、共同研究としての組織的な取り組みが行われているかどうかという観点を中心に検討いたしました。

研究進捗状況報告書作成に際して、これらの意見をもとに、ご対応いただければ幸いです。

記

項目	コメント
1. 研究組織 について	特に問題なし。
	研究は順調に遂行されている。
	特に問題視すべき点はみられないと考えます。特記事項にもあるように退職された研究者に代わる人材も加えられており、当初計画の実施が可能な研究体制にあると考えられます。 研究者間の調整や連携も計画通りに進められていますが、成果報告を読ませていただく限り、その成果が示されていないように感じます。すなわち、同じ実験装置を用いて各グループが別個に研究を行い、その成果を発表しているだけ、と見えてしまうのが残念に感じます。 本経費が「研究拠点形成」にかかるものである以上、各グループの成果を統括して、今後の研究につながる大きな 1 つの土台を作っていただくように望んでおります。
2. 研究施設・設備等に	成果が上がっているのがその証拠であろうと思料します。
	研究成果を見るかぎり、装置の使用状況は適切である。

外部資金審査・評価部会からの意見等

ついて	予算申請された装置を含め、学内の装置を活用して研究が進められており、特に問題はないものと考えられます。
3. 研究計画の進捗（達成）状況・研究成果等について	問題なし。査読付き論文などはこれから多く出てくるものと期待する。
	研究を始めて1年半であり、その成果も学術論文として投稿されており、問題ない。
	26年度の研究は現時点では未完であるが、おおむね計画通りに進行していると考えられます。 ただ、申請書の計画では「確立する」、「同定する」等の文言が使われているのに対して、報告書では「調整した」、「解析を完了した」等の文言になっている点が気になります。上記3でもコメントさせていただいたとおり、現状では各グループが特定の目的の研究（もちろんそれらが重要なことは認識しております）を別個に行っているように感じます。「研究拠点形成」を目的とした経費ですので、本研究期間の終了後の研究につながるような配慮を今後入れていただければ、と思います。
4. 評価体制について	問題なし。
	今回の中間報告では問題になることは無いと思料します。
	計画通り、3年目の外部評価を受けていただくようお願いいたします。
5. 外部の研究資金の導入状況について	これも順調であるようにみえる。
	5名の教員で科研費1件は正直少ない。もう少し努力が必要かと思料します。
	今後も外部資金の獲得にご努力いただければと考えます。
6. 留意事項への対応について	（該当しない。）
7. 特記事項について	問題なし。適切に対応している。
	特に問題ない。
	退職された研究者に代わる人材も加えられており、研究体制を維持されていることはよいことと考えられます。
8. 総合所見	順調に推移しているように思える。阪大や倉紡との共同研究あるいは連携がどのような効果を生んでいるのか、また状況はどのようなものであるか、記載があればよかったと思います。
	外部資金をもう少し積極的に獲得していただきたい。 ゲノム解析の先にどのような科学・社会への貢献があるのか、わかりやすく記述してほしい。
	まだ、研究開始から1年半がたった段階で評価は難しいのですが、おおむね順調に研究が進行している、と考えられます。 繰り返しになって申し訳ありませんが、現時点では各研究グループが同じ装置を用いて、特定の研究を別個に行っているように見えてしまいます。もちろん、研究されている内容

外部資金審査・評価部会からの意見等

の重要性はわかるのですが、本研究期間が終了して、今実施されている研究に区切りがついたら、と考えてしまいます。

「研究拠点形成」という観点を次回報告書には入れていただければよりよいのではないのでしょうか。その意味からも、申請書の研究計画の文面にも記述しておられた、「手法を確立する」という文言が生きてくるのではないかと考えられます。また、研究グループ間のより積極的な連携も「研究拠点形成」の1つのキーになるものと思います。

本研究により形成を試みられた「研究拠点」を活用して、本研究の申請内容を超えるような新たな研究につなげていかれることを期待しております。

以 上

資料2. 内部評価（最終）

2017 年 9 月 11 日

「次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究」

研究代表者

先端科学技術推進機構

化学生命工学部・教授・老川 典夫 殿

研究推進委員会 外部資金審査・評価部会長

吉田 宗弘

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に係る最終評価（5 年目）の結果について

このたびご提出いただきました研究成果報告書（学内評価用）につきまして、研究推進委員会の専門部会である外部資金・審査評価部会において評価した結果について、下記のとおりご報告申し上げます。

つきましては、評価結果を踏まえ、来年 5 月末日締切の文部科学省への報告書作成に向けたとりまとめをお願いするとともに、引き続き研究の適切な遂行に努めていただけますと幸いです。

記

＜総合評価点＞ 2. 50

※総合評価点の凡例

4：優れた成果がみられた 3：成果がみられた 2：やや不十分であった 1：成果があがらなかった

＜評価における主な意見＞

- ・個々の研究については進展が見られる一方、中間評価でも指摘されているように、同じ機器を利用する個別の研究の集まりという懸念が解消されていないとみなされる。戦略的研究基盤の形成という意味では、テーマの明確化が必要と思われる。
- ・研究課題が統合的健康生命研究とあり、ゲノム解析は見えるが、課題の統合的健康生命が見えにくい。D-アミノ酸強化黒酢の成果のみならず、各課題を統合的に研究していく必要がある。
- ・科研費の獲得状況が優れない。重要なテーマであり新たな装置が導入されたのであれば、それ相応の研究成果に基づいて基盤研究Cや若手研究の種目ではなく、ゲノム解析などを通じた、本拠点の課題である統合的な研究として、基盤研究AやBを申請、採択されるべきものと思う。問題の基本は、いかにゲノム解析などを通じて課題である統合的な研究がなされたかによるであろう。
- ・外部評価について、中間評価で指摘された事項が、最終でも同様のコメントが付されている。これは研究メンバー間で、十分なコミュニケーションや連携がなされなかったことを示しているのではないか。

以 上

資料3. 外部評価（中間）

「次世代ベンチトップ型シーケンサーによる
ゲノム・エピゲノム解析の基づく統合的健康生命」

◆ 外部評価委員

- ・中嶋 欽一 九州大学大学院 医学研究院 教授
- ・舘 博 東京農業大学 短期大学部 醸造学科 教授
- ・吉村 徹 名古屋大学大学院 生命農学研究科 農学部 教授

◆ 評価日 平成27年6月-7月

◆ 評価結果

評価項目		評価コメント
[1]	評価	【本プロジェクトは、当初の計画に沿って着実に進展しているか？】
研究組織(研究の実施体制)の適切性	3+	・導入されたシーケンサーも稼働している状況が伺える。ゲノム配列も順調に決定されている。 ・研究グループ1および2については当初の計画通りに着実に研究を進展させているように思われる。一方、研究グループ3はSMTに着目した植物のセレン代謝を当初の研究課題としているが、平成25年度、26年度の成果にはこの結果はなく、行った研究は垂鉛耐性に関するものである。また、本研究プロジェクトの課題である「次世代シーケンサーの導入の貢献も明確でない。
	3	
	3	
[2]	評価	【特に優れている点】
研究プロジェクトの進捗状況・研究成果	4	・決定された配列について細かく解析されている。また、学会などにおける発表や外部資金の獲得努力も評価出来る。 ・研究グループ1のD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析、およびビスフェノールA分解菌のゲノム構造解析については、本研究プロジェクトのテーマに沿った着実な進展が認められる。
	3	
	2+	
[3]	評価	【問題点・今後の課題】
その他	-	・これまでの研究展開で得られた各プロジェクトにおけるノウハウの共有が成されているかどうかの記載がなくはっきりしないが、研究の迅速かつ効率的な展開のためにも是非とも共有を図って欲しい。また、研究者活用・育成に関して、この間にどのようなポジションで何人を雇用し、どのくらい共同の研究発表会を行い、その際どのような進展が見られたかなどの具体的な記載をして欲しい。そのような機会を研究展開に役立ててもらいたい。神経系の研究に関しては、本研究で得られた成果をどのようにして、治療法開発へと結び付けるのか、もう少し具体的な記載が望まれるとともに、実現に向けた研究展開に期待したい。また、構想調書に記載されているような、「生物種の枠を超えた研究」であるからこそ得られる結果で有ることをはっきりと示すことが出来る研究展開にも期待したい。 ・今後、研究チーム間の連携を図り、研究成果の進展を期待する。 ・研究グループ3の垂鉛耐性に関する研究成果自体は評価すべきものであり、「統合的健康生命研究」の範疇に入るものと考ええる。しかし、当初の研究計画からは逸脱しており、今後とも継続するのであれば、「当初の研究計画からの変更」を申告すべきではないだろうか。また「次世代シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析」については本プロジェクトの主題をなしており、より力を傾注して行かざるを得ないと思う。なお、各グループ間の連携がもう少し目に見えるものになることを期待する。
	3	
	3	
[総合評価]	評価	【期待される研究成果】
	4	・分子育種の促進、有害微生物除去法開発などの実現が期待できる。 ・各研究グループの当初計画が達成されれば、それらの結果が「健康の維持・増進」に貢献するであろうことは言うまでもない。また、微生物、植物、動物のゲノム・エピゲノム解析がどのような意義を有するかを示すよい例になるものと期待される。
	3	
	2+	

[評価記号について]

それぞれの評価項目の＜評価記号＞欄は下記の1～4を用いて記入されています

- 4 研究活動設定された目的は十分達成され、期待以上の成果があがっている
- 3 設定された目的は概ね達成され、期待通りの成果があがっている
- 2 設定された目的はある程度達成されている
- 1 設定された目的は十分には達成されていない

資料4. 外部評価（最終）

「次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析の基づく統合的健康生命」

◆ 外部評価委員

- ・中嶋 欽一 九州大学大学院 医学研究院 教授
- ・舘 博 東京農業大学 短期大学部 醸造学科 教授
- ・吉村 徹 名古屋大学大学院 生命農学研究科 農学部 教授

◆ 評価日 平成29年5月

◆ 評価結果

評価項目		評価コメント
[1]	評価	【本プロジェクトは、当初の計画に沿って着実に進展しているか？】
研究組織（研究の実施体制）の適切性	4	・微生物のゲノムやプラスミドの全配列の決定が終了しているものがある中で、次世代シーケンサーが十分活用されず、必要なデータが揃っていない研究者が多く存在する。ただし、次世代シーケンサーを必要としない側面からの研究も必要であり、その点については他の研究でも進展していると考えられる。 ・チーム3において、次世代DNAシーケンサーを用いる解析ができていない。 ・グループ間で進捗に差があるものの、各研究グループとも当初の計画に沿って着実に研究を進めているものと評価する。
	4	
	3	
[2]	評価	【特に優れている点】
研究プロジェクトの進捗状況・研究成果	3	・微生物・動物・植物という異生物研究者が連携して大きな目的に向かって取り組むという発想は素晴らしい。 ・多くの研究成果を学術論文として投稿している。 ・微生物グループでは、当初の目的であった乳酸菌の全ゲノム解析やSphingomonas AO1株の全ゲノム解析などを達成し、それぞれMa1Yの機能、BPA分解の不安定性の要因などに新たな知見を得ている。また、動物のエピゲノム解析研究でのnur77ファミリー遺伝子と神経突起伸長の関連に関する一連の研究については、より深い理解を目指そうとする研究姿勢が窺われる。
	3	
	3	
[3]	評価	【問題点・今後の課題】
その他	3	・異種生物のデータ取得に関して得た情報を各研究者がさらに共有し、次世代シーケンサーを用いない研究結果と結合して、本プロジェクトの目的・意義でもある「世界的な健康生命研究拠点形成」を目指して欲しい。また、ある物質を合成する、あるいは分解する菌や酵素を利用するというものと異なり、神経系疾患への本プロジェクトによる成果の応用の際には、さらなる具体的な戦略の捻出が必要である。 ・研究チーム間の連携を図り、さらなる研究成果を期待する。 ・評価項目1の「研究組織の適切性」の中の共同研究者間・研究チーム間の連携について、成果報告書を読む限りにおいては物足りなく感じる。微生物、動物、植物それぞれの研究の進展が相互に影響を及ぼし、新たな知見、研究課題は研究方法などが生まれることを期待したい。また、最終年度に向けて、研究成果の公開により積極的に取り組まれることを希望する。
	-	
	-	
[総合評価]	評価	【期待される研究成果】
	3	・D-アミノ酸の大量安価生産が一番実現可能のように思われる。 ・健康生命科学における実用化が期待される。 ・微生物グループの研究については、当初設定した研究目的である「乳酸菌の全ゲノム解析やSphingomonas AO1株の全ゲノム解析」はほぼ達成されるものと期待している。 ・動物グループでは、「神経細胞分化（神経突起伸長）に関するエピゲノム解析」、植物グループでは、「シロイヌナズナのセレン耐性におけるAtHMT-3の意義」など、いずれも当初の目的の研究課題も中の基礎的な部分についての研究成果が見込めるものと考えている。
	3	
	3	

【評価記号について】
それぞれの評価項目の＜評価記号＞欄は下記の1～4を用いて記入されています

4	研究活動設定された目的は十分達成され、期待以上の成果があがっている
3	設定された目的は概ね達成され、期待通りの成果があがっている
2	設定された目的はある程度達成されている
1	設定された目的は十分には達成されていない



大学発 産学連携 関西大学 × 福山黒酢(株)



— D-アミノ酸強化食品の開発と販売 —



鹿児島県のシンボル桜島を一望する鹿児島県霧島市福山町。南国の温暖な気候と豊かな自然に恵まれたこの町は「黒酢の郷」として知られています。この地で、江戸時代から続く伝統製法で造られている黒酢「桝志田」に、**国産の新鮮な生のフルーツをたっぷり漬けて作られた生フルーツ黒酢**は、フルーツと黒酢桝志田の旨味をお楽しみいただけます。

今回は、関西大学 化学生命工学部の老川典夫教授と福山黒酢(株)桝志田との共同研究により 開発された**D-アミノ酸強化黒酢**を使用しております。

黒酢もろみから分離した**D-アミノ酸高生産乳酸菌**を黒酢仕込み時に加えて醸造した黒酢の中には、**D-アミノ酸**(美容アミノ酸・旨味アミノ酸)が**豊富**に含まれています。



関大パンセアンテナショップにて好評発売中
“D-アミノ酸の醸し出すコクと旨味”を是非お試し下さい。

関大パンセアンテナショップURLおよびQRコード

<https://www.kandaipenseeshop.jp/products/detail/28>



TEL: 06-6368-0011



ピュアミノセット 2,880円【税込】

- ・生フルーツ黒酢 りんご 100ml×1
- ・生フルーツ黒酢 ブルーベリー 100ml×1
- ・生フルーツ黒酢 いちご 100ml×1 (季節により変更)

特許 第6060456号

KANDAI
Pensee

研究心と豊かな発想で生まれた、大学のおいしい成果を一堂に。



5/18(木) → 23(火) 新宿高島屋
1階催会場

主催：NPO法人「プロゾク」代表、
幹事：フードアクション・ニッポン

大学×名店



魚千陽
(飲食人大学)

全店：NPO法人「プロジェクト88」
 総店：フードアクション・ニッポン会館5F

店とコラボレート

名店

イート・イン

江戸前に盛りだくさんコース(1人前、約煮、揚げ、焼、水餃子、小鉢、ケラ焼、飯糰) 4,500円 ◆「大塚屋」が誇る「大塚屋」の味を堪能してください。



東

安全な社員の研究
成果をおしやねに求し
んではしいです。
東京大学 学生

仁心仁術

太

しさが
出され
てなし
きさま
も
トに
ア

ザ
カ
バ

東京大学バイオマス・シア開催
が注目した、優れた清浄性を持つ
海洋深層水で浄化された牡蠣を、
東京駅八重洲の人気オイスターバーが
プロデュース。
オイスターバーの海洋深層水
蒸し牡蠣
(1人前、3割セキ)……1,200円
(各日200食限り)
グラスワイン〈白〉
(1杯)……………500円



四川大学

はちみつ本来の旨さが
生きたパンができました。
玉川大学 学生

味も香りもしっかりとした「トク」を選びました。はちみつのかき方を一冊に伝えていきたいです。
【シニフィアンとワエ】
シェフ 古閑

シリフィアン・シリフィエ

玉川大学が監修する「たしがわはちみつ」シリーズの中から「トチ」を使い、世田谷の人気ベーカリーが焼き上げました。

「トチ」のはちみつバケット
(1個)..... 518円(※850円限り)

「トチ」のはちみつクグロフ
(発酵菓子)
(1個)..... 2376円(※1040円限り)

資料6-1. 2013年度 技苑「プロジェクト研究報告概要」

戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

研究代表者：老川 典夫
研究担当者：吉田 宗弘・池内 俊彦・下家 浩二・土戸 哲明・
松村 吉信

1. はじめに

老川典夫*

これまでの生命科学の進歩は、遺伝子DNAの塩基配列（ゲノム情報）の解読による所が大きい。この過程には、プライマーを蛍光標識する方法（第1世代）やターミネーターを蛍光標識する方法（第2世代）のDNAシーケンサーが貢献してきた。しかし、近年の生命科学では、さらに進化した次世代DNAシーケンサーが登場し、逐次DNA合成を用いた超並列シーケンシングとメタゲノム解析（生物群の中の多数の個体のゲノム情報を同時に得る）が可能となり、これを用いたゲノムとエピゲノム解析が急速に進んでいる。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーを2機種導入し、それにより従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同で行う。同一の研究方法のもとに連携し発展させ、シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させる。そして、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物（D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌）の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物（食品汚染菌）の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目的とする。したがって、研究体制は、対象とする生物種の違いにより3研究チーム（微生物ゲノム研究チーム、動物細胞エピゲノム研究チーム、植物細胞エピゲノム研究チーム）から構成するが、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて、同一の研究方法のもとに連携を図るものである。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーという同一の研究方法のもとに、多方面の研究分野を包括し発展させ、ヒトの健康向上を目指して、

共同研究を行う。したがって、本プロジェクトは、ゲノム・エピゲノム健康生命科学というべき新しい研究分野を切り開く共同研究である。

2. 次世代シーケンサーによるD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析

加藤志郎**、老川典夫

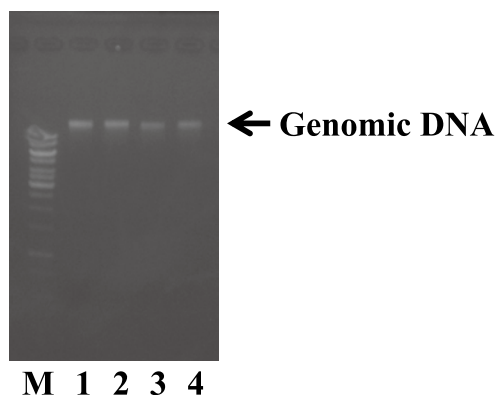
本研究で対象とする乳酸菌は、乳酸桿菌2株（*Lactobacillus sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145）および乳酸球菌2株（*Lueconostoc mesenteroides* LT-38、*L. mesenteroides* LK-151）の4菌株である。これら4株のうち *L. sakei* LK-145 および *L. mesenteroides* LK-151 は酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株であり¹⁾、*L. sakei* LT-13 および *L. mesenteroides* LT-38 はその対照となるコントロール株である。これら4菌株の乳酸菌はいずれもそのゲノムDNAの塩基配列が解読されていない。本研究では、D-アミノ酸高生産株およびコントロール株のゲノムDNAの全塩基配列を次世代シーケンサーを用いて解読・決定し、両者を比較解析することで、乳酸菌によるD-アミノ酸高生産機構をゲノムレベルで解明することを目的とする。

まず、MRS液体培地（pH 6.2）を用いて上記4菌株の乳酸菌を培養し、菌体を回収した。なお、*L. sakei* LT-13 および *L. mesenteroides* LT-38 の2株は凍結乾燥状態で保存された菌体を同様のMRS液体培地を用いた回復培養を行った後に培養・集菌した。各乳酸菌について、それぞれ30℃で24時間培養した培養液5 ml相当の菌体からDNeasy Blood and Tissue Kit（Qiagen）を用いてゲノムDNAを抽出・精製した。吸光光度計を用いて精製したゲノムDNAの収量算出を行うとともに、吸光度測定およびアガロースゲル電気泳動による純度評価を行った。アガロースゲル電気泳動解析の結果、各DNA

* 化学生命工学部教授 農学博士

** 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士（農学）

は単一バンドにて精製されたことが確認された（図1）。各精製DNAのOD₂₆₀/OD₂₈₀の値はいずれも1.8～1.9程度であり、高純度のゲノムDNAを得ることに成功した。また、それぞれのゲノムDNAの収量は4～5 µgであった。



M: DNA Marker (200 ng)
1: *L. sakei* LT-13 (40 ng)
2: *L. mesenteroides* LT-38 (40 ng)
3: *L. sakei* LK-145 (40 ng)
4: *L. mesenteroides* LK-151 (40 ng)

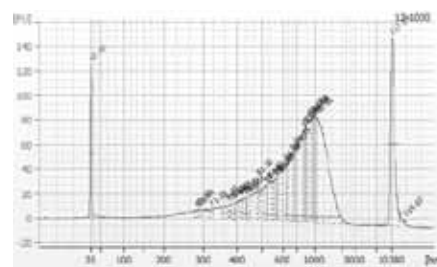
図1 菌体より抽出した各乳酸菌のゲノムDNA

次に、各乳酸菌ゲノムの全塩基配列を解読するため、精製したゲノムDNAの断片化を行った。ゲノムDNAの断片化には超音波処理によるDNA断片化装置DNA Shearing System M220 (Covaris inc.) を用いた。塩基配列決定の鋳型として用いるにあたって、適切なサイズにゲノムDNAを断片化するために、断片化条件の検討を次のように設定した5つの条件にて行った。超音波処理条件は、①Duty Factor 5%、Treatment Time 60 sec、②Duty Factor 5%、Treatment Time 80 sec、③Duty Factor 7.5%、Treatment Time 60 sec、④Duty Factor 7.5%、Treatment Time 80 sec、⑤Duty Factor 10%、Treatment Time 60 secとした。なお、断片化には500 ngのゲノムDNAを溶解した130 µlのTE溶液をサンプルとして用いた。超音波処理後はQiagen Mini Elute Column Kit (Qiagen) を用いて精製し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて断片化したDNAのサイズを評価した。2100 Bioanalyzerによる解析の結果（図2）、ゲノムDNAは条件①および②においては1,000～1,100 bpに、条件③～⑤においては900～950 bpに断片化されることが明らかとなった。次世代シーケンサーによるショットガン解析において600～900 bpのサイズのDNA断片を鋳型として用いるため、③～⑤の条件が適当であると考えられた。しかしながら、③および④の条件において断片化した際のサンプルには⑤の条件において断片

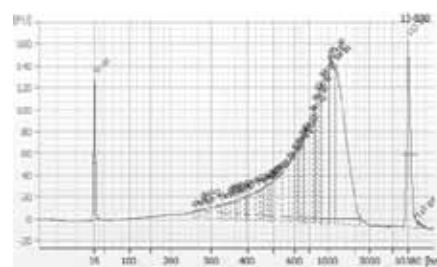
化した際のサンプルと比較して、300 bp以下の小断片が多く含まれていた。このようなサイズの小さすぎる小断片は塩基配列解読・決定のための鋳型としては適切ではない。これらの結果から、本研究においては⑤の条件においてゲノムDNAの断片化を行うことが最も適切であると考えられた。

これまでに、上記条件検討の結果決定した最適条件にて当該の4菌株の乳酸菌ゲノムDNAの断片化を行い、断片化DNAの精製を完了した。今後は断片化DNAを鋳型として用いて4菌株の乳酸菌の全塩基配列解読を行う予定である。

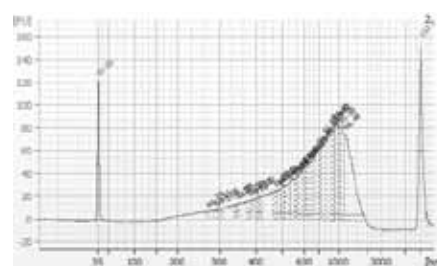
条件①



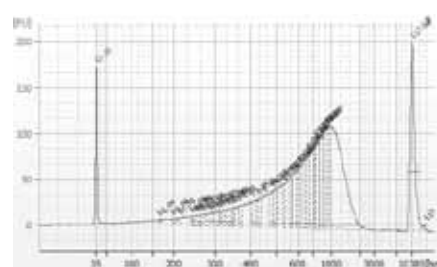
条件②



条件③



条件④



条件⑤

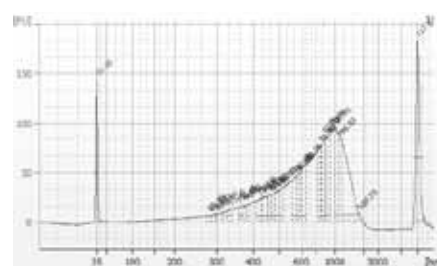


図2 ゲノムDNA断片化条件の検討

3. 誘導体化とGC-MSによるセレン蓄積スプラウト中の含セレンアミノ酸の同定

吉田宗弘*

セレン (Se) はイオウの同族元素であり、自然界には含硫アミノ酸のSeアナログである含Seアミノ酸が存在する。特に、Seを蓄積した植物には、Se-メチルセレンシステイン (MeSec) をはじめとする多様な含Seアミノ酸が存在する。Se化合物の同定には、誘導結合プラズマ質量分析 (ICPMS) を検出に用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) が頻用されている。前者ではSe化合物を特異的に検出でき、後者では未知化合物の構造を推定できる。しかし、HPLC-ICPMSが有機溶媒、LC-MSが不揮発性の溶媒をそれぞれ嫌うことから、両者を共通のカラム-溶媒系で実施することは困難である。したがって、Se化合物の同定においてHPLC-ICPMSとLC-MSは独立して用いられており、食品や生体中のSe化合物の同定を効率よく進めることは現在でも難しい。

一方、ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) は、未知化合物の同定技術として古くから確立している。含Seアミノ酸のような非揮発性化合物の場合、GC-MSで分析するには誘導体化処理を行うことが必要である。近年、生体や食品中の遊離アミノ酸を固相抽出後、誘導体化処理するキット (アミノ酸誘導体化キット) が開発されており、アミノ酸類のGC-MS分析を簡便かつ短時間で実施することが可能となっている。今回、Se蓄積スプラウト中の含Seアミノ酸をこのようなアミノ酸誘導体化キットとGC-MSを用いて同定することに成功したので報告する。

Se蓄積カイワレダイコンスプラウト (Seスプラウト) は亜セレン酸ナトリウム水溶液を用いて栽培し、調製した。調製したスプラウトのSe含量は82.3 µg/g dry weightであった。また、アミノ酸誘導体化を行うためのアミノ酸分析キットEZ:faast™ (Phenomenex社、米国) は島津GLC (京都) より購入した。スプラウトの乾燥粉末 100 mgに 50 %エタノール 5 mlを加え、十分に攪拌した後、遠心分離して抽出液を調製し、分析用の試料とした。抽出液へのSeの抽出率は 80.9 %であった。各抽出液 100 µlにアミノ酸分析キットであるEZ:faast™を用いて誘導体化処理を行い、GC-MS用の試料を調製した。GC-MSの分析条件は以下のとおりである。機器、Parvum 2 (島津、京都)；カラム、Zebron ZB-AAA (Phenomenex社、米国)；キャリアガス、ヘリウム；流

量、1.1 ml/min；気化温度、250 °C；カラム温度、110～320 °C (30 °C/min昇温)；分析時間、7分；試料注入量、2 µl；イオン源温度、240 °C；スキャン範囲、45～450 m/z；サンプリング速度、3.5 scan/s。

すでに、HPLC-ICPMSを用いた分析では、Seスプラウト中のSeの主要な分子種がMeSecであることが推定できている。そこで本実験では、Seスプラウト中に存在すると考えられるMeSecを誘導体化後、GC-MSを用いて同定することを試みた。ガスクロマトグラムにおいて、標準MeSecの誘導体由来するピークは保持時間 2.87 分付近に認められた。これに対して、誘導体化処理したSeスプラウト抽出液にも、ガスクロマトグラム上で、標準MeSecの誘導体と同じ保持時間を示す化合物の存在が認められた。この化合物のマススペクトルを標準MeSecの誘導体のマススペクトルと比較したところ、両者のマススペクトルはほぼ一致していた。

天然には様々なSeの安定同位体が存在する。この中で ^{78}Se 、 ^{80}Se 、 ^{82}Se の存在比 ($^{78}\text{Se} : ^{80}\text{Se} : ^{82}\text{Se}$) は 2 : 4 : 1 に近似している。このことは、マススペクトルにおいて m-2、m、m+2 m/z の比が 2 : 4 : 1 を示す分子イオンピークやフラグメントイオンピークが存在すれば、その化合物がSeを含有する可能性が高いことを意味する。本実験で用いたアミノ酸分析キットを用いると、アミノ酸のアミノ基がカルボキシプロピル化、カルボキシル基がブロピル化されるので、誘導体の分子量はもとのアミノ酸よりも 128 増加する。誘導体化処理したSeスプラウト抽出液のマススペクトルには、誘導体化MeSec ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{NSe}$) の分子イオンに由来する 309、311、313 m/z、および誘導体からカルボキシプロピル基 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$) が 1 つとれたフラグメントイオンに由来する 222、224、226 m/z がいずれも約 2 : 4 : 1 の比で認められた。また、他にも m-2、m、m+2 m/z の比が 2 : 4 : 1 となっているイオンピークがいくつか存在していた。以上より、誘導体化処理したSeスプラウト抽出液のガスクロマトグラムにおいて、保持時間 2.87 分を示した化合物は誘導体化MeSecであり、Seスプラウト中にMeSecの存在することをGC-MSを用いて証明できたと考える。

4. HDAC阻害剤TSAによる神経突起伸長作用における遺伝子発現のエピジェネティックな制御機構

池内俊彦**、丸岡弘規***

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のモデル神経細胞であるPC12細胞は、神経分化 (神経突起伸長) の細胞内分

* 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

** 化学生命工学部教授 理学博士

*** 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士 (工学)

子機構の解析に多用されている。本研究では、ヒドロキサム酸HDAC阻害剤であるTrichostatin A (TSA) によるPC12 細胞の神経突起伸長作用の解析を行った。TSA によって誘導される神経突起伸長作用が、immediate early genes (IEGs) (最初期遺伝子) の1つであるnur77 遺伝子産物であるNur77 によって制御されることが明らかになった。また、TSAによるエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節に、Histone acetyltransferase (HAT)/p300 によるヒストンH3 のアセチル化が重要であることが判明した。神経突起伸長がHAT/p300 阻害剤であるC646 を添加することによって抑制され、IEGsであるnur77 遺伝子の発現もC646 で抑制されることが分かった。次に、TSAによって誘導される神経突起伸長において、IEGsがどのような役割を担っているか解析を行った。nur77 とc-fosのmRNAをそれぞれノックダウンした細胞群にTSAを添加し、神経突起伸長への影響を解析した結果、c-fosをノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られなかったが、nur77 をノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制を確認することができた。また、PC12 細胞にNur77 を過剰発現させた細胞群は、無血清状態にすることにより、神経突起を伸長することが分かった。以上の結果から、我々は、TSAによるPC12 細胞の神経突起伸長には、IEGsの一つであるnur77 遺伝子の発現が重要であることを明らかにした。更に、nur77 遺伝子が転写活性化の標的になっているかを確認する目的で、ChIP (chromatin immunoprecipitation) assayを用いてヒストンH3 アセチル化サイトとnur77 遺伝子のプロモーター領域との結合を確認した。解析の結果、nur77 遺伝子のプロモーター領域はヒストンH3 の14 番目のリシン残基のアセチル化サイト近傍に存在することを明らかにした。これらの結果から、TSAによって誘導されるPC12 細胞の神経突起伸長には、HAT/p300 やHDACsによるヒストン修飾を介したエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節が重要であることが明らかになった。そこで、nur77 遺伝子の発現機構を詳細に解析するため、PC12 細胞の染色体DNAからnur77 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したプラスミドを作成し、Luciferase Reporter Assayを行った。nur77 遺伝子のプロモーターの発現は、TSAの添加により有意に上昇した。これは、nur77 遺伝子のプロモーターの発現がヒストン修飾を介してエピジェネティックな発現制御を受けていることを示唆している。現在、TSA未処理条件と処理条件でのnur77 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化と脱メチル化を、次世代シーケンサーを使用して解析している。TSAによる神経突起伸長におけるnur77 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機

構を、dbcAMPによる神経突起伸長と比較しながら、詳細に解析する予定である。

5. ヒストン脱アセチル化阻害剤やsiRNAをツールとした神経突起伸長作用のエピジェネティクス

下家浩二*、木村博信**

5.1. 緒言

ゲノム内の塩基配列情報は、生命の全てを規定する情報であり、この配列情報こそが21世紀の分子・細胞生物学を起点とした、所謂、バイオ分野をけん引するものと考えられてきた。しかし、ヒト全ゲノム解析が終了後、様々な生物種における全ゲノム解析も終了し、明るい未来の到来を想定してきた人類は、未だにゲノム解析の不十分さに悩まされている。その理由は、発現する遺伝子が塩基配列の変化を伴わず、環境要因で容易に変化することにある。ゲノムインプリンティングの様なプログラムされた変化とは違いがあり、21世紀はエピジェネティクスというバイオ分野の新分野の解析が人類に残された課題となる。

本稿では、エピジェネティクスに関わるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による特定の遺伝子発現制御機構の解析と表現型の変化に関する新知見を紹介する。

5.2. ヒストン脱アセチル化酵素の働き

HDACは、ヒストンタンパク質の特定のアミノ酸残基にアセチル基を付加させる活性を有する酵素である。現在までにSirファミリータンパク質群を除き、11種類の存在が確認されている。そもそもクロマチン構造中のヒストンとDNAは、それぞれ、正と負の電荷によって結合した状態で維持されている。従って、ヒストンタンパク質中の特定のリシン残基にアセチル基が付加されると電荷による結合力が失われることから、ヘテロクロマチン化 (或いは、クロマチン構造中のヒストンタンパク質とDNAの微小な部位の露出化) され、遺伝情報を有しているDNAにRNAポリメラーゼが接触可能となり、転写が誘導される。現在では、アセチル化のほかにもメチル化、リン酸化、ユビキチン化による構造変化も知られるようになった (図3を参照)。このように一見単純な分子機構であるが、かなり緻密に制御されていることが明らかにされつつある。さらに、ヒストンタンパク質だけではなく、DNA側も脱メチル化酵素によって主にプロモーター領域における転写誘導される分子機構の存在もエピジェネティクスを理解する上で重要な現象である²⁾。

* 化学生命工学部准教授 博士 (理学)

** 大阪大学蛋白質研究所助教 博士 (理学)

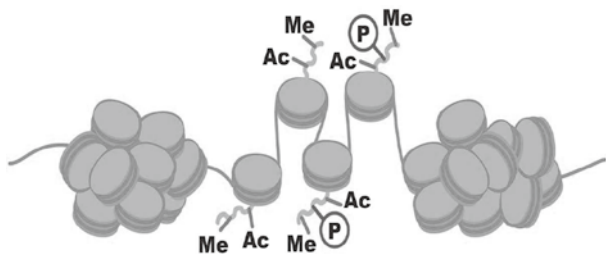


図3 クロマチン構造の模式図

ヒストンタンパク質とDNAの空間がある部位にはアセチル化 (Ac) の他にも、リン酸化 (P)、メチル化 (Me) などの修飾が見られる。

5.3. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やsiRNAを用いた機構解析

HDACに関する遺伝子発現制御機構の解析では、HDAC阻害剤が数多く存在し、エピジェネティクスの研究の質を向上させている。良く知られている阻害剤では、医薬品として上市されているバルプロ酸 (デパケン)、MS-275、トリコスタチンAが挙げられる。これらは、抗がん剤として開発されてきた経緯もあり (バルプロ酸は抗てんかん薬)、毒性も高いため、神経系における作用についてはごく最近になり報告されるようになった³⁾。神経系での作用は、神経突起の伸長作用が報告されているが、抗がん剤での薬剤濃度よりも低い濃度で十分な作用が観察されている。特に、脱髄に対するin vivoでの研究成果が注目に値する⁴⁾。このような作用の解析には、特定HDACを阻害する必要がある、メルク社からHDAC1とHDAC2に特異的な阻害剤が開発され、注目されている。私は、この薬剤と同様の特異性を有する薬剤K-560を本学の上里教授よりご分与いただき、神経突起伸長作用ではなく、神経細胞死の抑制作用を有することを見出している (manuscript in preparation)。この結果は、特定のHDACが特定の生命現象を司ることを強く示唆している。この作用解析のためには、HDAC1とHDAC2に特異的なsiRNAを用いた解析も必要と考えられ、本研究の新たな展望が開けた。注視すべき研究課題であると認識している。

6. 食品汚染細菌のストレスに関わる耐性関連遺伝子と暴露後の生存性との関係解析

土戸哲明*, 坂元 仁**

6.1. はじめに

医療分野や食品製造分野では耐性菌の出現が問題となっており、それらの細菌における遺伝子の機能と生存性・耐性化・感受性化に関わる表現型の知見の重要性は

増加している。こうした情報をシステマティックに取得するため、これまでシンプルなモデル生物として大腸菌、枯草菌、酵母などで多くの研究が取り組まれてきた。これらでは単独遺伝子破壊株ライブラリーが構築され、必須遺伝子の特定をはじめ、表現型に関する多くの有用なデータが提供された。単一遺伝子の変異株を用いた逆遺伝学的解析は、分子生物学における最も標準的な手法である。この手法で表現型に違いがある場合は強力な手法となるが、表現型に違いがない場合、その遺伝子の機能解析は困難となる。この原因の1つとして、生物自体が類似した機能を持つ遺伝子を複数コードしており、それらの遺伝子産物が相補的に働くためではないかと推定される。この問題の解決には多重遺伝子破壊によるバックグラウンド活性の消去が有効であろう。さらに多重欠損した場合にしか観察されない未知の表現型を検出できれば、存在意義が不明であった未知機能遺伝子の解明の一助になると期待される。

本研究では、枯草菌におけるスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、有機ペルオキシドなどの活性酸素種 (ROS) に対する防御因子をコードする遺伝子群の組合せの多重遺伝子破壊株を構築し、熱ストレスや種々の薬剤に対する感受性化および耐性化現象などの表現型を調査した。さらにこれらの多重欠損株で発現量が著しく増加した遺伝子をマイクロアレイにより分析し、これらの遺伝子が本当に耐性化に関与するかも調査した。本研究を通して多重遺伝子破壊を用いた新たな耐性化・感受性化に関する機能解明モデルを提示したい。

6.2. カタラーゼ遺伝子多重破壊によるカタラーゼ活性の増加現象と有機ペルオキシド耐性化

はじめに、枯草菌 168 株の3種類のカタラーゼを多重遺伝子破壊の標的とした。*katA*単独欠損により細胞内カタラーゼ活性は著しく低下したが、*katA*、*katX*二重欠損によりさらに低下することはなく、親株と同程度に細胞内カタラーゼ活性が回復した。*katA*、*katE*、*katX*三重欠損により細胞内カタラーゼ活性はほぼ消失した。*katA*、*katE*二重欠損により細胞内過酸化水素レベルがある閾値を低下した時、*katE*の転写を誘導し、カタラーゼ活性を正常レベルに回復させたのだろう。また、これらの単独欠損や多重欠損株は有機ペルオキシドである*t*-ブチルペルオキシドに対して高い耐性を示した。これはカタラーゼとは異なるシステムによる交叉耐性の獲得を示唆していた。

6.3. 多重欠損株の耐性化・感受性化パターン (RSマトリクス) の網羅的解析

上記の結果を受け、枯草菌の酸化ストレス耐性化シス

* 化学生命工学部教授 工学博士

** 化学生命工学部特任助教 博士 (工学)

テムの全貌を調査するため、カタラーゼを含めた主要な抗酸化因子の多重欠損を試みた。対象とした遺伝子は、上記の3種類のカタラーゼ (*katA*, *katE*, *katX*、以下KATs) と、3種類のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) ホモログ (*sodA*, *sodF*, *yojM*、以下包括的にSODsと表記)、有機ペルオキシド耐性に関与すると推定される5つの酵素・タンパク質 (*ahpC*, *ahpF*, *ohrA*, *ohrR*, *ohrB*、以下ORGs) の遺伝子群である。解析には致死レベルのストレスに曝して生存率の調査と、非致死レベルで増殖阻害を調査した。測定にはハンドリングの手間を大幅に簡略化でき、大規模処理に適した自動濁度測定装置と、それを用いた生育遅延解析法により生存率を求めた。その結果、過酸化水素に対しては、KATsの欠損による顕著な増殖阻害や感受性化が観察されたが、ORGsの欠損によって致死濃度での耐性化も観察された。*ト*ブチルペルオキシドでは、KATs、SODs、ORGsユニット単独や組み合わせでも致死濃度での耐性化が観察された。これらの結果は過酸化水素や有機ペルオキシドに対する未知の耐性化因子の存在を示唆している。一方、重金属系やエタノールのストレスはメナジオンによるスーパーオキシドラジカルとのRSマトリクスと類似し、次亜塩素酸によるストレスは過酸化水素でのRSマトリクスと類似していた。

6.4. 多重欠損により過剰発現したMrgAの解析

多重欠損株の全遺伝子の発現量をマイクロアレイ解析し、親株と比較したところ、多重化に伴い発現量が著しく増大した遺伝子として*mrgA*と*yneN*が耐性化因子の候補として浮上した。*mrgA*、*yneN*単独欠損株の耐性挙動は親株と同じであったが、KATs、SODs、ORGsへ多重欠損したところ、*yneN*欠損では変化が観察されなかったが、*mrgA*欠損にて感受性化が観察され、耐性化にMrgAが関与していることが明らかとなった。MrgAと相同性がある大腸菌のDpsは、DNAとの結合能を持ち、フェントン反応を阻害して有毒なヒドロキシルラジカルの発生を抑えることで、酸化から細胞を保護すると考えられている。一方、枯草菌のMrgAにはDNA結合能がなく、細胞内でDNAだけでなくタンパク質も含めた生体成分のフェントン反応を阻止することで防御していることが*in vitro*実験から示唆された。

6.5. まとめ

主要な抗酸化システムの多重遺伝子破壊群の構築とその表現型解析により、細胞防御システムの遺伝子破壊による耐性化獲得機構など従来の常識では考え及ばない現象を見出し、その耐性化機構の解明や、応用に関して研究を展開できた。こうした細胞のストレス応答ネット

ワークシステムの網羅的解析手法をゲノサバイボーム (Genosurvivome) 解析と名付けた。この手法による作用特性の類型化によって、バイオアッセイ法としての1次スクリーニングや種々の環境ストレスの活性酸素発生能の有無判定・種特定法としての活用も期待できる。

7. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信*

7.1. はじめに

近年の科学技術の進歩で様々な新規化合物が合成されるようになり、その一部は大量使用されるようになっていく。一方で、廃棄物処理技術については、リサイクルの重要性が高まってはいるものの、そのコスト回収の困難さ故に燃焼などのエネルギー利用としての側面を除いて進んでいないのが現状である。また、最近の大気中の二酸化炭素濃度の上昇や揮発性ガスの排出量の増加による地球温暖化の問題もクローズアップされるようになり、人工合成された化合物の後処理は大きな問題となっている。さらに、ビスフェノールA (BPA) をはじめとする一部の化合物に生体の内分泌系に影響を及ぼす物質があるとの報告から、人工化合物の後処理は生態系の維持の観点からも非常に重要な事項となっている。我々の研究室では、すでに茨城県つくば市の畑土壌よりBPA分解能の高い*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、様々なフェノール系化合物の分解能を有していることを示し、人工化合物処理に有用な菌株であることを示した⁵⁾。しかしながら、AO1株を長期保存すると一部の細胞のBPA分解能が極度に低下することを見出し、その一つの細胞をAO1L株と名付け、AO1株との比較解析を行ったところ、BPA分解能が低下しただけではなく、AO1株で分解できるほとんどすべての人工化合物の分解能がAO1L株では低下あるいは欠失していた^{5,6)}。さらに、AO1L株ではBPA分解に必要な*bisdAB*遺伝子も欠落していることが確認された。そこで、AO1株におけるBPAやその他の人工化合物分解能の安定性確保ならびに分解能向上のため、AO1株のゲノム構造の解析を試みた。

7.2. *S. bisphenolicum* AO1株に存在する内在性プラスミドの確認

AO1株におけるBPA分解はチトクロムP450 (P450_{bisd}) モノオキシゲナーゼシステムによる水酸化によって始まることやそのチトクロムP450やフェレドキシンをコー

* 化学生命工学部准教授 博士 (工学)

ドする遺伝子がそれぞれ *bisdB* と *bisdA* であることを明らかにしている⁷⁾。そこで、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて内在性プラスミドの確認を試みた。その結果、AO1株で少なくとも4種類のプラスミド断片を確認することができた(図4)。さらにAO1L株では、このうち1種類のプラスミド断片(約70 kb)の消失と新たに2種類のプラスミド断片の出現が確認された。このことから、AO1株のみで確認された約70 kb断片のプラスミドをpBAR1と名付け、塩基配列決定を行うことにした。

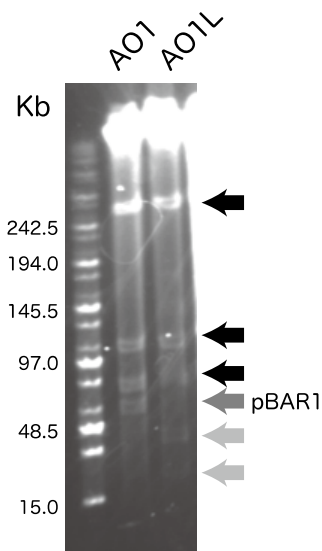


図4 パルスフィールドゲル電気泳動による内在性プラスミドの確認

黒矢印がAO1株およびAO1L株どちらでも確認されたプラスミド、灰色はAO1株だけで確認されたプラスミドを示す。pBAR1は、AO1株のみで確認された。

7.3. pBAR1の塩基配列決定

ABI社製のDNAシーケンサー (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzerまたは3130xl Genetic Analyzer) でpBAR1の塩基配列決定を試みた。現在までに約50 kbの領域を解読することに成功している。その結果、pBAR1に *bisdAB* がコードされていることが明らかとなった。さらに、BPAや人工化合物分解に関わると予想される aldehyde dehydro-genase 遺伝子 (*adh*) や lignostilben- α,β -di-oxygenase 遺伝子 (*lsd*)、4-hydroxy-bezoate 3-monooxygenase 遺伝子 (*bisdF*) も確認され、pBAR1がAO1株のBPA分解能に非常に重要となる因子であることが確認された。さらに、トランスポゾンや接合伝達に関わる遺伝子も多数コードされていることから、pBAR1自身の構造上の不安定性も予想することができた。

7.4. *S. bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

これまでにpBAR1の塩基配列の一部領域の解読には成功しているものの、全領域の解読には至っていない。

また、現在解読できた領域ではBPA分解に関わる遺伝子は一部を除いて未解明である。そこで、次世代型シーケンサーを用いてAO1株の全ゲノム構造の解読を試みた。Rosche社の450プラットフォームで全ゲノム解読を行った結果、755,334 リード、527,626,490 塩基の解読に成功した。さらに、GS *de novo* assemblerプログラムによる解析から、95個のcontigに集約され、総塩基数は5,102,688 塩基となった。また、この内の10個のcontigがpBAR1由来であることも確認された。CLC genomics workbenchソフトウェアでの解析では、421個のcontigとなった。さらに、得られたcontigおよびリードを用いて既読のpBAR1塩基配列と比較した結果、一部領域を除いてほぼ一致していることが確認された(図5)。それぞれの領域のcoverageを確認すると、一部領域で非常に多くのリードが重複していることが確認され、この領域は染色体やプラスミドに複数領域でコードされているものと予想された。今後、全ゲノム構造の解読を行う予定である。

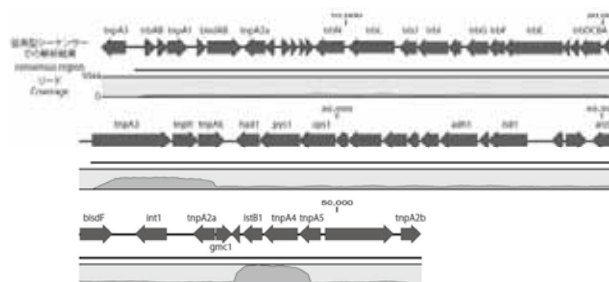


図5 次世代シーケンサーと従来型シーケンサーによるpBAR1塩基配列解析比較

リードCoverageは次世代型シーケンサーで解読されたリード数を示す。

謝辞

本研究の一部は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年度~平成29年度)」によって実施されたものである。

参考文献

- 1) 老川典夫, 生化学, 85, 62 (2013).
- 2) Kimura H., *et al.*, *J. Biochem.*, 120, 1182-1189 (1996).
- 3) Maruoka H., *et al.*, *J. Biochem.*, 148, 93-101 (2010).
- 4) Abematsu M., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 120, 3255-3266 (2010).
- 5) Matsumura Y., *et al.*, *Biocontrol Sci.*, 14, 161-169 (2009).
- 6) Sasaki M., *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1158-1169 (2008).
- 7) Sasaki M., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8024-8030 (2005).

資料6-2. 2014年 技苑「プロジェクト研究報告概要」

戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

研究代表者：老川 典夫
研究担当者：吉田 宗弘・池内 俊彦・下家 浩二・
松村 吉信・細見 亮太・木村 博信・
丸岡 弘規

1. 次世代シーケンサーによるD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析

加藤志郎^{*1}、老川典夫^{*2}

1.1. はじめに

様々な食品中にD-アミノ酸が含まれ、中でも発酵食品はD-アミノ酸含量が高いことおよび含有するD-アミノ酸の種類が多様であることが知られている。近年、食品発酵過程において乳酸菌がD-アミノ酸生産に大きく寄与することが明らかとなってきた。個々の乳酸菌においては細胞壁構成成分としてこれらのD-アミノ酸が利用されているものと考えられるが、D-アミノ酸が真核生物においても重要な生理的役割を担うことが明らかにされ、さらに我々は植物芽生えの生育にもD-アミノ酸が影響を及ぼすことを明らかにしている¹⁾。また、経口摂取（食事）による外因性D-アミノ酸が生体内において生理作用を示し得ることが示唆されつつある今日、私たちが日常摂取する食品中のD-アミノ酸生成に寄与する乳酸菌のD-アミノ酸生産機構を解き明かすことは、意義深い研究課題となっている。

本研究では、乳酸桿菌2株（*Lactobacillus sakei* LT-13 (= *Lactobacillus sakei* NBRC 15893^T)、*L. sakei* LK-145) および乳酸球菌2株（*Leuconostoc mesenteroides* LT-38 (= *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 3426^T)、*L. mesenteroides* LK-151) の4株の乳酸菌を対象としており、*L. sakei* LK-145 および *L. mesenteroides* LK-151 は酒造会社の酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株であり、*L. sakei* LT-13 および *L. mesenteroides* LT-38 はその対照として用いたD-アミノ酸生産能の低い基準株 (Type strain) である。次世代シーケンサーを用いてゲノムDNAおよび各乳酸菌が保持するプラスミドDNAの全塩基配列を解読・決定し、D-アミノ酸高生産機構をゲノムレベルで解明することを本研究の目的としている。

1.2. 乳酸菌のゲノム解析

本研究ではRoche社のGS junior 454およびLife science社のIon PGMの2台の次世代シーケンサーを使用した。GS junior 454を用いて500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析を、Ion PGMを用いて200 base readのshotgun解析をそれぞれ行った。GS junior 454およびIon PGMを用いたshotgun解析により、数十～百Mbのほぼ同程度のreadデータが得られた。shotgun解析のみのreadデータを用いた*de novo*解析では、既知の乳酸菌と比較してゲノム全長をほぼカバーしていたものの数十のContig構築に留まり、1つのScaffoldへと収束させるためにはpaired end解析の実施が必要であった。

そこで、GS junior 454より得られた500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析のreadデータを用いて、*L. sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145 および *L. mesenteroides* LK-151 ゲノムの*de novo*解析を行った結果、3株ともにゲノムマップの構築に至った (図1～3)。

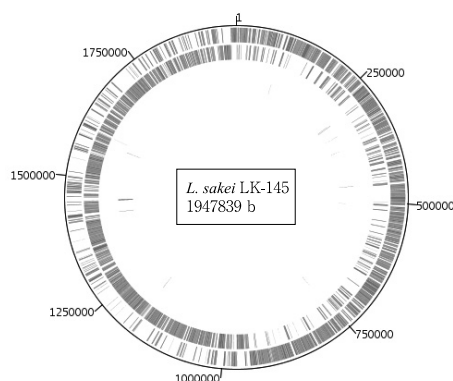


図1. *Lactobacillus sakei* LK-145のゲノムマップ

*1 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士（農学）

*2 化学生命工学部教授 農学博士

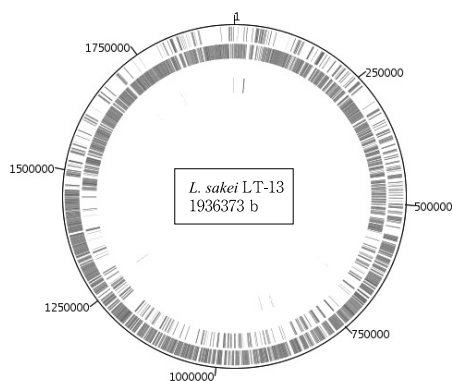


図2. *Lactobacillus sakei* LT-13のゲノムマップ

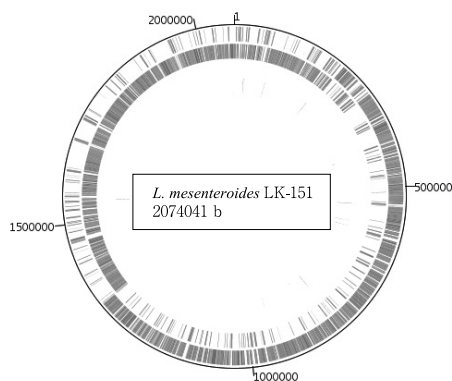


図3. *Leuconostoc mesenteroides* LK-151のゲノムマップ

各乳酸菌ゲノムの推定サイズ、GC含量、RBSおよびCDSの推定数（表1）は既報の同種乳酸菌と同程度であった。

表1. 乳酸菌のゲノムDNA

	<i>L. sakei</i>		<i>L. mesenteroides</i>
	LT-13	LK-145	LK-151
Chromosome length (Mb)	1.94	1.95	2.07
Gap region (kb)	56	41	9.4
GC content (%)	40.0	42.0	37.5
RBS	1889	1861	1956
CDS	1949	1921	2070
tRNA	43	43	35
rRNA	1	1	0

L. sakei LT-13、*L. sakei* LK-145 ゲノム上にはAla、GluおよびAspのラセマーゼ遺伝子が、*L. mesenteroides* LK-151 ゲノム上にはAla、Glu、HisおよびLysのラセマーゼ遺伝子が1コピーずつ存在しており、D-アミノ酸合成酵素遺伝子の保存性は既知の乳酸菌と一致した。D-アミノ酸に対応するL-アミノ酸の代謝酵素遺伝子の保存性もまた既知の乳酸菌と一致しており、D-アミノ酸高生産機構解明のためにはアミノ酸を直接代謝する酵素のみではなく、周辺の広範な代謝経路の解析が必要であると考えられる。また、構築したドラフト配列中のtRNAおよびrRNAコード領域数が既知の乳酸菌と比較

して少ないことは、各ドラフト配列中に数～数十kb程度のギャップ領域が残るためであると考えられ、ギャップ領域の解析もまた必要となる。

解析に供した各乳酸菌はそれぞれ少なくとも1つまたは3つのプラスミドを保持することもまた明らかとなり（表2）、これらのプラスミドには、推定の制限酵素遺伝子、接合伝達、核酸代謝に関与する遺伝子群や推定のリポタンパク質遺伝子等がコードされていた。アミノ酸代謝に直接関与すると予測される遺伝子は見出されなかったものの、保持プラスミドの差異がD-アミノ酸生産に与える影響もまた興味深い検討課題である。

表2. 乳酸菌のプラスミドDNA

Plasmid length (kb)	<i>L. sakei</i>		<i>L. mesenteroides</i>
	LT-13	LK-145	LK-151
1	33.4	6.2	30.4
2	6.2	-	14.4
3	4.3	-	2.9

これまでに上記3株のゲノムドラフト配列構築が完了しており、現在、残る1株のドラフト配列構築および各株ゲノム配列のギャップ領域の塩基配列決定を進めている。全4株のゲノムおよびプラスミドの塩基配列を完全決定し、個々の乳酸菌のアミノ酸を中心とした代謝経路の詳細な解析を進めることで、乳酸菌におけるD-アミノ酸高生産の分子機構の解明に迫りたいと考えている。

2. 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製と遺伝子発現評価

吉田宗弘^{*3}、細見亮太^{*4}

2.1. はじめに

亜鉛は生体内で多くの酵素タンパク質の活性発現や立体構造の維持に関わっており、細胞分裂、免疫機能の維持、創傷の治癒などに必須の微量ミネラルである。平成22年と23年の国民健康栄養調査における18歳以上の日本人成人の亜鉛摂取量中央値は、男性が7.9～8.9 mg/日、女性が6.6～7.3 mg/日であり²⁾、日本人の食事摂取基準における18歳以上の亜鉛の推定平均必要量である男性9～10 mg/日、女性7～8 mg/日³⁾を下回っている。このことは、日本人成人の半数以上は、亜鉛摂取不足のリスクが高く、推奨量（成人男性11～12 mg/日、女性9 mg/日）程度にまで亜鉛摂取量を増やすことが望ましい状態であることを意味している。しかし、日本人の主な亜鉛供給源は、穀物、魚介類、肉類であり、カル

*3 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

*4 化学生命工学部助教 博士（工学）

シウムと同様に動物性食品への依存度が比較的高いため⁴⁾、通常の食生活において十分な亜鉛摂取を確保することは難しいと考えられる。したがって、日本において亜鉛は、公衆栄養的な意味で強化食品やサプリメントに存在意義がある数少ない栄養素と思われる⁵⁾。

他方、食用植物の種子を水耕環境下で発芽・生育させたスプラウトが健康食材として着目されており、生産量も増加している。スプラウト類は、水耕に用いる溶液に添加された低分子化合物を容易に取り込むため、意図的に栄養素濃度を高めることが可能である。このようなコンセプトのもと、ビタミンB₁₂を高濃度に含有するカイワレダイコンスプラウトがすでに市販されている。微量ミネラルに関しても、鉄強化スプラウトやセレン強化スプラウトの調製が試みられている。そこで本研究では、日本人の亜鉛摂取状況の改善に役立つと考えられる亜鉛強化スプラウトの調製を試みた。また、2014年にダイコンゲノムの塩基配列が決定したことを受け⁶⁾、カスタムオリゴDNAマイクロアレイにてスプラウトの遺伝子発現量を評価し、亜鉛強化に伴う機能性成分増大の予測を試みた。

2.2. 実験方法

(1) 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウト調製条件の検討

亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製法として、水耕栽培中に亜鉛曝露を行う方法（水耕中曝露法）を用いた。亜鉛濃度0、20、50、100、または200 µg/mLの硫酸亜鉛溶液70 mLを含ませた2.5 gの脱脂綿をポリエチレン製クリーンカップ（129 φ×88 mm、リスパック株式会社、岐阜）の底に敷き詰め、株式会社トーホク（宇都宮）から購入したカイワレダイコン（*Raphanus sativus*）の種子約2 gを播き、暗所25℃に2日間静置して発芽させ、その後蛍光灯下25℃で5日間栽培した。

(2) DNAマイクロアレイ用亜鉛強化スプラウトの調製

亜鉛濃度0、20、100 µg/mLの硫酸亜鉛溶液を用い、水耕中曝露法で亜鉛強化スプラウトを調製した。0および100 µg/mLでは、20 µg/mLと比較し成長阻害が見られたために、0および100 µg/mLで5日間栽培した長さと同様になるよう20 µg/mLで調製した亜鉛強化スプラウトを2種栽培した（2.5 cmおよび4 cm）。採取した双葉をRNAレーター（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬し、分析まで-70℃保存した。

(3) RNA抽出とDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析

亜鉛曝露がカイワレダイコンスプラウトにおける遺伝子発現量に及ぼす影響を評価するために、DNAマイクロ

アレイ解析を行った。カイワレダイコンスプラウトの双葉からTrizol（Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan）を用いた方法で総RNA抽出を行った。抽出した総RNAはExperion（Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA）による品質検査を行った。各50 ngの総RNAを用いて、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit, one-color（Agilent Technologies, CA, USA）によりラベリング反応を行った。DNAチップはダイコン（*Raphanus sativus* L.）の遺伝子データベース（<http://radish.kazusa.or.jp/index.html>）を用いて作成したカスタムアレイカスタムオリゴDNAマイクロアレイ（Radish, カイワレ）を使用した。Agilent社推奨のプロトコルで、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンにより遺伝子発現強度を数値化し、各サンプル間で遺伝子発現量を比較した。

(4) 統計解析

亜鉛曝露濃度がスプラウトの重量と長さ、および亜鉛濃度に及ぼす影響については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用いて検定した。

2.3. 結果および考察

表3は、種々の水準の亜鉛曝露を行って7日間栽培後に、10本のスプラウトを無作為に選抜し、1本ずつの重量、長さおよび亜鉛含量測定した結果をまとめたものである。曝露水準が50 µg/mL以上によって明らかな生育阻害が認められた。100 µg/mL曝露の場合、重量、長さのいずれも非曝露に比較してほぼ半分の数値であった。肉眼的にも、スプラウトは曝露水準100 µg/mLにおいて、茎が曲がるなどの異常が認められた。曝露水準200 µg/mLまでは、スプラウト中の亜鉛濃度は曝露水準にほぼ比例して増加した。これらの結果、高濃度の亜鉛曝露はスプラウトの生育を阻害することが明らかとなった。今回調製した亜鉛スプラウトの亜鉛濃度は新鮮重量当たりで70～100 µg/gであることから、10 g強の摂取

表3. 亜鉛曝露がカイワレダイコン（*Raphanus sativus*）の生長および亜鉛含量に及ぼす影響

亜鉛曝露濃度 (µg zinc/mL)	重量 (mg)	長さ (cm)	亜鉛含量 (µg/g湿重量)
0	178 ± 12 ^c	7.5 ± 1.4 ^b	6.3 ± 1.7 ^a
20	195 ± 15 ^c	8.9 ± 1.3 ^b	20.8 ± 8.8 ^b
50	108 ± 19 ^b	4.6 ± 1.2 ^a	33.2 ± 9.9 ^b
100	96 ± 17 ^{ab}	3.5 ± 1.4 ^a	83.3 ± 8.0 ^c
200	73 ± 18 ^a	2.8 ± 1.4 ^a	190.1 ± 24.3 ^d

平均値±標準偏差(n = 10)。共通のアルファベットが付いていない平均値間で有意差あり(p < 0.05)。

で1 mg程度の亜鉛の摂取を実現できる。したがって、日本人の亜鉛摂取状況の改善には十分に役立つものと思われる。

一方、カイワレダイコンスプラウトの双葉から抽出した総RNAの純度 (A_{260}/A_{280}) は、すべて1.9-2.1以内で高い値であった。また電気泳動の結果より、RNAが分解していないことを確認し、DNAマイクロアレイ解析に供した。亜鉛曝露濃度0と20 $\mu\text{g/mL}$ (ともに長さ4 cm)、20と100 $\mu\text{g/mL}$ (ともに長さ2.5 cm) 間で、発現量が2倍以上および0.5倍以下に変動しているものを抽出した。ダイコンゲノムには機能未知遺伝子が大半を占めているために、比較的近縁であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムを用いてBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性解析を行い、両種で第一位の相同性になった遺伝子をシロイヌナズナ遺伝子と相同性を有するダイコン遺伝子として定義し、ダイコン遺伝子のアノテーション情報とした。このアノテーション情報を利用してDAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) による発現遺伝子のPathway解析を行った。

亜鉛曝露濃度0と20 $\mu\text{g/mL}$ 間での比較では、20 $\mu\text{g/mL}$ に対して2倍以上変動した遺伝子は1276遺伝子あり、そのうち724遺伝子は下方制御され、552遺伝子は上方制御されていた。また亜鉛曝露濃度20と100 $\mu\text{g/mL}$ 間での比較では、20 $\mu\text{g/mL}$ に対して2倍以上変動した遺伝子は1379遺伝子あり、そのうち656遺伝子は下方制御され、723遺伝子は上方制御されていた。

さらに2倍以上発現変動した遺伝子を機能カテゴリー

表4. 亜鉛曝露によって2倍以上発現変動した機能カテゴリーごとの遺伝子数

Pathway	0 vs 20 ($\mu\text{g/mL}$)	20 vs 100 ($\mu\text{g/mL}$)
alpha-Linolenic acid metabolism	4	7
Biosynthesis of plant hormones	-	16
Cysteine and methionine metabolism	7	-
Flavonoid biosynthesis	3	3
Glucosinolate biosynthesis	5	-
Glycine, serine and threonine metabolism	4	-
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3	-
Nitrogen metabolism	-	4
Starch and sucrose metabolism	-	5
Valine, leucine and isoleucine degradation	4	-

(KEGG Pathway) に分類し、表4にその結果を示した。

亜鉛曝露濃度0と20 $\mu\text{g/mL}$ 間では、主にCysteine and methionine metabolism、Valine, leucine and isoleucine degradation、Glycine, serine and threonine metabolismなどのアミノ酸代謝の変動がみられた。これは亜鉛欠乏によってアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現量が低下したことに起因している。しかし、亜鉛存在条件下である20と100 $\mu\text{g/mL}$ 間での比較ではアミノ酸代謝に変化はみられていなかった。一方、亜鉛曝露濃度20と100 $\mu\text{g/mL}$ 間ではBiosynthesis of plant hormonesやalpha-Linolenic acid metabolismといった植物ホルモン生合成系代謝で発現変動がみられた。特にalpha-Linolenic acid metabolism内のジャスモン酸類合成系代謝が亜鉛曝露濃度100 $\mu\text{g/mL}$ で発現増加していた。ジャスモン酸類は光合成や成長といった幅広い変化を制御する脂質ホルモンシグナル物質であり⁷⁾、高濃度の亜鉛がストレスとなり誘導されたと予測される。また亜鉛曝露濃度100 $\mu\text{g/mL}$ において、Flavonoid biosynthesis代謝内のカテキンやケルセチン合成に関わる遺伝子発現の増大がみられることから、これらの含有量増加が期待される。さらに、亜鉛をタンパク質内に取り込むzinc finger (C3HC4-type RING finger) family proteinの発現量が、亜鉛曝露濃度100 $\mu\text{g/mL}$ において3-4倍上昇していた。しかし、両比較間(0 vs 20 $\mu\text{g/mL}$ および20 vs 100 $\mu\text{g/mL}$)で亜鉛の取り込みや排出に関わる亜鉛トランスポーターに大きな変動はみられなかった。

本研究で行ったPathway解析は、シロイヌナズナと高い相同性が得られたダイコン遺伝子のみを抽出して行っているために、種間で保存性の高い代謝系遺伝子の変動ばかりが多くみられた可能性がある。以上のことから、亜鉛曝露により相当数の遺伝子発現量の変動がみられたが、まだ機能の不明確な遺伝子が多く存在している。今後、遺伝子の機能を絞り込むとともに、DNAマイクロアレイ解析で得られた代謝変動予測より、亜鉛以外に増強される機能性成分の測定へと研究を進めていきたい。

3. HDAC阻害剤TSAによる神経突起伸長作用における遺伝子発現のエピジェネティックな制御機構

池内俊彦^{*5}

本研究では、ヒドロキサム酸HDAC (histone deacetylase) 阻害剤であるtrichostatin A (TSA) によるモデル神経細胞PC12の神経突起伸長作用の解析を行っている。昨年度に、TSAによって誘導される神経突起伸長作用がimmediate early genes (IEGs) (最初期遺伝子) の1つ

*5 先端科学技術推進機構研究員、関西大学名誉教授 理学博士

であるnur77 遺伝子産物であるNur77 によって制御されていることが明らかになった。また、TSAによるエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節に、histone acetyltransferase (HAT) /p300 によるヒストンH3 のアセチル化が重要であることが判明した。神経突起伸長がHAT/p300 阻害剤であるC646 を添加することによって抑制され、IEGsであるnur77 遺伝子の発現もC646 で抑制されることが分かった。本年度は、TSAによって誘導される神経突起伸長において、IEGsがどのような役割を担っているかをさらに解析した。nur77 とc-fosのmRNAをそれぞれノックダウンした細胞群にTSAを添加し、神経突起伸長への影響を調べた。nur77 をノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られたので、nur77 遺伝子産物であるNur77 によって神経突起伸長が促進されていることが確認された一方、c-fosをノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られず、むしろ促進された。このことにより、c-fos遺伝子産物であるc-Fosによって神経突起伸長が抑制されていることが判明した。また、PC12 細胞にNur77 を過剰発現させた細胞群は、無血清状態にすることにより、TSA無添加でも神経突起を伸長することが分かった。さらに、nur77 遺伝子が転写活性化の標的になっているかを確認する目的で、ChIP (chromatin immunoprecipitation) assayを用いてアセチル化ヒストンH3 とnur77 遺伝子のプロモーター領域との結合を解析した。その結果、nur77 遺伝子のプロモーター領域は、TSA添加により(14 番目のリシン残基がアセチル化された)アセチル化ヒストンH3 と結合すること、その結合はC646 を共添加すると阻害されることが明らかになった。これらの結果から、TSAによって誘導されるPC12細胞の神経突起伸長には、HAT/p300 やHDACsによるヒストン修飾を介したエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節が重要であることが明らかになった⁸⁾。そこで、nur77 遺伝子の発現機構を詳細に解析するため、PC12 細胞の染色体DNAからnur77 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミドを作成し、DLR (dual luciferase reporter) assayを行った。nur77 遺伝子プロモーターの発現は、TSAの添加により有意に上昇した。これは、nur77 遺伝子プロモーターの発現がヒストン修飾を介してエピジェネティックな発現制御を受けていることを示している。また、nur77 遺伝子のプロモーター領域にあるSp1 binding sites (GC-richなSp1-1 とSp1-2) のどちらかを欠失させるとTSA添加による発現上昇が見られなくなった⁹⁾。現在、TSA無添加条件と添加条件でのnur77 遺伝子プロモーター領域のCpG island (特にSp1 binding sites)のDNAメチル化と脱メチル化を次世代シーケンサーを使用して解析してい

る。さらに、DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) 阻害剤であるdecitabine添加による神経突起伸長とnur77 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の関連を解析している。

4. HDAC阻害剤によって誘導されるPC12細胞の突起伸長のメカニズム

丸岡弘規^{*6}

HDAC阻害剤 (TSA) によって誘導されるモデル神経細胞株PC12 の突起伸長の制御に関与する分子に着目して解析を行った。今回は、TSA誘導初期に発現上昇する遺伝子群IEGsに着目して解析を行った。RT-PCRとウェスタンブロッティング法による解析の結果、TSA添加2時間までにIEGsの一つであるNur77 の発現が上昇することを確認した。また、Nur77 遺伝子を強制発現したPC12 細胞は突起伸長を誘導することや、Nur77 遺伝子をノックダウンしたPC12 細胞はTSAを添加しても突起伸長効果を示さないことが分かった。以上の結果から、HDAC阻害剤TSAによって誘導されるPC12 細胞の突起伸長の制御にIEGsの一つであるNur77 が大きく関与していることが分かった。HDAC阻害剤 (TSA) によって誘導されるPC12 の突起伸長を制御するNur77 の詳細な制御機構を解析する目的で、Nur77 の詳細な発現機構の解析を行った。TSA添加直後のNur77 プロモーター領域と、転写開始点に位置するヒストンH3 のリシン 14 番目のアセチル基の結合をChIP assayを行い解析したところ、TSA添加2時間で両者の強い結合が確認された。また、この時のヒストンH3 のリシン 14 番目のアセチル基とヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) との関連に関して解析を行ったところ、TSA添加2時間までに、HATの一つであるp300のプロモーター領域がヒストンH3 のリシン 14 番目のアセチル基と結合することが分かった。以上の結果から、HDAC阻害剤TSAによって誘導されるモデル神経細胞株PC12 の突起伸長には、p300 を介したIEGsの制御が関与していること、IEGsの一つであるNur77 タンパクの発現が関与していることが示唆された⁸⁾。現在、p300 の制御にNur77 の発現が関与しているかについて、詳細な解析を行っている。また、Nur77 以外のIEGsの関与に関してもNGSを使用した解析を実施中である。

現在、*in vivo*における神経細胞とHDAC阻害剤の動態をイメージングする目的で、蛍光*in vivo*イメージャーを使用した解析方法の検討を実施している。これまでに検証段階として、GFPを強制発現させたヒト乳癌細胞株

^{*6} 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士 (工学)

(MCF7-GFP)をヌードマウス (BALB/c系統) の背部皮下に移植させ、その動態を蛍光*in vivo*イメージャーで解析することに成功している。一般的にマウス皮膚は強い自家蛍光を有しており、蛍光物質のシグナルの検出にとって大きな障壁となることが知られている。今回の解析では、マルチスペクトル解析と言う手法を使用することで、自家蛍光の見られる検出画像から蛍光タンパク (GFP) 由来のシグナルだけを取り出してくることに成功しており、マルチスペクトル解析を使用しない時よりS/N比の高い蛍光画像を得ることができることを確認している。現在、神経細胞を特異的に蛍光標識する方法を検討中である^{10, 11)}。

5. 神経突起伸長に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御

下家浩二^{*7}、木村博信^{*8}

5.1. 神経突起伸長作用に関する最近の研究の動向

脳内神経細胞や末梢神経細胞では、特定の神経細胞群とシナプス結合を介した神経回路を形成している。この神経回路は、特定の表現形質を表すために様々な形態を表すように発生初期から制御されている。発生初期からの制御は、主に特定の遺伝子発現制御によって引き起こされていることが特定遺伝子のノックアウトマウスによる解析から一部が明らかにされているが、未だに不明な部分が多いのが現状である。神経幹細胞を用いた解析では、遺伝子が発現制御されることにより分化が進行し、神経回路を形成するために必須である神経突起が伸長する。これは、*in vivo*に最も近い解析手法である。しかし、分化した神経細胞は形態的に極めて複雑であることから、これまでの単一の遺伝子の解析では手法的な限界がある。したがって、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析が求められる一方で特定の神経細胞内での統一的な神経突起伸長にかかわるシグナル伝達機構の解析も求められている。生命機能の全ては、約1000種類存在するとされている神経細胞の形態的多様性と機能的多様性によってもたらされることから、その制御機構の解析には紆余曲折があった。本稿では、当プロジェクトによって得られたエピジェネティックな遺伝子発現制御を介した神経突起伸長に関わる知見を解説することにより、主に医薬における応用を見据えた研究がどこまで進展させ得るかを報告する。

5.2. PKAを介したヒストン修飾を伴う神経突起伸長作用

PC12細胞は、末梢神経様に分化することが知られている。その際に神経突起を伸長させる。神経成長因子 (NGF) によって大きく神経突起を伸長させることも可能だが、forskolin (FSK) を添加することによりprotein kinase A (PKA) の活性化を介した神経突起の伸長作用も観察可能である (図4)。NGFはタンパク質性の因子であり、また、特定の組織にしか存在することができない。FSKは、食品に含まれる天然物であり、健康食品や医療への応用化の材料にもなり得る。そこで、FSKを試料とした研究を展開した。その結果、FSKの添加後1-2時間以内にnur77、neuroD1、synapsin遺伝子群の発現上昇を確認した。また、cAMPアナログ分子であるdbcAMP添加によっても同様の作用を示すことを確認した。さらに、nur77、neuroD1 遺伝子上流配列を用いたレポーターアッセイによる遺伝子発現活性解析では、両遺伝子共にPKAシグナル伝達による遺伝子発現調節を受けていることが明らかになった。この時、DNAが巻き付いているヒストン (ここではヒストンH3 (H3と表記)) の14番目のリシン残基がアセチル化 (Ac14H3と表記) されることが分かった。

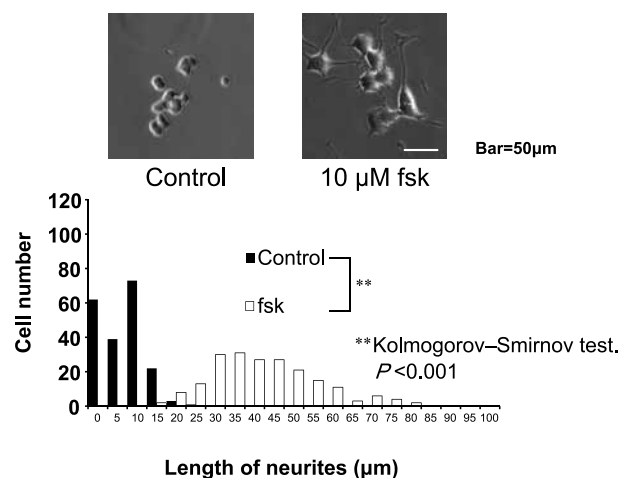


図4. PC12細胞におけるFSK添加24時間後の神経突起伸長作用

5.3. Ac14H3に結合するタンパク質による遺伝子発現制御

既に、ヒストンテイルに含まれる特定リシン残基のトリメチル化が遺伝子の発現制御に関与する現象が知られている。しかし、ヒストンH3の14番目のリシン残基のアセチル化 (Ac14H3) による遺伝子発現制御についての知見は全く無く、ヒストンH3の同アセチル化による遺伝子発現制御機構の存在を強く期待した。幸い、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) に用いることが可能なAcH14H3に結合する抗体が市販されていたため、同

*7 化学生命工学部准教授 博士 (理学)

*8 大阪大学蛋白質研究所助教 博士 (理学)

位置に結合する遺伝子産物を解析した。その結果、FSKやヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤であるバルプロ酸（VAL）によって、nur77 遺伝子産物がAc14H3に結合することが検出された。この事実は、極めて狭い空間で特定の小さな化学基を認識することによって開始される遺伝子発現上昇機構が存在することを意味している。さらに、その生理学的意味は、神経突起の伸長作用であることが明らかになったが（図5）、複数の遺伝子発現群から構成される神経回路の形成の基礎課程の解明にもつながる発見である。今後の神経回路の再構築を標榜した再生医療にも寄与し得る知見であることから、更なる詳細な解析結果の蓄積が強く望まれるところである。

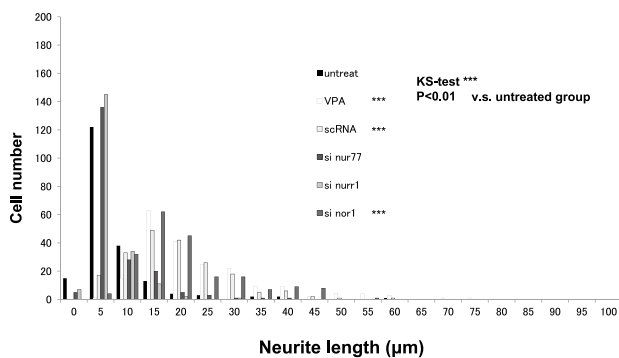


図5. siRNAによるnur77 ファミリー遺伝子群のノックダウン後の神経突起長の変化

5.4. DNAのメチル化による神経突起伸長作用に関わるnur77遺伝子の発現制御

細胞・組織の分化過程で、遺伝の主体となるDNA側の修飾も知られていた。DNAの修飾部位としては、塩基であるシトシンであり、メチル基が付加される。このメチル基の付加は、メチル基転移酵素（Dnmt）を介している。このメチル基の付加による遺伝子発現制御機構の説明としては、特定遺伝子上流に存在するシトシン残基のメチル化により転写因子複合体の結合が阻害され、結果的に下流の遺伝子の発現が抑制されるとされている。逆に、シトシン残基の脱メチル化により、下流の遺伝子の発現が上昇するとされている。この現象は、主にCpGアイランドと呼ばれる転写調節を司るDNA領域が重要であるとされている。しかし、近年の研究により必ずしもCpGアイランドのメチル化と脱メチル化による化学基の修飾が遺伝子発現の制御に関わるとは言えない現象が報告されている。加えて、開始コドン以降のシトシン残基にもメチル化が付加されているにもかかわらず、遺伝子の発現が誘導されている現象が数多くあることも報告されるようになり、シトシン残基のメチル化が遺伝子発現の抑制につながり、また、脱メチル化が遺伝子発

現の抑制につながる制御機構の存在自体に懐疑的であるのが現状である。

そのような中、我々の研究では、nur77 遺伝子上流にCpGアイランドを見出し、FSK添加後の神経突起伸長時におけるそのメチル化の有無について検討を行った。その結果、シトシン残基のメチル化状態は、脱メチル化状態であったことから、転写因子複合体の立体的な相互作用がnur77 遺伝子の発現の制御には重要であり、ヒストン側の修飾により神経突起の伸長を制御していることが明らかになった。

5.5. まとめ

我々の研究では、ヒストン側の修飾とDNA側の修飾を観察することにより、神経突起伸長に関与するnur77 遺伝子の発現制御機構を明らかにした。ヒストンの修飾だけではなくDNAの修飾も観察することではじめてエピジェネティックな遺伝子発現制御が語れるが、ヒストンの修飾だけでもアセチル化以外にメチル化、リン酸化、SUMO化などの化学修飾の存在が知られており、ヒストン側とDNA側の両者の修飾による制御機構の全貌を把握するまでにはまだ時間が必要である。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーを用いたAc14H3に結合する遺伝子解析も実施しているが、DNAマイクロアレイによる解析とも合わせた総合的な解析が必要であると感じている。また、それらによって得られる大量の情報から重要な情報のみを抽出する作業も早急に進めねばならないと考えている。

6. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信^{*9}

6.1. はじめに

地球環境汚染は新興国の科学技術の進歩とともに広範囲に広がる様相となっている。また、有機化合物を多く含む工業廃棄物や家庭廃棄物など、日々大量に排出されるものの、その処理は、一部のリサイクル処理を除いて多くが焼却処分あるいは埋め立て処分されているのが現状で、燃焼処理は多くのCO₂を排出することから地球温暖化の原因ともなっている。このようなことから、合成化学物を含む有機化合物の微生物処理法の開発に関する研究に着手し、特に、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA（BPA）を分解する*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、有機系合成化合物分解特性を解析し、環境浄化および有機系廃

^{*9} 化学生命工学部准教授 博士（工学）

棄物の生物学的処理の可能性について検討している。その中で本株がBPAだけでなく、フェノール系化合物やビフェニル系化合物、有機塩素化合物も分解可能であることが示され、AO1株の有用性が明らかとなっている¹²⁾。また、研究室だけではなく、土壌環境中でも十分に環境汚染物質分解能を発揮することが示されている¹³⁾。しかしながら、BPAを除く有機系合成化合物の分解能力は低く、それらの分解能力は非常に不安定なものであり、培養過程で分解能を失った変異型AO1株（AO1Lなど）が確認されている¹⁴⁾。そこで、本プロジェクトではAO1株のゲノム構造を明らかにすると共に、AO1株の安定化ならびに有機系合成化合物分解能の強化につながるゲノム構造の改変を試みることを目的としている。昨年度の研究ではAO1株のゲノム塩基配列をRoche社製の454プラットフォームの次世代シーケンサーを用いて解読し、ドラフトシーケンスを得たが、AO1株に内在する4種類のプラスミド配列や複数存在するトランスポゾン配列などの不明な点が多く、結果としてゲノム構造や遺伝子構造を把握することはできなかった。そこで本年度は、Illumina社製のMiSeqシステムを用いた解析を加えてAO1株のゲノム構造の解析を試み、内在性プラスミドの一つpBAR1の全塩基配列の決定に成功した。さらに、pBAR1の小型化によるBPA分解活性への影響も検討した。

6.2. MiSeqを用いたAO1株ゲノム構造の解析

昨年度のRoche454シーケンスシステムとCLC Genomics Workbenchを用いたAO1株には全ゲノム塩基配列解析では755,344個の塩基配列断片が得られ、421個のコンティグに集約し、結果としてゲノム長は約5.3 Mbであることが確認された。これまでのパルスフィールドゲル電気泳動解析から、AO1株には染色体と少なくとも4つのプラスミドの存在が明らかだが、それぞれの配列は特定されなかった。そこで、本年度はIllumina社製MiSeqを用いて、全ゲノム解析に加えてすでに存在が明らかになっている約250 kbプラスミド、約100 kbプラスミド、約80 kbプラスミド、BPA分解に重要となるpBAR1の個別解析を試みた。パルスフィールドゲル電気泳動によるプラスミドの分離はこれまで通り成功するが、その後の抽出作業でシーケンス解析に用いるプラスミド量の確保が困難となった。そこで、Roche社製 Genopure Plasmid Midi Kitとタカラバイオ社製NucleoBond Xtra Maxiを用いてプラスミドのみを精製してMiSeqによるシーケンス解読とRoche社製Newblerによるアセンブリー、GenoFinisher (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/genoFinisher/index.php>) によるフィニシング処理を行い、プラスミド配列を構築し

た。その結果、一部構造がすでに明らかとなっているpBAR1については全塩基配列（80,317 pb）の決定に成功し、さらにNCBI塩基配列データベースとBlastプログラムを用いてコードされている遺伝子のアノテーションが完了した（図6および表5）。pBR1には67個遺伝子がコードされており、接合伝達関連遺伝子が20個、トランスポゾン配列が14個確認された。また、*bisdAB*を含む少なくとも4種類の遺伝子がBPA分解に関わっているものと予想された。

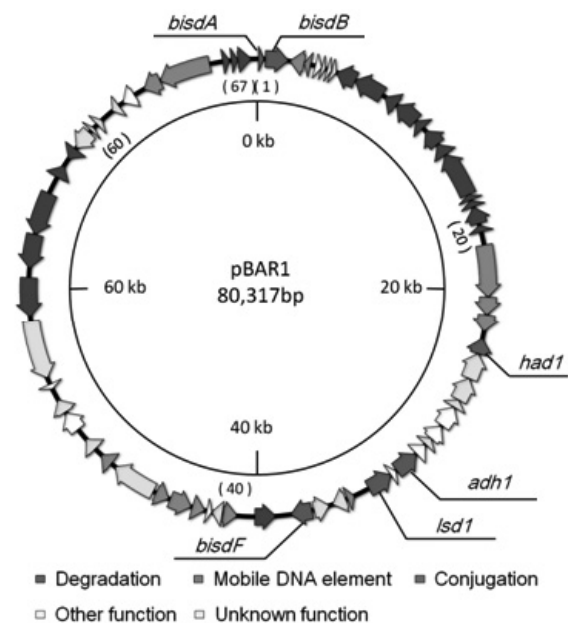


図6. pBAR1 (80,317bp) の遺伝子構造
図中の(番号)は表5の遺伝子番号に対応している。遺伝子は矢印で示し、その機能分類も示した。

表5. pBAR1遺伝子の予測された機能

No.	Gene	Putative function	No.	Gene	Putative function
1	bisA	transposase	35	orf9	transposase (partial)
2	bisB	cytochrome P450	36	orf9	transcriptional regulator, TetR family
3	tnpA2	transposase of IS6100	37	arcC	transcriptional regulator, ArcC family
4	tnpA7	transposase (partial)	38	bisD	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase
5	orf2	hypothetical	39	int1	integrase-like protein
6	orf4	Xre-family transcriptional regulator (partial)	40	tnpA2	transposase of IS6100
7	orf5	hypothetical	41	gmc1	choline dehydrogenase (partial)
8	orf6	hypothetical	42	orf10	hypothetical
9	tnpN	muramidase TrnN (partial)	43	tnpA	putative transposase
10	tnpL	conjugal transfer protein TrnL	44	tnpA4	putative transposase (partial)
11	tnpJ	conjugal transfer protein TrnJ	45	tnpA5	transposase of IS6100
12	tnpI	conjugal transfer protein TrnI	46	orf11	TonB-dependent receptor (partial)
13	tnpH	conjugal transfer protein TrnH	47	tnpA2b	transposase of IS6100 (partial)
14	tnpG	conjugal transfer protein TrnG	48	mpv	MPV protein
15	tnpF	conjugal transfer protein TrnF (partial)	49	orf12	hypothetical protein
16	tnpE	conjugal transfer protein TrnE	50	dna	DNA methylase
17	tnpD	conjugal transfer protein TrnD	51	orf13	hypothetical protein
18	tnpC	conjugal transfer protein TrnC (partial)	52	dnaG	DNA primase dnaG
19	tnpB	conjugal transfer protein TrnB	53	tnpA	conjugal transfer protein TrnA
20	tnpA	conjugal transfer protein TrnA	54	tnpG	conjugal transfer protein TrnG
21	tnpA3	transposase Trn3 family protein	55	tnpI	conjugal transfer protein TrnI
22	tnpR	resolvase domain containing protein	56	tnpL	conjugal transfer protein TrnL
23	tnpA8	transposase (partial)	57	tnpN	conjugal transfer protein TrnN
24	had1	haloacid dehalogenase-like hydrolase	58	parB	chromosome (plasmid) partitioning protein ParB
25	pyc1	pyruvate carboxylase	59	parA	chromosome (plasmid) partitioning protein ParA
26	cpf1	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding	60	kisA	KisA protein
27	orf15	biotin carboxyl carrier protein	61	kisA	antirestriction protein KisA
28	orf2	hypothetical	62	orf14	hypothetical
29	orf1	hypothetical	63	tnpR	resolvase domain containing protein
30	orf12	4-hydroxybenzoyl-CoA isomerase	64	tnpA3	transposase Trn3 family protein
31	orf13	hypothetical	65	tnpA	conjugal transfer protein TrnA (partial)
32	adh1	aldehyde dehydrogenase	66	tnpB	conjugal transfer protein TrnB
33	orf7	TonB-dependent receptor (partial)	67	tnpA1	transposase of IS6100
34	ldf1	lignostilbene- α , β -dioxygenase			

6.3. AO1L株に存在する変異型pBAR1の遺伝子構造

AO1L株はAO1株培養中から単離されたBPA非分解自然突然変異株である。そこで、これら2株のゲノム構造比較を試みた。AO1株のゲノム構造がドラフト状態のため、pBAR1配列のみで比較した。その結果、

AO1L株のpBAR1bにはトランスポゾン遺伝子領域を含む複数の領域で大きな欠失が確認された。また、この欠失にはBPA分解に関わる**bisdAB**領域も含まれ、AO1株のゲノム構造の不安定性がトランスポゾン遺伝子によるものと予想される結果であった(データ示さず)。そこで、現在、pBAR1からトランスポゾンおよび接合伝達に関わる全ての遺伝子を取り除いた小型化pBAR1を作製し、pBAR1の安定化を試みている。

7. 抗菌剤耐性菌に生じるゲノム変異の発生要因の解析

松村吉信、中田訓浩^{*10}

7.1. はじめに

日本でのウイルスを含む病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底と効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて大きな脅威とはなっていない。しかしながら、病院環境などでは、薬剤耐性菌の出現により院内感染が発生し、入院あるいは来院患者の感染症の集団発生につながり、場合によっては死亡事故として大きな社会問題となっている。これは、継続的あるいは必要量以上の抗菌剤使用が本来薬剤感受性の微生物を耐性化させているものと考えられており、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発やその使用方法の確立が求められている。そこで本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程を解析し、どのように耐性株が出現するのかの原因解明を目的とした。

これまでの我々の研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤(第四アンモニウム塩)である臭化トリメチルアンモニウム(CTAB)で処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している¹⁵⁾。この研究で、親株大腸菌OW6株から取得されたCTAB耐性株OW66株のゲノム構造は、DNAマイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることが確認され、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていることが明らかとなっている。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に**soxR66**は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であると予想されている。さらに、**soxR66**変異はSoxRの機能を構成性にするため、結果として細胞のスーパーオキシド応答が構成的となり、スーパーオキシドジスムターゼを含むスーパーオキシドストレス防御タンパク質群の合成量の増加につながることが確認された¹⁶⁾。そこで、OW66株を取得した環境とは異なる環境でCTAB

耐性株を取得し、耐性株に生じたゲノム変異を次世代シーケンサーを用いて確認し、ストレス中に生じる細胞内変化と耐性獲得との関連性に関する基礎的知見の収集を行うことを目的とした。

7.2. 栄養豊富な環境でのCTAB耐性変異株の取得

OW66株はグルコースを炭素源とした無機塩培地で獲得した耐性変異株である。この培地の特徴は細胞のCTAB耐性を下げる効果が知られていた。そこで、タンパク質を多く含む栄養培地(L培地)を用いて新たに耐性菌を取得した。その結果、540μMのCTABを含む培地でも生育可能な自然突然変異株を取得することができた。また、高度耐性菌分離過程で出現した低程度・中程度耐性菌も同時に単離することができた。それぞれをL-50株(低程度)、L-200株(中程度)、L-540株(高程度)と名付けた(表6)。

表6. 各変異株におけるL培地中のCTABの最小発育阻止濃度(MIC*)

OW6株	OW66株	L-50株	L-200株	L-540株	M9-34株
30μM	100μM	40μM	200μM	100μM	30μM

*L培地で37℃、24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMICと定義した。

また、OW66株と同様の取得方法で単離された新しい変異株をM9-34株と名付けた。この中で、L-540株については取得時に540μMのCTABを含む培地で生育が確認されていたが、その後の継体培養処理によって、100μM以上のCTABを含むL培地では生育が困難であることが確認され、安定な耐性度としてはL-200株が最も高い耐性を示す結果となった。

7.3. 新規Lシリーズ耐性株およびM9-34株で生じた変異部位の決定

OW66株のCTAB耐性はゲノムに生じた変異に起因することがこれまでの研究で明らかとなっている。そこで、今回新たに取得された変異株についても、変異部位の同定をIllumina社製次世代シーケンサーMiSeqを用いて行った(表7)。

その結果、これまで7種類の変異しか確認されなかったOW66株についても、9種類の変異が確認された。多くの変異株で、脂質関連を排出するABCトランスポーターのサブユニットをコードしている**msbA**やAcrAB-TolC薬剤排出ポンプの発現制御遺伝子である**marR**に変異が生じており、これらの変異がCTAB耐性に関わっていると予想される。また、OW66株のCTAB耐性に関わる**soxR**にもL-50株では変異が確認されており、低程度のCTAB耐性に**soxR**変異が関与していると予想される。

*10 有限会社日革研究所研究員 博士(工学)

表7. 大腸菌CTAB耐性自然突然変異株で確認された遺伝子変異部位*

CW66	L-50	L-200	L-540	M9-34
遺伝子名 変異部位	遺伝子名 変異部位	遺伝子名 変異部位	遺伝子名 変異部位	遺伝子名 変異部位
<i>secA</i> 1塩基挿入				
		<i>yaeT</i> 1塩基置換	<i>dxr</i> 1塩基置換	
			<i>yaeT</i> 1塩基置換	
<i>msbA</i> 1塩基置換	<i>msbA</i> 1塩基置換	<i>intA</i> 1塩基置換	<i>intA</i> 1塩基置換	
	<i>stfE</i> 1塩基置換	<i>msbA</i> 1塩基置換	<i>msbA</i> 1塩基置換	
<i>ycdR</i> 1塩基置換	<i>ycdR</i> 1塩基置換		<i>ycfK</i> 1塩基置換	
	<i>marR</i> 1塩基置換	<i>marR</i> 1塩基置換	<i>marR</i> 1塩基置換	<i>marR</i> 1塩基置換
	<i>lpxM</i> 1塩基置換		<i>inaA</i> 1塩基置換	
<i>IVR</i> 10塩基挿入		<i>sohA</i> 1塩基挿入	<i>sohA</i> 1塩基挿入	
	<i>envR</i> 1塩基置換		<i>malT</i> 1塩基置換	
			<i>rfaZ</i> 1塩基欠失	
<i>rpoN</i> 12塩基欠失				
<i>pepQ</i> 1塩基置換				
<i>rpoB</i> 1塩基置換	<i>rpoB</i> 1塩基置換		<i>rpoB</i> 1塩基置換	
<i>rpoC</i> 1塩基置換				
<i>soxR</i> 1塩基挿入	<i>soxR</i> 1塩基挿入			

*大腸菌OW 6株のゲノム配列と比較し、異なっている遺伝子名をその変化とともに示した。なお、この結果はドラフトシーケンス結果より導いたものである。

なお、比較解析はドラフトゲノム配列から得られたものであり、今後、詳細に塩基配列変異の確認を行う予定である。これまでの研究で大腸菌のCTAB感受性は酸素が存在する好気条件で高く、酸素が存在しない嫌気条件では低い傾向があった。これはCTAB処理時に作用する活性酸素が好気条件で高濃度になるためであると推察されていた。また、この発生する活性酸素がゲノム変異を誘発するものと予想される。そこで、嫌気条件でのCTAB耐性自然突然変異株の取得を試みた。その結果、予想に反して500 μMのCTABを含むL培地で生育できるLana-500株が取得され、好気条件でのCTABのMICは50 μM、嫌気条件での400 μMと嫌気条件特異的耐性変異株であることが確認された。今後、Lana-500株のゲノム変異を次世代シーケンサーを用いて決定する予定である。

謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成25年度～平成29年度）」によって実施されたものである。

参考文献

- 1) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, D-及び L-アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響, Trace Nutrients Research, 31, 1-5 (2014).
- 2) 厚生労働省, 国民健康・栄養調査特別集計 国民健康・栄養調査 (平成22年, 23年), 18, http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkou_eiyouchousa_tokubetsushuukei_h22.pdf, access on February 25 (2014).

- 3) M. Yoshida, S. Kikunaga, J. Yamauchi, M. Tsubota-Utsugi, H. Kodama, A. Morita, T. Esashi, Dietary reference intakes for Japanese 2010, Microminerals. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 59, 91-102 (2013).
- 4) 厚生労働省, 平成23年国民健康・栄養調査報告, 第1部 栄養素等摂取状況調査の結果, 98-100, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h23-houkoku-04.pdf>, access on February 25 (2014).
- 5) 吉田宗弘, ミネラル, 下村吉治編, サプリメントのほんととウソ, ナッパ, 東京, 39-64 (2013).
- 6) H. Kitashiba, F. Li, H. Hirakawa, T. Kawanabe, Z. Zou, Y. Hasegawa, K. Tonosaki, S. Shirasawa, A. Fukushima, S. Yokoi, Y. Takahata, T. Kakizaki, M. Ishida, S. Okamoto, K. Sakamoto, K. Shirasawa, S. Tabata, T. Nishio, Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome, DNA Res., 21, 481-490 (2014).
- 7) 小柴恭一, 神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学 第2版, 講談社, 東京 (2010).
- 8) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene, Neuroscience Research, 88, 39-48 (2014).
- 9) K. Tsumura, T. Tomioka, R. Yamazoe, H. Kawa, H. Maruoka, K. Shimoke, T. Ikeuchi, Analysis of expression of immediate early genes including *nur77* gene during neurite outgrowth induced by HDAC inhibitors in PC12 cells, 日本生化学会, 京都 (2014).
- 10) 丸岡弘規, 頼光花, 松本勇樹, 南條祐子, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo* イメージングとその応用, 分子イメージング学会, 大阪 (2014).
- 11) 丸岡弘規, 南條祐子, 松本勇樹, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo* イメージングとその応用, 日本分子生物学会, 横浜 (2014).
- 12) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 13) Y. Matsumura, Biocontrol Sci., 20, 35-42 (2015).
- 14) M. Sasaki, J. Appl. Microbiol., 105, 1158-1169 (2008).
- 15) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 1895-1905 (2010).
- 16) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, J. Appl. Microbiol., 110, 568-579 (2011).

資料6-3. 2015年度 技苑「プロジェクト研究報告概要」

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

研究代表者：老川 典夫
研究分担者：細見 亮太・下家 浩二・松村 吉信・
吉田 宗弘・山中 一也
学外研究分担者：木村 博信・丸岡 弘規

1. D-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析と新規

D-アミノ酸生成酵素の同定

加藤志郎^{*1}、老川典夫^{*2}

1.1. はじめに

今日では、L-アミノ酸のみならずその鏡像異性体であるD-アミノ酸もまた真核生物の生命活動において重要な役割を担うと考えられている。また、哺乳動物において、経口摂取（食餌）・腹腔注射・静脈注射等による外因性D-アミノ酸投与が生体内D-アミノ酸の変動を誘起することや、D-アミノ酸の関与が示唆される疾病症状の緩和等の生理作用を示し得ることが報告されている。このような状況の背景として、食品中のD-アミノ酸含量およびその生成機序に対する関心が高まりを見せており¹⁾、本研究では乳酸菌を対象としてゲノム解析に基づく同菌のD-アミノ酸生産機構の解明を目的としている。

1.2. 乳酸菌のゲノム解析

本研究では、日本酒の発酵工程に用いられる乳酸菌を対象としており、酒造会社の酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株（*Lactobacillus sakei* LK-145、*Leuconostoc mesenteroides* LK-151）およびその対照として用いたD-アミノ酸生産能の低い基準株（Type strain）*L. sakei* LT-13（=*L. sakei* NBRC 15893^T）、*L. mesenteroides* LT-38（=*L. mesenteroides* NBRC 3426^T）の4株を解析に供した。

Roche社製の次世代シーケンサーGS junior 454を用いた500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析より得られたリードデータを基に*de novo*解析を行い各株ゲノムのドラフト配列を構築し、残ったギャップ領域の塩基配列をキャピラリーシーケンサーにて解析することで4株の乳酸菌ゲノムの完全長塩基配列解読を完了した。構築したゲノムマップおよびプ

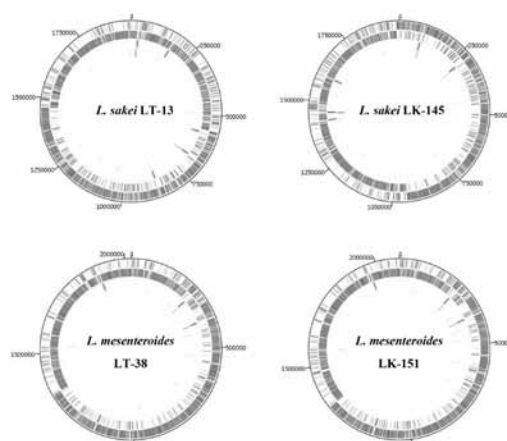


Fig. 1. ゲノムマップ

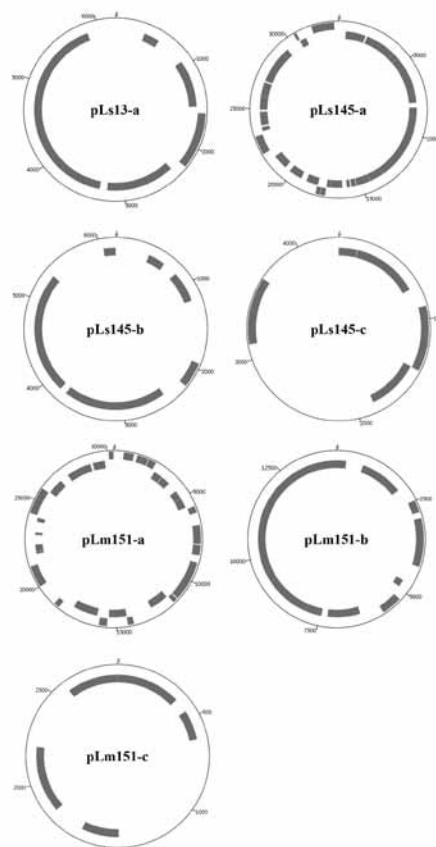


Fig. 2. プラスミドマップ

*1 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士（農学）

*2 化学生命工学部教授 博士（農学）

ラスミドマップをFig.1およびFig.2にそれぞれ記載した。国立遺伝学研究所のMiGAPを利用して、解読した各乳酸菌ゲノム中のCoding sequence (CDS) 推定および各遺伝子産物の機能推定、RBS推定、GC含量決定、tRNAおよびrRNAの推定を行った。また、検出された各乳酸菌が保持するプラスミドについてもMiGAPを利用した同様の解析を実施した。4株の乳酸菌全てにおいておよそ2,000程度の推定遺伝子が検出され、その数および推定機能ともに既報の同種乳酸菌と高い類似性を示した。推定のRBS数、GC含量、RNA遺伝子数もまた同様であった。現在、D-アミノ酸高生産株および低生産株間における比較ゲノム解析を実施しており、D-アミノ酸生産能への寄与が予測される遺伝子の探索を進めている。

1.3. 比較ゲノム解析による新規D-アミノ酸生成酵素の同定

構築した完全長ゲノム情報に基づく遺伝子機能予測から*L. sakei* LK-145 および *L. sakei* LT-13 のD-アミノ酸代謝酵素遺伝子を探索した結果、既知のD-アミノ酸生成酵素（アスパラギン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼおよびアラニンラセマーゼ）についてはそのOpen reading frame (ORF) 領域および推定のプロモーター領域内での塩基配列の相違は認められるものの、ORFの保存数および各ORF周辺のゲノム構造は共通していた。また、配列情報に基づく遺伝子機能予測からは他のD-アミノ酸生成酵素または分解酵素と予測される遺伝子は見出されなかった。そこで、KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) を用いて両株が有する代謝経路を推定し、経路間の比較解析を実施したところ、L-システイン代謝経路の保存性が異なることが見出された。D-アミノ酸生産能の低い基準株 *L. sakei* LT-13 が有する *malY* 遺伝子は、推定のシスタチオンβ-リアーゼをコードするが、同遺伝子はD-アミノ酸高生産株 *L. sakei* LK-145 ゲノム中には見出されない。そこで、*malY* 遺伝子周辺のゲノム構造に着目して *L. sakei* LT-13 および *L. sakei* LK-145 間の比較をした結果、同遺伝子を含む9つの遺伝子から成るおよそ8 kbの挿入領域が存在することが明らかとなった (Fig.3)。同挿入領域に存在する9つのORFは、PRDドメインタンパク質(2)、アミノペプチダーゼ(2)、PTSタンパク質(3)、RDDファミリータンパク質(1)およびMalYをそれぞれコードすると予測される。PRDドメインタンパク質は、PTSシステムの制御への関与が予測されるタンパク質であり、PTSシステムは細菌における重要な糖源取り込み系である。また、ゲノムデータベースにて公開されている乳酸菌のゲノム情報を探索すると、いくつかの乳酸菌においてゲノム上に *malY* 遺伝子が保持されており、*L.*

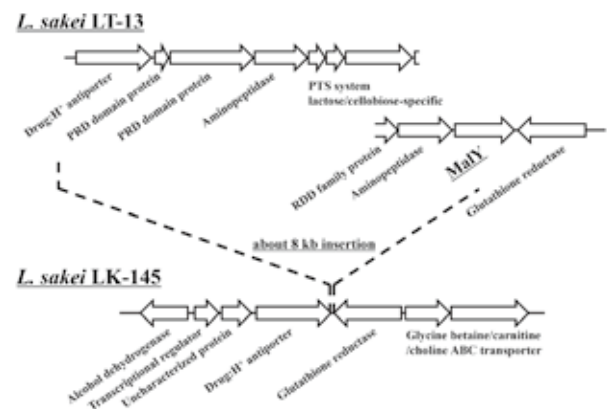


Fig. 3. *malY* 遺伝子周辺のゲノム構造

sakei LT-13 と同様に *malY* 遺伝子はPTSシステム関連遺伝子と同一クラスター内に位置している。これらのことから、乳酸菌における糖代謝とMalYの機能との間に何らかの関連があるものと予測される。

シスタチオンβ-リアーゼは、シスタチオンをホモシステインとピルビン酸、およびアンモニアに分解する反応を触媒する酵素であり、システイン代謝系の重要な段階を担う酵素である。大腸菌は同酵素遺伝子を2つ (*metC* および *malY*) 有しており、MetCがシスタチオンβ-リアーゼ活性に加えて、アラニンに対するラセミ化活性を有することが組み換え体酵素を用いた *in vitro* および大腸菌相補実験による *in vivo* において示されている。一方でMalYは、D-アラニン要求性大腸菌に過剰発現することでその生育を極めて弱く相補することが報告されているものの、その詳細は不分明なままである。本ゲノム解析の結果、*L. sakei* LT-13 は *malY* 遺伝子のみを有している (*metC* 遺伝子が欠失している) ことが明らかとなり、また、*L. sakei* LT-13 の推定システイン代謝経路において、シスタチオンβ-リアーゼが担う段階の前後を触媒する酵素をコードする遺伝子もまた欠失していることから、MalYがシステイン代謝とは異なる生理的役割を担うのではないかと考えられた。そこで、大腸菌を宿主として同酵素を異種発現し、精製した組み換え体酵素の機能解析を行ったところ、MalYは種々のアミノ酸に対するラセミ化活性を有することが明らかとなった (未公開データ)。現在、組み換え体酵素を用いた詳細な機能解析を進めるとともに、同酵素の *L. sakei* LT-13 におけるD-アミノ酸代謝との関連の解明を目的として *malY* 遺伝子破壊株の作製を試みているところである。

2. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの生育抑制と遺伝子発現量の変化

吉田宗弘^{*3}、廣瀬侑太郎^{*4}、細見亮太^{*5}

2.1. はじめに

セレンは高等動物、および一部の細菌類においては、酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン残基として存在しており、生存に必須の微量元素である。一方、植物においては、セレンを特異的に要求するタンパク質は発見されていないが、特殊な含セレンアミノ酸の生成が知られている。意図的にセレンを強化した野菜類からSe-メチルセレノシステイン（多くのセレン強化野菜類）、 γ -グルタミル-Se-メチルセレノシステイン（ニンニク、ニラなどの γ -グルタミルペプチドを合成できる植物）、セレノホモランチオニン（一部のセレン強化野菜類）などが同定されている²⁾。このような特殊なアミノ酸の生成は、高セレン環境下の植物において特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。本研究では、高等植物が持つ基本的な遺伝子を備えたシロイヌナズナに亜セレン酸を段階的に添加し、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって、亜セレン酸投与に伴い変化の生じる代謝系を検索した。

2.2. 実験方法

(1) 亜セレン酸曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナの培養には、亜セレン酸ナトリウム濃度 0、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とする寒天培地（MS培地）を用いた。長日条件の光周期のもと、無菌的に25℃で栽培した。1週間培養後、1粒の種子から得られた葉をすべて採取し重量を測定後、セレン含量を測定した。DNAマイクロアレイ用のサンプルは、開花段階まで培養したシロイヌナズナの茎頂部をRNAレーター（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬し、分析まで-70℃で保存した。

(2) セレン含量の測定

葉を秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸5 mLを加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸2 mLを加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。灰化した試料に超純水を加えて容量を10 mLとし、0.45 μm フィルターでろ過したものをセレン測定試料とした。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析法により行った。使用機種はICPMS-8500（島津製作所）、分析質量数は82、内部標準はロジウムとした。

(3) RNA抽出とDNAマイクロアレイ解析

シロイヌナズナ茎頂部からRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いた方法で総RNA抽出を行った。抽出した総RNAはNanoDrop1000を使用しRNA濃度を測定し、バイオアナライザー (Agilent Technologies)による品質検査を行った。各50 ngの総RNAを用いて、Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies)によりcDNAの合成、cRNAのラベルと増幅を行った。DNAチップはArabidopsisオリゴDNAマイクロアレイ Ver.4.0 (Agilent Technologies)を使用した。Agilent社推奨のプロトコルで、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンにより遺伝子発現強度を数値化し、各サンプル間で遺伝子発現量を比較した。

(4) マイクロアレイデータ解析

Ratioが2倍以上または0.5倍以下およびZ-Scoreが-2以下または+2以上に変動している遺伝子を抽出した。発現変動遺伝子のアノテーション情報を利用してGene Ontology (GO)のBiological Processに基づいてDAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)のgene-annotation enrichment analysis³⁾とQuick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)⁴⁾によって解析した。また、Pathway解析はDAVIDにおいてKEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)を利用して解析した。

(5) 統計解析

セレン含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用い、p値が0.05以下を有意差ありとした。また、DNAマイクロアレイデータは、Benjamini p値が0.05以下を有意差ありとした。

2.3. 結果および考察

Fig.4に、1週間培養したシロイヌナズナから採取した葉の重量とセレン含量を示した。亜セレン酸未添加と比較し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に葉重量の減少が確認された。亜セレン酸曝露によって、葉に含まれるセレン含量は用量依存的に上昇し、培地中の亜セレン酸が取り込まれていることが明らかになった。また、DNAマイクロアレイ用サンプル調製時において、培地中の亜セレン酸濃度1および5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では開花段階までの生育日数は亜セレン酸未添加と大差がなかったが、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では開花段階までに7日間余計にかかり、明らかな生育阻害がみられた。また、開花段階到達時のシロイヌナズナの長さは、亜セレン酸濃度に応じて段階的に短くなる傾向があり、特に10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では著しく短くなった。

次に、網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、シロイヌナズナ茎頂部よりRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析に供した。Table1に亜セレン

*3 化学生命工学部教授 農学博士・医学博士

*4 理工学研究科

*5 化学生命工学部助教 博士（工学）

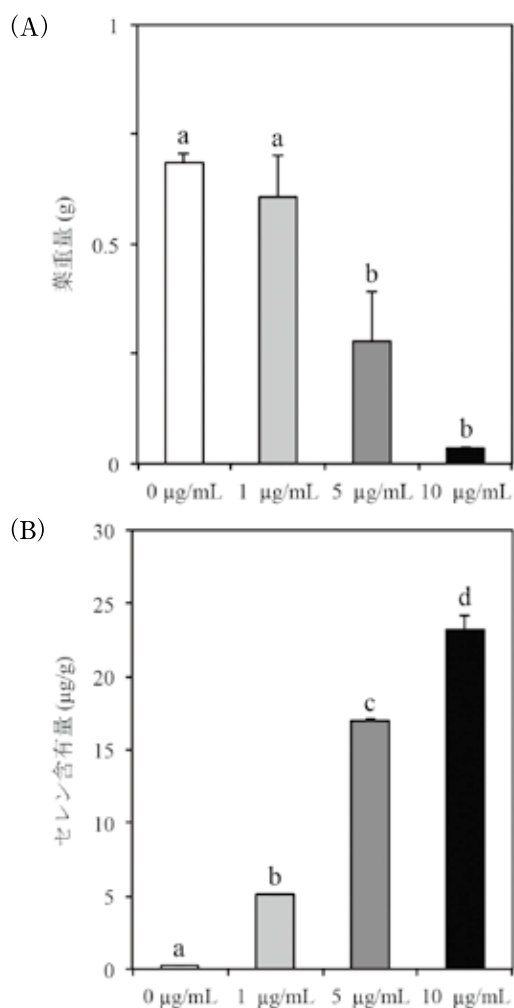


Fig. 4. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの葉重量 (A) とセレン含有量 (B)
 平均値±標準誤差 異なるアルファベット間では有意差あり (p < 0.05)

酸未添加と比較した際、2、5、10 倍以上変動した遺伝子数を示した。亜セレン酸 10 μg/mL では 1、5 μg/mL と比較して、多くの遺伝子の変動が見られた。発現量が 10 倍以上および 0.1 倍以下に変動しているものを抽出し、GO Biological Process のアノテーションに基づき Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。発現上昇した遺伝子セットには、主に酸化還元、グリコシド代謝、硫黄化合物代謝などの GO term が顕著に濃縮されていた。発現低下した遺伝子セットには、主に細胞周期、生長、花粉発育に関わる GO term が顕著に濃縮されていたため、生長に関わる機能をもつ遺伝子の発現が抑えられた結果、生育阻害がみられたと考えられる。

亜セレン酸 10 μg/mL では明らかな生育阻害が見られることから、遺伝子の発現変動が亜セレン酸曝露の影響か、または生育阻害による二次的な影響であるかを判断することが出来ない。そのために、以後のマイクロアレイ解析では明らかな生育阻害が見られず、葉に含まれるセレン含量が有意に増加していた 1 μg/mL と比較した。

Table 1. 亜セレン酸曝露によって変動したシロイヌナズナ茎頂部の遺伝子数

	2倍以上		5 倍以上		10倍以上	
	上昇	低下	上昇	低下	上昇	低下
1 μg/mL	1006	1717	202	249	52	43
5 μg/mL	663	1499	146	233	57	73
10 μg/mL	7045	11343	2073	6502	868	4500

亜セレン酸未添加との比較

未添加と 1 μg/mL 間の発現変動遺伝子について、Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。発現上昇した遺伝子セットには、defense response、innate immune response、response to organic substance などの GO term が顕著に濃縮されており、発現低下した遺伝子セットで濃縮された GO term においては、response to heat、response to temperature stimulus、response to high light intensity などストレス応答に関わる遺伝子が濃縮されていた。

次に、2 倍以上発現変動した遺伝子を DAVID の KEGG アノテーションを用い、発現変動遺伝子中に濃縮された KEGG パスウェイを検討した。発現が上昇したパスウェイとして Stilbenoid、diarylheptanoid and gingerol biosynthesis、Limonene and pinene degradation、Phenylpropanoid biosynthesis などの代謝変動が見られた。一方、発現が低下したパスウェイとして、Phenylpropanoid biosynthesis、Alanine、aspartate and lutamate metabolism といったアミノ酸代謝において発現変動がみられた。

さらに、KEGG パスウェイ中の Selenocompound metabolism に含まれる遺伝子を選別し、各遺伝子の亜セレン酸未添加との発現変動倍率を Table 2 に示した。

亜セレン酸 1、5 μg/mL においては 2 倍以上発現変動を示した遺伝子は見当たらなかった。10 μg/mL においては、セレノシステインをセレンとアラニンに分解する

Table 2. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ茎頂部のセレン化合物代謝遺伝子の発現変動倍率

Entry	Gene name	Definition	1 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL
AT5G49810	MMT	methionine S-methyltransferase	0.77	1.05	1.20
AT3G55400	OVA1	methionyl-tRNA synthetase	1.09	1.00	1.70
AT4G13780		probable methionine-tRNA ligase	1.05	0.97	0.85
AT1G64660	MGL	methionine gamma-lyase	0.75	1.19	0.50
AT3G03780	MS2	methionine synthase 2	0.86	1.54	<0.01
AT5G17920	ATMS1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.82	0.93	1.40
AT5G20980	MS3	methionine synthase 3	0.96	1.15	1.38
AT3G57050	CBL	cystathionine beta-lyase	1.10	1.00	1.88
AT1G33320		Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	1.56	1.05	2.03
AT3G01120	MT01	cystathionine gamma-synthase	0.79	1.17	1.09
AT1G08490	CPNIFS	cysteine desulfurase 2	1.00	1.16	2.37
AT2G17420	NTRA	NADPH-dependent thioredoxin reductase A	0.69	0.84	0.86
AT1G19920	APS2	ATP sulfurylase 2	1.01	1.11	1.20

亜セレン酸未添加との比較

cysteine desulfurase 2 (selenocysteine lyase) の遺伝子が含まれていた。また、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン合成系のglutathione S-transferaseの発現上昇がみられ、亜セレン酸によるグルタチオンの消費と過剰に生成したセレノシステインに対応するための代謝亢進が生じていると推定できる。本研究では、最も活発に細胞分裂していると考えられる茎頂部を用いて、マイクロアレイ解析に供した。そのために他の部位では異なる代謝変動を起こしている可能性がある。今後、得られた情報をもとに、リアルタイムPCRを用いて他の部位での遺伝子発現量を測定する必要があると考えられる。さらに、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンシングによるセレン含有アミノ酸に関与する候補遺伝子の選抜と、塩基配列決定による変異の検出およびエピゲノム解析による後天的な遺伝子制御機構を明らかにしていきたい。

3. エピジェネティックな遺伝子発現を介した神経突起伸長作用

下家浩二^{*6}、細見亮太、木村博信^{*7}、丸岡弘規^{*8}

3.1. はじめに

神経細胞は、特定の神経細胞群とシナプス結合を介した神経回路を形成している。この神経回路の形成過程では、特定の遺伝子群の発現が制御されることにより分化が進行し、神経回路を形成するために必須である神経突起が伸長する。この神経突起伸長過程で、エピジェネティックな分子機構で特定の遺伝子群の発現上昇がいかに関与しているかを解析することが本プロジェクトで求められている課題である。この課題の達成のために、DNAのメチル化と脱メチル化による遺伝子発現制御の解析を専門とする木村博信博士、ヒストン修飾による遺伝子発現制御機構の解析を専門とする丸岡弘規博士、生命体での特定分子の作用の解析を行う実験動物の取り扱いを専門とする細見亮太博士、細胞生物学的に神経突起伸長作用を解析することを専門とする本稿筆頭著者の下家浩二が、それぞれの専門性を生かすことにより、分子・細胞・個体（生体内）に関する生命現象の全てを俯瞰した研究結果を得るべく研究を実施した。本稿では上記の研究体制の下、医療にも応用が期待される神経突起伸長作用に関する研究がどこまで進展したかを報告する。

3.2. ヒストン修飾を伴う神経突起伸長作用の分子機構

神経損傷後の初期段階に見られる神経突起伸長のメカニズムの詳細を解析することは、その治療法の確立に非

常に有用である。本研究では、モデルニューロン細胞であるPC12細胞を使用した突起伸長作用の初期段階のメカニズムの詳細について解析を行っている。これまでに、HDAC阻害剤であるTSAや細胞内cAMPの濃度を上昇させるforskolin(FSK)が添加24時間以内に突起伸長作用を有することや、この突起伸長時にImmediate Early Genesの一つであるnur77またはgrp78が関与していることを明らかにしている⁵⁾。今回、新たにnur77以外のnur77ファミリー遺伝子であるnurr1とnor1の突起伸長への関与の可能性について解析を行った。その際、valproic acid(VPA)やFSK存在下、siRNA添加によるknock-down実験を行い、神経突起伸長作用の関与について解析を行った。その結果、FSK添加後ではnur77ファミリー遺伝子のすべてが神経突起伸長作用に関与することが示された。また、VPA添加後ではnor1遺伝子を除くnur77ファミリー遺伝子が関与することが示された。この時、nur77遺伝子の発現上昇は、ヒストンH3のリシン14番目のアセチル化(K14H3)を伴っていることが明らかとなった。よって、K14H3が他のファミリー遺伝子の発現上昇の関与について解析を行ったところ、nurr1遺伝子の発現上昇は、(K14H3)を介していた。しかし、nor1遺伝子の発現上昇は(K14H3)を介していなかった。この結果は、胎児ラットから脳を取り出した後の大脳皮質神経細胞を用いた実験でも確認された。さらに、nur77遺伝子のプロモーター領域とヒストンH3のリシン14番目のアセチル基とが結合することをChIPアッセイにより明らかにすることができた。また、nur77遺伝子のプロモーター領域において、どの領域が転写活性に重要なプロモーターアッセイにより解析した。その結果、転写開始上流-231から-37の領域を欠損させた場合、プロモーター活性が有意に減少することが分かった。この領域内の塩基配列にはCREB結合配列と相同性が高い転写基本因子AP1結合配列と転写基本因子SP1結合配列が存在していることが判明している。そこで、このAP1およびSP1結合配列を欠損させた時のレポーターアッセイも行った。その結果、AP1およびSP1結合配列を欠損させた場合のプロモーター活性が有意に低下することが分かった。以上の結果から、FSK添加による神経突起の伸長作用では、転写基本因子AP1およびSP1がエピジェネティックなnur77遺伝子の発現上昇に重要な役割を担っていることが示唆された。

3.3. DNAのメチル化とnur77遺伝子の発現制御

遺伝子の発現制御におけるDNA側の修飾（メチル化）の関与をバイサルフェートシーケンシング法やDNAのメチル化阻害剤decitabin(DCN)の添加実験で確認を試みた。その結果、nur77遺伝子上流にCpGアイランドを

^{*6} 化学生命工学部教授 博士（理学）

^{*7} 大阪大学蛋白質研究所助教 博士（理学）

^{*8} 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士（工学）

見出し、FSK添加後の神経突起伸長時におけるDNAのメチル化の検出を行ったが、DNAのメチル化は見られなかった。また、FSK存在下、DCNを添加したところFSK単独添加時の神経突起伸長度と変化が無かった。しかし、DCN単独添加時には、神経突起の伸長作用が現れたことからDNAのメチル化自体に神経突起伸長に関わる遺伝子群の発現制御が関わっていることが明らかになった。

3. 4. まとめ

我々の研究では、nur77ファミリー遺伝子群に着目し、ヒストンとDNAの修飾を観察することにより、神経突起伸長に関与するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにした。本稿では述べていないが、ヒストンのトリメチル化と遺伝子発現制御機構についても解析を終了しており、ヒストンのアセチル化とトリメチル化の役割の分担（機能の分担）についてもさらに解析が必要であると考えている。

4. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信*⁹

4. 1. はじめに

科学技術の進歩や新興国への技術移転によって地球規模の環境汚染の広がり、特にCO₂排出量の増加に伴う地球温暖化や自然分解速度の遅い合成有機化合物による環境破壊が世界的にも懸念されている。日本国においてもリサイクル技術の革新は進んでいるものの、その多くがサーマルリサイクル処理で、プロダクトリサイクルやマテリアルリサイクルなどのCO₂の排出抑制が期待できる技術は少ない。我々の研究室では、合成化学物を含む有機化合物の微生物処理法の開発に関する研究に着手し、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA(BPA)を分解する*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、有機系合成化合物分解特性を解析し、環境浄化および有機系廃棄物の生物学的処理の可能性について検討している。その研究成果として、本株がフェノール系化合物やビフェニル系化合物、有機塩素化合物など広範囲の合成化合物を分解することが可能であることが示された⁶⁾。また、研究室レベルだけではなく、土壌環境中でも十分に合成化合物分解能を発揮することが示されている⁷⁾。しかしながら、BPAを除く有機系合成化合物のAO1株の分解能力は低く、それらの分解能力は非常に不安定なものであり、培養過程で分解能を失った変異型AO1株(AO1L株など)が確認されている⁸⁾。

そこで、本プロジェクトではAO1株のゲノム構造を明らかにすると共に、AO1株の安定化ならびに有機系合成化合物分解能の強化につながるゲノム構造の改変を試みることを目的としている。これまでの研究ではAO1株のゲノム塩基配列をRoche社製の454プラットフォーム次世代シーケンサーとIllumina社製MiSeqを用いて解読し、ドラフトシーケンスを得たが、AO1株に内在する4種類のプラスミド配列や複数存在するトランスポゾン配列などの不明な点が多く、結果としてゲノム構造や遺伝子構造を把握することはできなかった。その中で、内在性プラスミドの一つpBAR1の全塩基配列の決定に成功するとともにAO1L株pBAR1における遺伝子欠失部位の特定に成功した。さらにこれらの情報をもとに、pBAR1の小型化によるBPA分解活性への影響も宿主としてAO1株およびAO1L株を用いて検討した。

4. 2. AO1株のpBAR1遺伝子構造解析

これまでにAO1株のドラフトシーケンスを明らかにしていたが、本年度はAO1L株のドラフトシーケンスと両株の存在する内在性プラスミドpBAR1の全塩基配列決定、さらに遺伝子アノテーションをCLC genomic workbench (Quiagen社) およびMiGAPで行った。その結果、AO1株のpBAR1にコードされている遺伝子は現在のところ67個(アミノ酸配列で30%以上相同性が確認されたORF)と推察された(Table3)。一方で、MiGAPを用いたバクテリアコドン使用頻度およびSD配列確認による遺伝子推定では83個が確認されている。現在、メイトペアシーケンス法を用いた全ゲノム配列決定を試みている。

4. 3. AO1株およびAO1L株のpBAR1欠失領域の特定

MiSeqを用いてAO1L株のドラフトシーケンスを明らかにし、AO1株とのゲノム構造比較を試みた結果、pBAR1で4箇所の欠失が観察された。この欠失部位の両端はトランスポゾン部位に対応し、トランスポゾンの働きがゲノム構造の欠失に深く関与しているとも予想された(Fig.5)。またこの欠失により、BPA分解に関わる***bisdAB***とその関与が予想される***adh1***、***lsd1***、***bisdF***、***had***のすべての遺伝子が欠失していることも確認された。

4. 4. 遺伝子組換え法を用いたAO1株およびAO1L株の改変とBPA分解に及ぼす影響

上述の結果から、BPA分解に関与する***bisdAB***と***adh1***、***lsd1***、***bisdF***、***had***の不安定性を解消することがAO1株のBPAや合成有機化合物分解能の向上に重要であると考えられる。また、Badiefarらの研究で*Enterobacter*

*⁹ 化学生命工学部教授 博士(工学)

Table 3. pBAR1遺伝子の予測された機能

No.	Gene	Putative function	No.	Gene	Putative function
1	<i>bisdA</i>	ferredoxin	35	<i>orf8</i>	transposase (partial)
2	<i>bisdB</i>	cytochrom P450	36	<i>orf9</i>	transcriptional regulator, TetR family
3	<i>tnpA2a</i>	transposase of IS6100	37	<i>araC1</i>	transcriptional regulator, ArcC family
4	<i>tnpA7</i>	transposase (partial)	38	<i>bisdF</i>	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase
5	<i>orf3</i>	hypothetical	39	<i>int1</i>	integrase-like protein
6	<i>orf4</i>	Xre-family transcriptional regulator (partial)	40	<i>tnpA2a</i>	transposase of IS6100
7	<i>orf5</i>	hypothetical	41	<i>gmc1</i>	choline dehydrogenase (partial)
8	<i>orf6</i>	hypothetical	42	<i>orf10</i>	hypothetical
9	<i>trbN</i>	muramidase TrbN (partial)	43	<i>istB1</i>	putative transposase
10	<i>trbL</i>	conjugal transfer protein TrbL	44	<i>tnpA4</i>	putative transposase (partial)
11	<i>trbJ</i>	conjugal transfer protein TrbJ	45	<i>tnpA5</i>	transposase of IS6100
12	<i>trbI</i>	conjugal transfer protein TrbI	46	<i>orf11</i>	TonB-dependent receptor (partial)
13	<i>orf14</i>	conjugal transfer protein TrbH	47	<i>tnpA2b</i>	transposase of IS6100 (partial)
14	<i>trbG</i>	conjugal transfer protein TrbG	48	<i>mpr</i>	MPR protein
15	<i>trbF</i>	conjugal transfer protein TrbF (partial)	49	<i>orf12</i>	hypothetical protein
16	<i>trbE</i>	conjugal transfer protein TrbE	50	<i>dam</i>	DNA methylase
17	<i>trbD</i>	conjugal transfer protein TrbD	51	<i>orf13</i>	hypothetical protein
18	<i>trbC</i>	conjugal transfer protein TrbC (partial)	52	<i>dnaG</i>	DNA primase dnaG
19	<i>trbB</i>	conjugal transfer protein TrbB	53	<i>traE</i>	conjugal transfer protein TraE
20	<i>trbA</i>	conjugal transfer protein TrbA	54	<i>traG</i>	conjugal transfer protein TraG
21	<i>tnpA3</i>	transposase Tn3 family protein	55	<i>traI</i>	conjugal transfer protein TraI
22	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein	56	<i>traL</i>	conjugal transfer protein TraL
23	<i>tnpA6</i>	transposase (partial)	57	<i>traN</i>	conjugal transfer protein TraN
24	<i>had1</i>	haloacid dehalogenase-like hydrolase	58	<i>parB</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParB
25	<i>pyc1</i>	pyruvate carboxylase	59	<i>parA</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParA
26	<i>cps1</i>	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding	60	<i>korA</i>	KorA protein
27	<i>orf15</i>	biotin carboxyl carrier protein	61	<i>kicA</i>	antirestriction protein KicA
28	<i>orf2</i>	hypothetical	62	<i>orf14</i>	hypothetical
29	<i>orf1</i>	hypothetical	63	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein
30	<i>orf12</i>	4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	64	<i>tnpA3</i>	transposase Tn3 family protein
31	<i>orf13</i>	hypothetical	65	<i>trbA</i>	conjugal transfer protein TrbB (partial)
32	<i>adh1</i>	aldehyde dehydrogenase	66	<i>trbB</i>	conjugal transfer protein TrbA
33	<i>orf7</i>	TonB-dependent receptor (partial)	67	<i>tnpA1</i>	transposase of IS6100
34	<i>lsd1</i>	lignostilbene- α,β -dioxygenase			

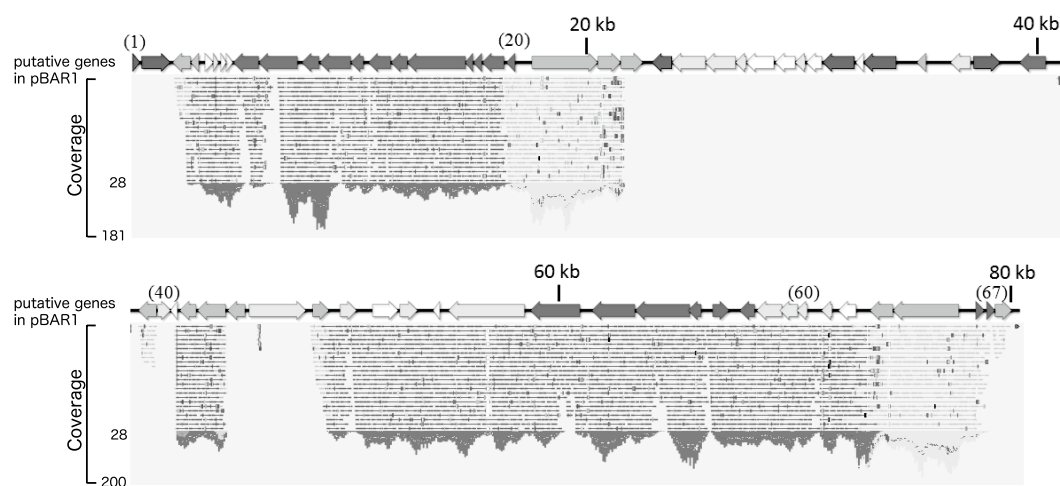


Fig. 5. AO1株およびAO1L株のpBAR1の構造比較

AO1L株ゲノムのドラフトシーケンスで得られた断片配列をAO1株のpBAR1配列と比較した。上段がAO1株pBAR1遺伝子構造で下段がドラフトシーケンス断片、Coverageは断片数を示す。AO1株pBAR1遺伝子構造上の(番号)はTable3の遺伝子番号に対応している。遺伝子は矢印で示した。

gergoviae BYK-7 の**bisdAB**組換え体でBPA分解能が向上することも報告されている⁹⁾。そこで、これら6遺伝子をコードする組換えプラスミドpJN105-bidABF-had-adh-lsdをin-fusionクローニング法で構築し (Fig.6)、AO1株およびAO1L株に導入し、BPA分解能を調査した。その結果、AO1株では顕著なBPA分解能の向上は観察されなかったが、AO1L株ではBPA分解能の回復が観察され、*bisdAB*、*adh1*、*lsd1*、*bisdF*、*had*のすべてあるいは一部が機能していることが確認された (Fig.7)。一

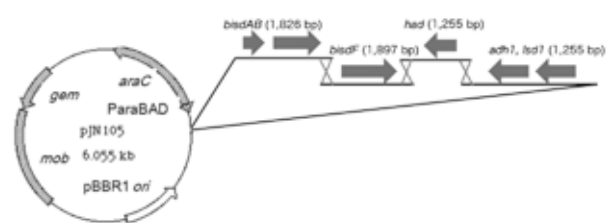


Fig. 6. pJN105-bidABF-had-adh-lsdの構造

pJN105に導入した6個の遺伝子はそれぞれ遺伝子本来のプロモーターで発現するように設計されている。

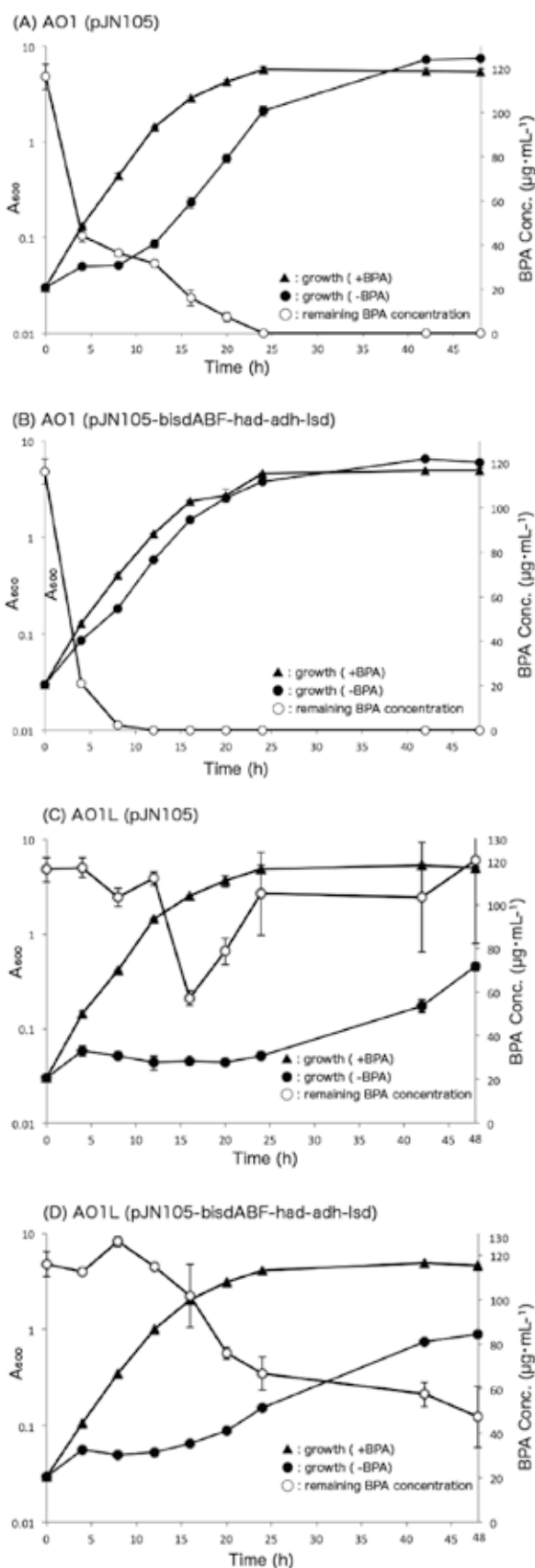


Fig. 7. 遺伝子組換え体のBPA分解能比較
組換え体を培養し、残存BPA量 (open symbols) と培養液吸光度 (A_{600} , closed symbols) を測定した。培地には $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ のゲンタマイシンを含むL培地 (L-Gm10培地, triangles) と $115\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ BPAを含むL-Gm10培地 (circles) を用いた。各実験は3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

方で、これら遺伝子の機能発現が十分でないことも予想されるため、今後、BPA代謝系遺伝子すべてを解明するとともに、それらの発現量を測定し、十分に発現していない遺伝子についてはその向上を目指す予定である。

5. 抗菌剤耐性菌に生じるゲノム変異の発生要因の解析

松村吉信、中田訓浩^{*10}

5.1. はじめに

病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底と効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて大きな脅威とはなっていない。しかしながら、病院環境などでは、薬剤耐性菌の出現により院内感染が発生し、入院あるいは来院患者の感染症の集団発生につながり、場合によっては死亡事故として報道され大きな社会問題となっている。現時点ではその原因について解明されていないものの、継続的な必要量以上の抗菌剤使用が微生物を耐性化させているものと予想され、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発、それらの適用方法の確立が求められている。そこで本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程を解析し、どのように耐性株が出現するのかの原因と耐性化仕組みの解明を目的とした。

これまでの研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤 (第四アンモニウム塩) である臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) で処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している¹⁰⁾。この研究で、親株大腸菌OW6株から取得されたCTAB耐性株OW66株のゲノム構造は、DNAマイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることが確認され、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていることが明らかとなっている。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に、*soxR66*は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であると考えられている。さらに、*soxR66*変異はSoxRの機能を構成性にするため、結果として細胞のスーパーオキシド応用が構成的となり、スーパーオキシドジスムターゼを含むスーパーオキシドストレス防御タンパク質群の合成量の増加につながることが確認された¹¹⁾。また、昨年度までの研究で、新たに取得したCTAB耐性株においても複数のゲノム上の変異が確認され、抗菌剤処理による変異の蓄積に再現性が確認された。一方で、変異部位については一部に類似性は確認されるものの、変異の再現性が高いと判断されるものではなかった。今年度の研究では、得られている耐性菌の特性解析を試みた。

*10 有限会社日革研究所研究開発員 博士 (工学)

5.2. 新規耐性変異株の耐性度比較

これまで、CTABを含む抗菌剤の耐性度を生育を基準とした最小発育阻止濃度(MIC)を用いてきたが、死滅を基準とした最小殺菌濃度(MBC)での比較を新たに加えた (Table4)。

Table 4. 各変異株におけるCTABの最小発育阻止濃度(MIC^{*a})と最小殺菌濃度(MBC^{*b})

Strain	MIC	MBC
OW6	30	100
OW66	100	300
L-50	40	100
L-200	200	300
L-540	100	300
M9-34	30	200

*a: 各種濃度のCTABを含むL培地で37°C、24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMICと定義した。

*b: 対数増殖期中期細胞($A_{600}=0.03$)を各種濃度のCTABを含む緩衝液(37°C)で1時間処理後、L培地(37°C)で24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMBCと定義した。

その結果、野生株および多くの耐性株ではMIC値/MBC値が約1/3を示すのに対して、L-200株では約2/3、M9-34株では約1/7を示した。この結果で、L-200株やM9-34株では細胞の一部でCTAB耐性の非常に高いものが比較的多く含まれているものと予想され、それらの中にpersister cell (永生細胞)と呼ばれる休眠型細胞が含まれるものと予想された。そこで、L-200株についてCTAB処理の生残数を測定するとともに、長時間のCTAB処理で生き残った株の耐性度を再度増殖させた後の耐性度と比較した。その結果、定常期初期細胞を100

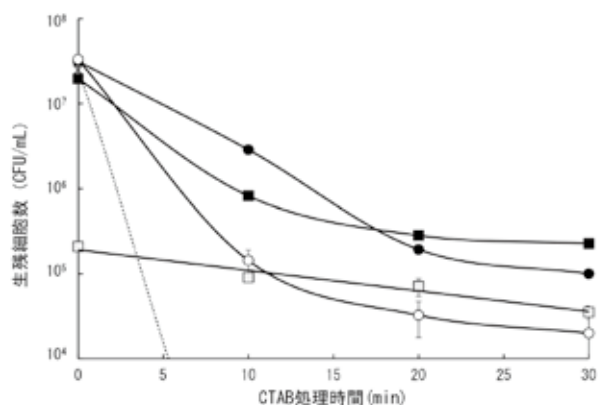


Fig. 8. pJN105-bidABF-had-adh-lsdの構造

大腸菌細胞をL培地、37°Cで定常期初期まで培養した。CTAB処理は新鮮なL培地、37°Cで行い、初発細胞濃度は $A_{600}=0.03$ とした。生残細胞数はL寒天培地のコロニーカウント法で測定した。各実験は3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。Open symbolsは200 μ M CTABで、closed symbolsは100 μ M CTABで処理した。Circlesは定常期初期細胞をその直後にCTAB処理した。Squaresは定常期初期細胞を100 μ M CTABで37°Cで20分間処理した永生細胞のみを使用した。なお、open squaresは永生細胞を再培養せずに、closed squaresは永生細胞を定常期初期まで再培養後CTAB処理している。

μ M CTABで処理した場合、約1.0%の非常に高いCTAB耐性の細胞集団が存在していることが確認され、その集団のCTAB耐性は再度の200 μ M 処理でも十分に確認され、この集団が休眠型細胞集団である永生細胞集団であると予想された (Fig.8)。一方で、この永生細胞集団を再度培養すると、その耐性度は初回のCTAB耐性能力と同等であり、この結果もこの集団が永生細胞集団であることを示している。さらに、野生株OW6株の場合の永生細胞の出現割合は0.01%以下であったことから、L-200株が永生細胞を形成しやすい変異を有しているものと予想された。今後、CTAB処理による変異発生機構の解明とともに永生細胞の出現機構の解明も試みる予定である。

6. シロイヌナズナ由来selenocysteine Se-methyltransferaseホモログのin vivo及びin vitro機能解析に向けた異種発現系の構築

山中一也^{*11}、細見亮太、吉田宗弘、老川典夫

6.1. はじめに

セレン(Se)は幅広い生物において必須の微量元素である一方で、高濃度では致死的影响を引き起こす。種々の高等植物の内、Se高蓄積植物として知られるレンゲソウ(*Astragalus bisulcatus*)やブロッコリー(*Brassica oleracea*)では、SeをSe-methylseleno-cysteine(Se-MeSeCys)として蓄積し、さらにSe-MeSeCysは揮発性のdimethyl diselenide(DMDSe)へと代謝された後、生体外へ排出される。このSe代謝における鍵酵素selenocysteine methyltransferase(SMT)は、selenocysteine(Se-Cys)のSe-メチル化により、非タンパク性アミノ酸であるSe-MeSeCysへの変換を特異的に触媒する酵素であり、SeCysから誘導され得るselenomethionine(SeMet)のタンパク質への取り込みを抑制することで、高濃度Se環境下での植物体への毒性緩和に寄与していると考えられる。実際、レンゲソウ由来のSMT(Ab-SMT)を高発現させることにより、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)及びカラシ菜(*Brassica juncea*)、さらに大腸菌においてもSe耐性及び蓄積が増強することが報告されている¹²⁾。また、セレン酸暴露下のブロッコリーでは、SMT遺伝子の発現及びSe-MeSeCys生産量が顕著に上昇することも確認されていることから¹³⁾、他の多くの生物においてもSMTがSe代謝の中心的役割を果たしていると言える。

一方、モデル植物である*A. thaliana*(シロイヌナズナ)においては、SMTに関する研究報告はない。しかし、同植物ゲノム上にはレンゲソウ由来のSMT(Ab-SMT)

*11 化学生命工学部准教授 博士(生物資源学)

と高い一次構造上の相同性を示す3つのHomocysteine S-methyltransferase (At-HMT-1, -2, -3) 遺伝子の存在が確認されていることから、*A. thaliana*ではHMTホモログがSe代謝に関与する可能性が考えられる。しかしながら、先行して実施された亜セレン酸暴露した同植物のmRNAマイクロアレイ解析の結果は、予想に反していずれのHMT遺伝子の発現制御もSe暴露に対して直接的には応答しないことを示すものであった。また、At-HMT-1及び-2は、共にSMT活性を示さず、Se代謝には関与しないことが報告されている¹⁴⁾。しかしながら、At-HMT3については、直接的なSMT活性の評価は行われておらず、酵素レベルでのSe代謝への関与は未だ不明なままである。そこで、Ab-SMTと高い相同性を示すAt-HMT-3の酵素科学的性質を明らかにし、シロイヌナズナにおけるSe代謝への関与を検証することを目的として、研究に着手した。

6.2. 新規MBP融合タンパク質発現ベクターを用いた発現系の構築

*A. thaliana*のcDNAクローン(RAFL19-23-M07)から、At-HMT3遺伝子をPCR増幅し、pET-21bベクターへクローン化した。*E. coli* Rosetta (DE3)を宿主としてAt-HMT3の発現を試みたが、発現タンパク質のほとんどは不溶性顆粒を形成し、機能的可溶性酵素として得ることは出来なかった。

そこで、可溶性発現の向上に高い効果を有することが知られているマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として目的タンパク質発現を実現する新規MBP融合タンパク質発現ベクターを構築し、これを用いた発現検討を行った。その結果、著量のMBP融合型のAt-HMT3を可溶性タンパク質として得ることに成功した。

6.3. 今後の展望

本研究の過程で開発した新規MBP融合タンパク質発現ベクターを用いることにより、従来は不可能であったAt-HMT3の可溶性発現化可能となった。今後は、本酵素の*in vitro*での詳細な機能解析を進める予定である。

謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年度～平成29年度)」によって実施されたものである。

参考文献

- 1) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸菌のゲノム解析: 現状とD-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用へ向けて, Trace Nutrients Research, 32, 78-82 (2015).
- 2) 吉田宗弘, 食品中のセレンの分布と栄養有効性, Biomed. Res. Trace Elements, 19, 290-296 (2008).
- 3) W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, Nat. Protoc., 4, 44-57 (2009).
- 4) D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, R. Apweiler, QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching, Bioinformatics, 25, 3045-3046 (2009).
- 5) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic control of upregulation of GRP78 expression for promotion of neurite elongation and attenuation of cell death via PKA-mediated signaling in PC12 cells, Clin. Pharmacol. Biopharma., 4, 150-154 (2015).
- 6) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 7) Y. Matsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, Biocontrol Sci., 20, 35-42 (2015).
- 8) M. Sasaki, T. Tsuchido, Y. Matsumura, J. Appl. Microbiol., 105, 1158-1169 (2008).
- 9) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, J. M. Garcia-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh, RSC Adv., 5, 29563-29572 (2015).
- 10) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 1895-1905 (2010).
- 11) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, J. Appl. Microbiol., 110, 568-579 (2011).
- 12) D. L. LeDuc *et al.*, Overexpression of seleno-cysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation, Plant Physiol., 135, 377-383 (2004).
- 13) S. M. Lyi *et al.*, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methyl-selenocysteine synthesis in broccoli, Plant Physiol., 138, 409-420 (2005).
- 14) P. Ranocha *et al.*, The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity, Plant J., 25, 575-584 (2001).

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

平成27年度 研究成果一覧表

論文

- (1) S. Kato, Y. Masuda, M. Konishi, T. Oikawa, Enantioselective analysis of D- and L-amino acids from mouse macrophages using high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116, 101-104 (2015).
- (2) T. Fujii, T. Yamauchi, M. Ishiyama, Y. Gogami, T. Oikawa, Y. Hata, Crystallographic studies of aspartate racemase from *Lactobacillus sakei* NBRC 15893, *Acta Crystallographica Section F*, 71, 1012-1016 (2015).
- (3) M. Yoshida, M. Nakagawa, R. Hosomi, T. Nishiyama, K. Fukunaga, Low Molybdenum State Induced by Tungsten as a Model of Molybdenum Deficiency in Rats, *Biological Trace Element Research*, 165, 75-80 (2015).
- (4) 廣瀬侑太郎, 崔懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の希塩酸抽出物に含まれるセレンの栄養有効性, *微量栄養素研究*, 32, 1-3 (2015).
- (5) 高井彩帆, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜鉛の過不足によるカイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon') スプラウトの亜鉛濃度および遺伝子発現量への影響, *微量栄養素研究*, 32, 34-39 (2015).
- (6) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic Control of Upregulation of GRP78 Expression for Promotion of Neurite Elongation and Attenuation of Cell Death via PKA-Mediated Signaling in PC12 Cells, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, 4(4), 150 (2015).
- (7) K. Shimoke, Endocrine Disrupting Chemicals - Inducers of Epigenetic Gene Expression and Enhancers of Cell Death in Neurons, *Journal of Bioengineering and Biomedical Science*, 6(1), e122 (2015).
- (8) T. Yoshimura, N. Shibata, Y. Hamano, K. Yamanaka, Heterologous Production of Hyaluronic Acid in an ϵ -Poly-L-Lysine Producer, *Streptomyces albulus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3631-3640 (2015).

国際学会

- (1) R. Hosomi, K. Miyauchi, H. Arai, T. Nishiyama, M. Yoshida, K. Fukunaga, Salmon protamine decreases serum and liver lipid contents by inhibiting lipid absorption in an *in vitro* gastrointestinal digestion model and in rats, The 6th International Conference on Food Factors, P-0326, Korea (2015).
- (2) K. Shimoke, R. Yamazoe, T. Tomioka, K. Tsumura, Y. Nishihata, H. Maruoka, Involvement of specific nur77 family genes during neurite outgrowth induced by forskolin and a histone deacetylase inhibitor in PC12 cells, 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, F18, USA (2015).

国内学会

- (1) 加藤志郎, 老川典夫, Genome analysis-based approach to elucidate the molecular mechanism of high-level D-amino acids production by lactic acid bacteria, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, W5-9, 兵庫 (2015).
- (2) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* 由来シスタチオンin β -リアーゼの機能解析, 第11回D-アミノ酸学会学術講演会, 35, 新潟 (2015).
- (3) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸高生産乳酸菌のドラフトゲノム解析, 第62回日本生化学会近畿支部例会, A10, 滋賀 (2015).
- (4) 鷺尾翼, 老川典夫, *Thermococcus litoralis* DSM 5473の耐熱性L-アスパラギン酸オキシダーゼの分子特性の解析, 日本ビタミン学会第67回大会, 2-IV-21, 奈良 (2015).
- (5) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸を高生産する乳酸球菌のゲノム解析, 第32回日本微量栄養素学会学術集会, O-1, 京都 (2015).

- (6) 森田朱香, 老川典夫, 乳酸菌*Lactobacillus sakei* LK-145のD-アミノ酸生産に及ぼす培地成分と培養条件の影響, 第32回日本微量栄養素学会学術集会, P-6, 京都 (2015).
- (7) 廣瀬侑太郎, 崔懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性, 第32回日本微量栄養素学会学術集会, O-5, 京都 (2015).
- (8) 高井彩帆, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜鉛の過不足によるカイワレダイコンの遺伝子発現量の変化, 第32回日本微量栄養素学会学術集会, P-5, 京都 (2015).
- (9) 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの生育抑制と遺伝子発現量の変化, 第26回日本微量元素学会学術集会, 1103-1, 北海道 (2015).
- (10) 吉田宗弘, 齊悦, 細見亮太, 福永健治, 低鉄飼料を投与したラットの臓器中マンガン濃度, 第26回日本微量元素学会学術集会, 1202-8, 北海道 (2015).
- (11) 山添亮輔, 西畑慶紀, 津村風帆, 島山恵利花, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, Relevance between the expression of nur family genes and the neurite outgrowth through the histone modification, 第58回日本神経化学学会大会, 3P-52, 埼玉 (2015).
- (12) 青山大輝, 藤枝聡志, 玄古宗一郎, 松浦玖実, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Neurite outgrowth and bipolarization in PC12 cells and cerebral cortical neurons induced by a low concentration of bisphenol A, 第58回日本神経化学学会大会, 3P-03, 埼玉 (2015).
- (13) 島山恵利花, 津村風帆, 井戸大記, 丸岡弘規, 富岡拓磨, 山添亮輔, 下家浩二, Forskolinによって誘導されるPC12細胞の神経突起伸長と最初期遺伝子nur77を介した発現機構の詳細, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会 1LBA109, 兵庫 (2015).
- (14) 山添亮輔, 山本宇晃, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, nur77ファミリー遺伝子の発現はヒストン修飾によるエピジェネティックな分子制御機構を介している, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, 3P1315, 兵庫 (2015).
- (15) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Forskolinによる神経突起伸長を誘導するnur77遺伝子上流の転写活性制御機構, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, 3P1316, 兵庫 (2015).
- (16) 松浦玖実, 青山大輝, 藤枝聡志, 山添亮輔, 玄古宗一郎, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Bisphenol Aによる神経突起伸長における細胞内分子機構の解析, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会, 3P1317, 兵庫 (2015).
- (17) 高未麗, 木場悟, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株の環境汚染物質分解能の向上とゲノム構造解析, 第67回日本生物工学会大会, 2P-150, 鹿児島 (2015).
- (18) 御厨真幸, 中谷宗幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌の変異部位の決定とその働きに関する研究, 第67回日本生物工学会大会, 3P-007, 鹿児島 (2015).
- (19) 高未麗, 木場悟, 中川直也, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株の環境汚染物質分解の効率化とゲノム構造解析, 日本防菌防黴学会第42回年次大会, 1Pp53, 大阪 (2015).
- (20) 中谷宗幸, 御厨真幸, 松村吉信, 嫌気条件下における抗菌性界面活性剤の抗菌作用に関する研究, 日本防菌防黴学会第42回年次大会, 2Pp51, 大阪 (2015).
- (21) 御厨真幸, 中谷宗幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性株の変異領域の確認, 日本防菌防黴学会第42回年次大会, 2Pp52, 大阪 (2015).
- (22) 吉村友宏, 柴田展行, 濱野吉十, 山中一也, ポリリジン生産放線菌*Streptomyces albulus*を宿主とした有用物質異種生産システムの開発, 第67回日本生物工学会大会, 2P-001, 鹿児島 (2015).
- (23) 吉村友宏, 柴田展行, 濱野吉十, 山中一也, ポリリジン生産放線菌*Streptomyces albulus*を宿主とした高分子量ヒアルロン酸及び5-アミノレブリン酸の異種生産, 第67回日本生物工学会2015年度大会, 2P-002, 鹿児島 (2015).

その他

- (1) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸菌のゲノム解析: 現状とD-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用へ向けて, Trace Nutrients Research, 32, 78-82 (2015).
- (2) 森田朱香, 老川典夫, クエン酸が乳酸菌の生育と代謝に及ぼす影響, Trace Nutrients Research, 32, 86-89 (2015).
- (3) 老川典夫, 日本酒の新たな呈味性成分「D-アミノ酸」, 日本醸造協会誌, 110(4), 189-197 (2015).

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

研究代表者：老川 典夫
研究分担者：細見 亮太・下家 浩二・松村 吉信・吉田 宗弘
山中 一也
学外研究分担者：木村 博信・丸岡 弘規

1. 乳酸菌のD-アミノ酸高生産機構の解明へ向けて

加藤志郎^{*1}、老川典夫^{*2}

1.1. はじめに

今日では、内因性のみならず外因性D-アミノ酸もまた哺乳動物生体内における生理作用を示し得ることが示唆されつつある。また、いくつかの疾病に罹患した患者の生体内D-アミノ酸（D-Ser、D-Asp）濃度の低下が観測されるに至り、外因性D-アミノ酸の供給源としての食品中D-アミノ酸含量に対する関心が高まりを見せている。一方で、日本国において食品添加物としての使用が認可されているD-アミノ酸はわずか4種類であり（D-Ala、D-Met、D-Trp、D-Thr）、いずれもラセミ体としての使用のみが認められている。従って、外因性D-アミノ酸の摂取は原料または製造過程において産生した食品中D-アミノ酸に頼らざるを得ない。そこで本研究では、当研究室のこれまでの研究によりD-アミノ酸濃度が特に高く、乳酸菌がそのD-アミノ酸生産に寄与することが明らかとなっている日本酒¹⁾に着目し、日本酒の製造に必須の乳酸菌のゲノム解析を基盤としたD-アミノ酸生産機構の解明を目指している。

1.2. ゲノム解析を通した乳酸菌のD-アミノ酸高生産機構へのアプローチ

我々は既に、Roche社製の次世代シーケンサーGS junior 454 およびキャピラリーシーケンサーを用いて、酒造会社の酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株（*Lactobacillus sakei* LK-145）およびその対照として用いたD-アミノ酸生産能の低い基準株（*L. sakei* LT-13（=*L. sakei* NBRC 15893^T））の全ゲノム配列の解読を完了している²⁾。既知のD-アミノ酸生合成酵素または分解酵素をコードすると予測される遺伝子の保存性は両株に共通であったが、KEGG Automatic Annotation Server

を用いて構築した推定のアミノ酸代謝経路の比較から推定のシスタチオンβ-リアーゼ（MalY）の保存性が異なることを見出し、同組み換え体酵素を用いた解析を実施してきた。本酵素は、その配列からの予測通りにシスタチオンβ-リアーゼ活性を有すると同時に、アラニンをはじめとする様々なアミノ酸に対するラセミ化活性を有することを見出し、我々は同酵素が新規二機能性アミノ酸ラセマーゼであることを明らかにした（未公開データ）。

MalYの研究は大腸菌において最も進んでおり、大腸菌MalYはmaltose regulonのrepressorであることが知られている。近年、同酵素が大腸菌におけるD-Ala代謝に関与する可能性が示唆されたものの、その詳細は不明なままである³⁾。我々が同定した乳酸菌MalYは大腸菌MalYと高い相同性を示すことから、大腸菌MalYもまた同様の活性を有する多機能型酵素である可能性が示唆され、その生理的機能に興味が持たれる。

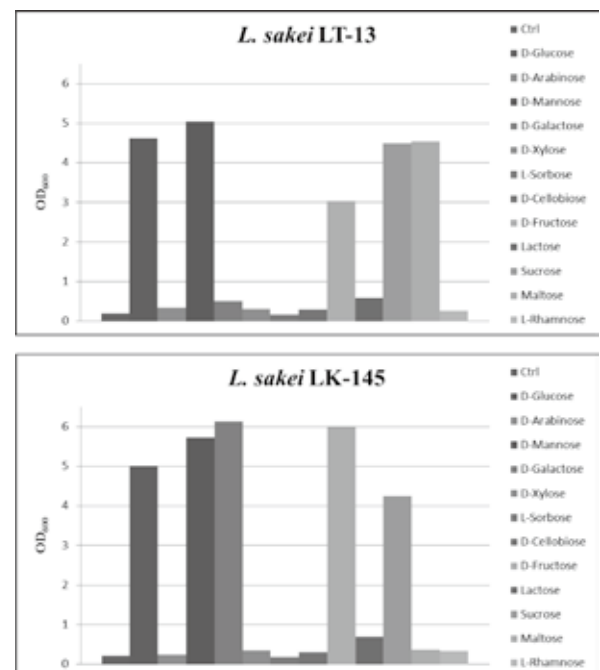


図1. 糖資化性試験
糖源を改変したMRS培地を用いて培養した際の生育試験

*1 香川大学国際希少糖研究教育機構助教 博士（農学）

*2 化学生命工学部教授 博士（農学）

大腸菌ゲノム上において $malY$ 遺伝子はmaltose代謝関連遺伝子とクラスターを形成している一方で、乳酸菌においては他の糖 (lactose、cellobiose) 代謝に寄与すると予測されるPTS関連遺伝子群とクラスターを形成している²⁾。また、 $malY$ 遺伝子を保持する乳酸菌 (LT-13) ゲノム上には推定のmaltose regulon関連遺伝子が保存されていない。そこで我々は、前記2株の乳酸菌を用いて種々の糖に対する糖資化性試験を行った。その結果、両株ともにlactoseおよびcellobioseに対する資化能を欠くとともに、LT-13株のみがmaltoseに対する資化能を有するということが明らかになった (図1)。この結果は、ゲノム情報に基づく代謝経路解析からの予測に反する結果であり、 $MalY$ の生理的機能の解明およびD-アミノ酸生産との関連を明らかにするためには*in vivo*での解析が必要であると考えられた。そこで現在、 $malY$ 遺伝子破壊株および過剰発現株の作製を試みているところである。

2. 無機および有機セレン化合物曝露によるシロイヌナズナの生育と遺伝子発現量の変化

吉田宗弘^{*3}、細見亮太^{*4}

2.1. はじめに

セレンは高等動物、および一部の細菌類では、酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン (SeCys) 残基として存在しており、生存に必須の微量元素である。一方、植物では、7セレンを特異的に要求するタンパク質は発見されていない。植物はセレン化合物のもつ高い反応性を利用しておらず、蓄積されるセレンの化学形態は、解毒を目的に変換した反応性の低い化合物と考えられている。そのため植物では特殊な含セレンアミノ酸の生成が知られている⁴⁾。反応性が低いと考えられるセレン化合物の中には、高い抗腫瘍活性が報告され、セレン強化食品やサプリメント素材として利用する試みが行われている。このような特殊なアミノ酸の生成は、高セレン曝露の植物において特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。種々の高等植物のうち、セレン高蓄積植物として知られるレンゲソウ (*Astragalus bisulcatus*) やブロッコリー (*Brassica oleracea*) では、セレンはSe-メチルセレノシステイン (MeSeCys) として蓄積され、揮発性のジメチルセレナイドへと代謝され、生体外へ排出する機構を有している。

これまで植物に無機セレン化合物を曝露し、代謝変動や含セレン化合物の同定は行われているが、有機セレン化合物曝露による実験は行われていない。そのため本実験では、無機および有機セレン化合物をシロイヌナズナ

に曝露し、生長、セレン含量およびセレン代謝関連遺伝子発現量を評価した。

2.2. 実験方法

(1) 亜セレン酸曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナは野生株 (Columbia-0) を用いた。20 g/Lスクロース、4.6 g/Lムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、3 mg/Lチアミン塩酸塩、5 mg/Lニコチン酸、5 mg/Lピリドキシン塩酸塩、8 g/Lアガーを含む培地に、無機セレン化合物 (亜セレン酸ナトリウム・セレン酸ナトリウム) および有機セレン化合物 (L-セレノメチオニン (SeMet)・L-SeCys・MeSeCys) 濃度が1.0、2.5、5.0 ppmとなるように添加した。培地溶液をオートクレーブ滅菌後、滅菌種子を播種し、長日条件の光周期のもと、無菌的に25℃で栽培した。4週間培養後、1粒の種子から得られた葉と根を分別して採取し、重量および長さを測定した。葉および根の一部は、RNAlater Tissue Storage Reagent (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京) に浸漬して-80℃で分析まで保管した。

(2) セレン含量の測定

葉および根を秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸2 mLを加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸1 mLを加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。灰化した試料に超純水を加えて容量を10 mLとし、0.45 μ mフィルターでろ過したものをセレン測定試料とした。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により行った。使用機種はICPMS-2030 (島津製作所、京都)、分析質量数は82、内部標準はロジウムとした。

(3) RNA抽出とDNAマイクロアレイ解析

培地中の各セレン濃度1 ppmのシロイヌナズナの葉からTRIzol[®] Reagent (サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社、神奈川) を用いた方法でTotal RNA抽出を行った。抽出したTotal RNAはTray Cell[™] を使用し、RNA濃度を測定した。調製したTotal RNAはGoScript[™] Reverse Transcription System (プロメガ株式会社、東京) を用いた逆転写反応により、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型としてThermalCycler Dice[®] Real Time System Single装置 (タカラバイオ株式会社、滋賀) とGoTaq[®] qPCR Master Mix (プロメガ株式会社) を用いたリアルタイムPCRにより転写産物量の定量を行った。セレン代謝に関連する遺伝子に対応するプライマーの配列はウェブツールのPrimer3plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて作成した。それぞれの遺伝子発現量は、ubiquitin extension protein 2の転写産物量に対する相対量として表した。

*3 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

*4 化学生命工学部助教 博士 (工学)

(4) 統計解析

一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用い、p値が0.05以下を有意差ありとした。

2. 3. 結果および考察

図2-AおよびBに各セレン化合物曝露4週間後のシロイヌナズナの葉(2-A)および根(2-B)重量を示した。セレン化合物無添加と比較し、各セレン化合物の曝露濃度依存的に葉および根重量の減少が観察された。

図2-CおよびDに、各セレン化合物曝露4週間後のシロイヌナズナの葉(2-C)および根(2-D)のセレン含量を示した。葉のセレン含量では、セレン酸で他の化合物と比較し、セレンの高い蓄積が確認された。また根のセレン含量では、SeMet 2.5 ppm曝露群で他の化合物よりも高い結果が得られた。これらの結果から、セレン化合物の化学形態によって、セレンの蓄積する部位が異なることが確認された。

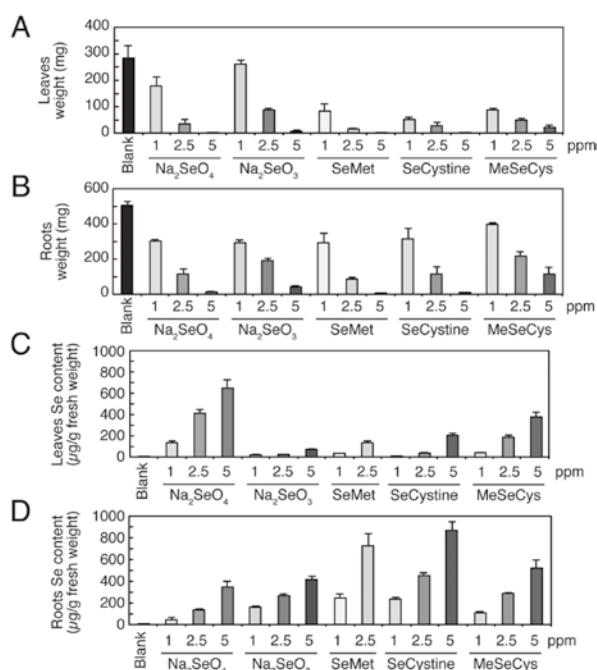


図2. 各セレン化合物曝露によるシロイヌナズナの葉および根の重量(A, B)およびセレン含有量(C, D)平均値±標準誤差

MeSeCys, メチルセレノ-L-システイン; SeCystine, L-セレノシスチン; SeMet, L-セレノメチオニン

各セレン化合物曝露1 ppmの葉のセレン代謝関連遺伝子のmRNA発現量を測定した。植物中の硫黄取り込みに関わるsulfate transporter 4;2、システイン・シスタチオニン・メチオニン代謝酵素であるhomocysteine S-methyltransferase(HMT)-1、HMT-2、cystathionine beta-lyase、cystathionine gamma-synthase、methionine synthase-3の発現量は試験群間で有意な差

は確認されなかった。一方、HMT-3 遺伝子発現量は、各セレン化合物添加群で無添加群と比較し、上昇傾向がみられた(表1)。

表1. 各セレン化合物曝露におけるHMT-3遺伝子発現量

	HMT-3
無添加	100 ± 11
セレン酸	201 ± 27
亜セレン酸	173 ± 12
L-セレノメチオニン	192 ± 36
L-セレノシスチン	207 ± 15
メチルセレノ-L-システイン	170 ± 46

平均±標準誤差(n = 4)

セレン無添加の遺伝子発現量を100としたときの遺伝子発現量を相対値で表している。

HMT-3, homocysteine S-methyltransferase-3

HMT familyは、レンゲソウ(*A. bisulcatus*)において発現しているセレノシステインメチルトランスフェラーゼ(SMT)とタンパク質一次配列の相同性が高いことが報告されている。Ab-SMTはSeCysをメチル化し、非タンパク性アミノ酸であるMeSeCysに変換する。この変換によりSeCysから誘導されるSeMetのタンパク質への取り込みを抑制し、セレン毒性に対する耐性獲得に関与している。シロイヌナズナのHMT familyに属するHMT-1およびHMT-2は、SMT活性を示さないことが報告されているが、HMT-3については未解明である。そのため、本実験で見られたHMT-3 遺伝子発現量の上昇がSeCysからMeSeCysへの変換に関与しているのか、高速液体クロマトグラフ-ICP-MSを利用したスペシエーション分析によって、シロイヌナズナに含まれる有機セレン化合物の化学構造を明らかにする必要があると考える。

また今後、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンシングによるセレン含有アミノ酸に関与する候補遺伝子の選抜と、塩基配列決定による変異の検出およびエピゲノム解析による後天的な遺伝子制御機構を明らかにしていきたい。

3. 神経突起伸長作用に関与するエピジェネティックな遺伝子発現制御

下家浩二^{*5}、木村博信^{*6}、丸岡弘規^{*7}

3. 1. はじめに

神経細胞は、特定の神経細胞群とシナプス結合を介した神経回路を形成して初めて機能的細胞となる。この過

*5 化学生命工学部教授 博士(理学)

*6 大阪大学蛋白質研究所助教 博士(理学)

*7 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士(工学)

程では、様々な遺伝子群の発現が誘導され、その結果、神経回路を形成するために必須である神経突起が伸長する。この神経突起伸長過程で、エピジェネティックな分子機構で特定の遺伝子群の発現上昇がいかに関与しているかを解析することが本プロジェクトで求められている。その解明のために、ヒストン修飾による遺伝子発現制御機構の解析とDNAのメチル化と脱メチル化による遺伝子発現制御の解析を分子・細胞生物学的なレベルで解析した。

3.2. ヒストン修飾を伴う神経突起伸長作用の分子機構

本研究では、モデルニューロン細胞であるPC12細胞を使用した突起伸長作用の初期段階の分子機構の詳細について解析を行った。これまでにHDAC阻害剤であるTSAや細胞内cAMPの濃度を上昇させるforskolin (FSK)が添加24時間以内に突起伸長作用を有することや、この突起伸長時にImmediate Early Genesの一つである*nur77*が関与していることを明らかにしている⁵⁾。今回、FSKが有するであろうエピジェネティックな遺伝子発現機構について集中的に解析を行った。その理由は、そもそもHDAC阻害剤では、エピジェネティックな遺伝子発現が惹起されることは当然であるが、クロマチン構造変化を引き起こす活性を持たないFSKがエピジェネティックな遺伝子発現機構を介して神経突起を伸長させているならば非常に興味深い知見となるからである。その結果、FSK添加後、*nur77*遺伝子発現が約1時間から4時間まで一過的に上昇することを再確認した。そして、ヒストンH3テイル内に存在する14番目のリシン残基のアセチル化(K14AcH3)の上昇が同様のタイムコースで見られることを見出した。この時、*nur77*遺伝子上流配列のプロモーター配列の一部をプライマーとしたChIP assayを実施したところ、確かにK14AcH3はプロモーター領域に結合していることが明らかになった。次に、このプロモーター配列上には、リン酸化CREBが結合し得るCRE配列を4つ有しているため、promoter assayを行い、CRE配列の重要性について検討した。その結果、5'側からCRE配列部分を欠失した変異体を4つ作製し、実験を行ったところ欠失が多いほどpromoter activityが減少することが分かった。従って、*nur77*遺伝子のエピジェネティックな発現上昇には、リン酸化CREBも関与していることが示唆された。ただし、4つのCRE配列におけるリン酸化CREBがどの様に作用しているかについては今後の課題である。さらに、神経突起伸長に関わるとされる遺伝子群から、FSKによる突起伸長作用に関わる遺伝子群の探索を行ったところ*neuroD*遺伝子の発現は変化が無く、*synapsin1*と β IIIチューブリン遺伝子の発現上昇を見出した。 β IIIチューブリン遺伝子は、骨格

タンパク質であることから、得られた結果については妥当であると判断される。*synapsin1*遺伝子については、さらに実験を進めた。*nur77*遺伝子の転写産物に対するsiRNAを細胞内に導入し、*synapsin1*遺伝子の発現が減少するのかを解析した。その結果、コントロール用siRNAでは、*synapsin1*遺伝子の発現は上昇したが、*nur77*遺伝子の転写産物に対するsiRNAでは、ほぼ完全に*synapsin1*遺伝子の発現を抑制していた。これらの結果から、FSKによる神経突起の伸長には、PKAシグナルパスウェイが何らかの分子機構でクロマチン構造変化を引き起こし、リン酸化CREBを*nur77*遺伝子のプロモーター領域にリクルートし、遺伝子発現を上昇させ、その翻訳産物が、*synapsin1*遺伝子の発現を上昇させることが重要であると強く示唆された。

3.3. Bisphenol Aによる神経突起伸展とDNAの脱メチル化との関連性

本研究では、環境ホルモンの一種であるbisphenol A (BPA)が神経突起を伸長させる作用を有していることを見出したことを起点とし、FSKとの遺伝子発現制御機構の違いについて検討を行っている。そもそも、エピジェネティックな遺伝子発現では、DNA側の修飾(メチル化)と脱メチル化の関与を解析せねばならない。幸いに、DNAのメチル化阻害剤decitabin (DCN)が存在することから、その薬剤添加後の神経突起の伸長作用を観察することでDNAのメチル化と脱メチル化による遺伝子発現制御の有無を確認できる。適正濃度のDCNを添加した結果、FSK添加後の神経突起伸長作用に対し、何の変化も引き起こさなかった。そこで、 β -GT assayを用いて、本当に脱メチル化が引き起こされているかを確認したところ、確かにメチル化は減少していた。したがって、FSK単独添加時の神経突起伸長作用にはDNAの脱メチル化は重要ではないことが明らかになった。

3.4. まとめ

我々の研究では、*nur77*遺伝子群の発現上昇におけるエピジェネティックな作用に着目し、ヒストンとDNAの修飾を観察することにより、神経突起伸長に関与する遺伝子発現制御機構を明らかにした。また、*nur77*遺伝子の下流で働く遺伝子群についても明らかにした。ヒストンH3のトリメチル化と遺伝子発現制御機構についても解析を終了しており、ヒストンH3のアセチル化(K14AcH3)がどの遺伝子発現に関与しているのかや、最近話題になっているnon-coding RNAの作用を見出していることから、新たな知見をさらに見出す予定である。

4. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信*⁸

4.1. はじめに

科学技術の進歩や新興国への技術移転によって地球規模の環境汚染の広がり、特にCO₂排出量の増加に伴う地球温暖化や自然分解速度の遅い合成有機化合物による環境破壊が世界的に懸念されている。日本国においてもリサイクル技術の革新が進んでいるものの、その多くはサーマルリサイクル処理で、プロダクトリサイクルやマテリアリサイクルなどのCO₂排出抑制が期待できる技術は少ない。我々の研究室では、合成化学物を含む有機化合物の微生物処理法の開発に関する研究に着手し、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA (BPA) を分解する*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、有機系合成化合物分解特性を解析し、環境浄化および有機系廃棄物の生物学的処理の可能性について検討している。その研究成果として、本株がフェノール系化合物やビフェニル系化合物、有機塩素化合物など広範囲の合成化合物を分解することが可能であることが示された⁶⁾。また、BPA分解研究室レベルだけではなく、土壌環境中でも十分に合成化合物分解能を発揮することも示されている⁷⁾。さらに、AO1株由来のビスフェノールA分解遺伝子を他菌種に導入した遺伝子組換え体においてBPA分解能の向上が確認されたことから、AO1株遺伝子のみでも利用可能であることも示された⁸⁾。一方、AO1株において一部の遺伝子領域の欠落が培養中に低頻度ではあるものの生じることを経験し⁹⁾、ゲノム構造の不安定性がAO1株の利用を困難にしていた。そこで、本プロジェクトではAO1株のゲノム構造を明らかにすると共に、AO1株の安定化ならびに有機系合成化合物分解能の強化につながるゲノム構造の改変を試みる。これまでの研究では、AO1株のゲノム塩基配列をRoche社製の454プラットフォーム次世代シーケンサーとIllumina社製MiSeqを用いて解読し、ドラフトシーケンスと4種類のプラスミドの一つであるpBAR1の塩基配列を決定した。そこで、本年度は全塩基配列の決定と遺伝子領域の推定、BPAで誘導発現する遺伝子の特定を試みた。

4.2. AO1株の全塩基配列決定

これまでにAO1株の次世代シーケンサーMiseq (Illumina社) とCLC genomic workbench (Quiagen社) を用いた全ゲノム配列のドラフトシーケンスおよびpBAR1全塩基配列を明らかとしていたが、全ゲノム配

列は特定できていない。そこで、本年度はPacBioIIとHGAP3 ソフトウェア (Pacific Biosciences社) を用いて塩基配列決定を行った。このシステムはMiseqと異なり、read中の配列の正確性は約85%と低いものの1 readあたり平均約10 kb解読することができるため、バクテリア配列など重複配列が多いものの解読に適している。その結果、Miseqによる解析データと組み合わせて6個のコンティグに集約することができた。また、それらコンティグの両端の塩基配列を比べたところ、同配列が確認されたことから全てのコンティグが環状構造であることが確認され、これまでに研究室で得られていたパルスフィールドゲル電気泳動結果と総合するとAO1株は2本の環状染色体と4個の環状プラスミドからなるものと結論づけられる (表2)。

表2. 次世代シーケンサー解析によって判明したAO1株DNAの特徴

染色体／プラスミド	全長 (bp)	GC含有率 (%)
Chromosome 1	3,731,049	64.3
Chromosome 2	956,822	63.4
Plasmid 1	263,320	64.5
Plasmid 2	112,111	63.1
Plasmid 3 (pBAR1)	80,312	59.8
Plasmid 4	66,398	62.5

4.3. AO1株の遺伝子推定

今回得られた塩基配列情報を基にNMPDRデータベース (<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/WebHome>) を用いたRASTシステム (<http://rast.nmpdr.org>) でAO1株の遺伝子推定を行った (表3)。その結果、リボゾームRNAや転移RNAなどの機能性RNAをコードする遺伝子はChromosome 1とChromosome 2のみで存在し、それぞれ55遺伝子と12遺伝子が確認された。タンパク質をコードする遺伝子の約72%がChromosome 1に、約16%がChromosome 2に存在していた。使用したデータベースでは、それぞれの代謝系をsubsystemというよく似た代謝系の一つの集団としてグルーピングされ、一方、遺伝子機能が推定されてもどの代謝系に属するか推定できない遺伝子は全てOthersに振り分けられる。今回の解析ではsubsystemにグルーピングされない遺伝子が多数存在しているが、AO1株の特徴として芳香族化合物分解に関わる遺伝子がChromosome 1 (38遺伝子) およびChromosome 2 (19遺伝子) の多数存在していた。また、Plasmid 1には膜輸送に関わる遺伝子が、Plasmid 2には病原因子に関わる遺伝子が多数コードされ、それぞれのプラスミドの特徴を示すものと予想される。これまでの我々の研究でpBAR1にはBPA分解に関わる遺伝子が少なくとも4種

*8 化学生命工学部教授 博士 (工学)

表 3. RASTシステムによるAO1株遺伝子の機能予測とsubsystemに分類された遺伝子数^{*1}

Gene / subsystem	Chrom 1	Chrom 2	Plasmid 1	Plasmid 2	pBAR1	Plasmid 4
Non-coding RNA gene	55	12	0	0	0	0
Ribosomal RNA - large subunit	1	2	0	0	0	0
Ribosomal RNA - small subunit	1	2	0	0	0	0
Others	53	8	0	0	0	0
Protein coding gene ^{*2}	(3648)	(831)	(270)	(121)	(93)	(76)
Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments	220	13	0	0	0	1
Cell Wall and Capsule	89	0	0	0	0	0
Virulence, Disease and Defense	66	21	0	24	1	1
Potassium metabolism	15	0	1	0	0	0
Photosynthesis	0	0	0	0	0	0
Miscellaneous	36	20	1	0	1	0
Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids	7	0	2	3	1	0
Membrane Transport	93	3	30	2	9	2
Iron acquisition and metabolism	17	0	0	0	0	0
RNA Metabolism	141	0	1	0	1	0
Nucleosides and Nucleotides	69	0	1	0	0	0
Protein Metabolism	237	2	1	0	0	0
Cell Division and Cell Cycle	29	0	0	0	3	2
Motility and Chemotaxis	79	4	0	0	0	1
Regulation and Cell signaling	53	8	0	0	0	4
Secondary Metabolism	4	0	0	0	0	0
DNA Metabolism	117	4	1	0	1	2
Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids	151	46	2	0	2	3
Nitrogen Metabolism	20	1	0	0	0	0
Dormancy and Sporulation	1	0	1	0	0	0
Respiration	101	19	0	2	1	0
Stress Response	108	13	15	0	1	1
Metabolism of Aromatic Compounds	38	19	0	0	1	1
Amino Acids and Derivatives	337	17	5	0	1	0
Sulfur Metabolism	30	5	1	2	0	0
Phosphorus Metabolism	41	0	0	0	0	0
Carbohydrates	291	69	4	0	1	2
Others	2080	631	224	94	52	52

^{*1} AO1株の染色体およびプラスミドにコードされた遺伝子をRASTシステムで分類分けし、各subsystemに属する遺伝子数を示している。Chrom 1 と 2 はそれぞれChromosome 1 と 2 を示している。

^{*2} Protein coding geneとはタンパク質をコードした遺伝子を意味する。一部の遺伝子で 2 種類以上のsubsystemに分類分けされる場合がある。

類コードされていると予想されているが、現状ではそれらがsubsystemに登録されていないため、芳香族化合物分解に関わる遺伝子が少なく見積もられている。

4. 4. RNA-seq法を用いたAO1株の遺伝子発現解析

AO1 株によるBPA分解代謝経路はほぼ推定されているものの、その反応を触媒する酵素および構造遺伝子は未確認である。そこでBPA存在下で転写誘導される遺伝子の特定を次世代シーケンサーMiseqを用いたRNA-seq法で試みた。なお、AO1 株細胞はL培地またはBPA (115 mg/L) を含むL培地で 30 ℃ 振盪培養した対数増殖期後期のものを使用し、細胞破碎はIsogen II を用いた

ビーズ破碎法、mRNA 調製はMICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific社)、cDNA合成はSMARTer® Stranded RNA-Seq Kit (Clontech社)、シーケンス反応はMiSeq Reagent Kit v3 (Illumina社) を用いた。なお、両試料とも約 20M readsの主にタンパク質をコードしたmRNAから合成されたcDNA配列データを得ることができた。その結果を各遺伝子に分類し、特徴的な発現挙動を示した遺伝子を表 4 にまとめた。その結果、タンパク質合成に関わる遺伝子は常に高い発現を示していた。また、pBAR1 の遺伝子はBPA添加時に高い発現を示すことからBPA分解に強く関わっているものと予想される。一方、*bisdAB*は構成的

表 4. RNA-Seq解析によるAO1株遺伝子の発現挙動^{*1}

Location [position] ^{*2}	Gene function	TPM in L	TPM in L-BPA	Fold ^{*3}
High expression gene in L medium				
Chrom 1 [c(312999-313754)]	MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	1.68 x 10 ⁴	1.52 x 10 ⁴	0.90
Chrom 1 [c(3323472-3323705)]	Acyl carrier protein	1.15 x 10 ⁴	1.02 x 10 ⁴	0.92
Chrom 1 [c(356545-357057)]	outer membrane protein-like	9.76 x 10 ⁴	6.06 x 10 ³	0.62
Chrom 1 [1792147-1793793]	Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	9.49 x 10 ³	7.92 x 10 ³	1.02
Chrom 1 [1080697-1080900]	LSU ribosomal protein L29p (L35e)	9.32 x 10 ³	9.26 x 10 ³	0.99
Chrom 1 [1081344-1081712]	LSU ribosomal protein L14p (L23e)	8.25x 10 ³	1.13 x 10 ⁴	1.37
Chrom 1 [c(729653..729856)]	LSU ribosomal protein L35p	8.08 x 10 ³	5.82 x 10 ³	0.72
Chrom 1 [1791758-1792045]	Heat shock protein 60 family co-chaperone GroES	8.01 x 10 ³	7.45 x 10 ³	0.93
Chrom 1 [3335430-3335870]	SSU ribosomal protein S6p	7.83 x 10 ³	8.85 x 10 ³	1.13
Chrom 1 [314466-314741]	hypothetical protein_69	7.80 x 10 ³	1.01 x 10 ⁴	1.30
High induced expression gene by BPA				
pBAR1 [64949-66211]	Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase and related enzymes	1.50 x 10 ²	1.59 x 10 ⁴	106
pBAR1 [66247-66558]	hypothetical protein	2.92 x 10 ²	6.26 x 10 ³	21.4
pBAR1 [68872-69231]	Predicted thioesterase	1.17 x 10 ³	1.98 x 10 ⁴	17.0
pBAR1 [66619-68016]	Aldehyde dehydrogenase	5.77 x 10 ²	9.53 x 10 ³	16.5
pBAR1 [68056-68739]	hypothetical protein	1.74 x 10 ³	2.28 x 10 ⁷	13.1
pBAR1 [69495-70115]	hypothetical protein	5.76 x 10 ²	5.58 x 10 ³	9.69
pBAR1 [71401-71874]	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	8.14 x 10 ²	7.89 x 10 ³	9.69
pBAR1 [70160-71404]	Transcriptional regulator	7.38 x 10 ²	6.33 x 10 ³	8.57
pBAR1 [71871-73208]	Methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit	4.25 x 10 ²	3.59 x 10 ³	8.45
pBAR1 [c(60176..61357)]	P-hydroxybenzoate hydroxylase	6.29 x 10 ²	4.42 x 10 ³	7.02

^{*1} LまたはL-BPA(115 mg/L)培地で対数増殖後期まで培養したAO1株は細胞からmRNAを抽出して解析した。各遺伝子の発現量はTPM (transcripts per million)値で評価した。

^{*2} Chrom 1 は Chromosome 1 を示し、カッコ内の番号は各環状DNA中の位置を示している。cは相補鎖を示す。

^{*3} (TPM in L-BPA)/(TPM in L)を示した。

に発現し、特に***bisdB***は常に高い発現量を示していた。***bisdA***の発現量を効果的に高めることでAO1株のBPA分解活性は向上するものと予想される。

5. 抗菌剤耐性株に生じたゲノム変異の特定と耐性菌の形質解析

松村吉信、中田訓浩^{*9}

5.1. はじめに

病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底や効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて大きな脅威ではないものの、医療環境などでは、薬剤耐性菌の出現により、入院患者を中心とした集団感染の発生が報告され、場合によっては死亡事故にもつながり、大きな社会問題となっている。現時点ではその原因について解明されていないものの、継続的な必要以上の抗菌剤使用が微生物を耐性化させているものと予想され、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発、それらの適用方法の確立が求められている。そこで本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程とその耐性株の形質の解析から耐性菌制

御に向けたシステム構築を目的とした。

これまでの研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤（第四アンモニウム塩）である臭化トリメチルアンモニウム（CTAB）で処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している¹⁰⁾。この研究で、野生型大腸菌OW6株から取得されたCTAB耐性株OW66株のゲノム構造は、DNAマイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることを確認し、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていた。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に***soxR66***は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であるとして予想された。さらに、***soxR66***変異はSoxR機能を構成的とするため、結果として細胞のスーパーオキシド適応が向上していた¹¹⁾。また、新たに取得したCTAB耐性株でも複数のゲノム上の変異が確認され、抗菌剤処理による変異の蓄積に再現性が確認された。さらに、新規耐性株L-200株で、対数増殖期中の永生細胞（persister cell）の割合が高い変異株であると確認された。そこで、今年度の研究では、得られているその他の新規耐性菌の特性解析を試みた。

^{*9} 有限会社日革研究所研究員 博士（工学）

5.2. 新規耐性変異株の永生細胞割合の確認

昨年度の新規耐性変異株におけるゲノム配列比較によって、全ての変異株で複数の遺伝子変異が確認されていたが、耐性化の要因については推定できなかった。そこで、一部の耐性株で確認されていた永生細胞の出現割合をその他の変異株でも測定した（表5）。その結果、測定したCTAB変異株全てにおいて永生細胞出現割合が野生型大腸菌に比べて増加していた。この永生細胞出現割合の増加も、栄養細胞のCTAB耐性化とともに寄与しているものと予想される。特に、CTAB耐性の高いL-540株はより高い永生細胞出現割合を示していた。

表5. 大腸菌CTAB耐性変異株の永生細胞出現割合

大腸菌株	永生細胞出現割合 (%)
OW6株 (野生株)	$<3.6 \times 10^{-4}$
L-50株 (CTAB耐性株)	4.4×10^{-2}
L-100株 (CTAB耐性株)	9.0
L-200株 (CTAB耐性株)	8.2×10^{-1}
L-300株 (CTAB耐性株)	7.8
L-410株 (CTAB耐性株)	6.8
L-540株 (CTAB耐性株)	17

大腸菌細胞はL培地、37℃で対数増殖期まで培養した。細胞を回収後、新鮮なL培地中で100 μM CTABで30分間25℃で処理し、生細胞数はコロニーカウント法で測定した。永生細胞出現割合はCTAB処理前の細胞数に対するCTAB生残細胞の割合で算出した。

5.3. CTAB処理細胞における活性酸素発生

これまでのCTAB耐性OW66株と野生型OW6株においてCTAB処理時にOW6株のみスーパーオキシドの発生が確認され、死滅とスーパーオキシド発生に強い相関が得られていた⁶⁾。そこで、新規耐性変異株におけるCTAB処理時のスーパーオキシド発生をその特異的応答蛍光試薬BES-So-AMを用いて検証した。その結果、新規耐性株ではOW66株と異なり一部の細胞でスーパーオキシドの発生が確認された。これは新規耐性株の耐性化が栄養細胞の耐性化ではなく、永生細胞形成率の増加によるものであることと一致している。今後、永生細胞と栄養細胞との間でのスーパーオキシド発生の違いを検証する必要がある。

6. シロイヌナズナ由来selenocysteine Se-methyltransferaseホモログの機能解析

山中一也*¹⁰、老川典夫

6.1. はじめに

セレン (Se) は幅広い生物において必須の微量元素である一方で、高濃度では致死的影响を引き起こす。種々

の高等植物の内、Se高蓄積植物として知られるレンゲソウ (*Astragalus bisulcatus*) やブロッコリー (*Brassica oleracea*) では、SeをSe-methyselenocysteine (Se-MeSeCys) として蓄積し、更にSe-MeSeCysは揮発性のdimethyl diselenide (DMDSe) へと代謝された後、生体外へ排出される。このSe代謝における鍵酵素selenocysteine methyltransferase (SMT)は、selenocysteine (SeCys) のSe-メチル化により非タンパク性アミノ酸であるSe-MeSeCysへの変換を特異的に触媒する酵素であり、SeCysから誘導され得るselenomethionine (SeMet) のタンパク質への取り込みを抑制することで、高濃度Se環境下での植物体への毒性緩和に寄与していると考えられる。実際、レンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) を高発現させることにより、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 及びカラシ菜 (*Brassica juncea*)、更に大腸菌においてもSe耐性及び蓄積が増強することが報告されている¹²⁾。また、セレン酸曝露下のブロッコリーではSMT遺伝子の発現及びSe-MeSeCys生産量が顕著に上昇することも確認されていることから¹³⁾、他の多くの生物においてもSMTがSe代謝の中心的役割を果たしていると言える。

一方、モデル植物である*A. thaliana* (シロイヌナズナ) においては、SMTに関する研究報告はない。しかし、同植物ゲノム上にはレンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) と高い一次構造上の相同性を示す3つのHomocysteine S-methyltransferase (At-HMT-1, -2, -3) 遺伝子の存在が確認されていることから、*A. thaliana*ではHMTホモログがSe代謝に関与する可能性が考えられる。これまでにAt-HMT-1及び-2は、共にSMT活性を示さずSe代謝には関与しないと報告されているが¹⁴⁾、At-HMT3については、直接的なSMT活性の評価は行われていないため、本酵素のSe代謝への関与は未だ不明なままである。そこで、Ab-SMTと高い相同性を示すAt-HMT-3の酵素科学的性質を明らかにし、シロイヌナズナにおけるSe代謝への関与を検証することを目的として研究を進めてきた。

6.2. 方法及び結果

*A. thaliana*のcDNAクローン (RAFL19-23-M07) から、*At-HMT3* 遺伝子をPCR増幅し、定法に従い大腸菌を宿主としてAt-HMT3 タンパクの発現を試みたが、発現タンパク質のほとんどは不溶性顆粒を形成し、機能的可溶性酵素として得ることは出来なかった。そこで、可溶性発現の向上に高い効果を有することが知られているマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として目的タンパク質発現を実現する新規MBP融合タンパク質発現ベクターを構築し、これを用いることで

*10 化学生命工学部准教授 博士 (生物資源学)

著量のAt-HMT-3をMBP融合型可溶性タンパク質として得ることに成功した。

得られたMBP融合型At-HMT-3は、S-MeMetをメチル基供与体、Homocysteineをメチル基受容体基質とした*in vitro*酵素反応において、顕著なHMT活性を示したことから、得られたMBP融合型At-HMT-3の機能性についても確認した。現在、SeCysをメチル基受容体基質とした反応を行い、本酵素のSMT活性を評価している。

6. 3. 今後の展望

我々は、本研究の過程で開発した新規MBP融合タンパク質発現ベクターを用いることで、At-HMT3を機能的な可溶性酵素として得ることに成功し、これにより従来は不可能であったAt-HMT-3の*in vitro*での詳細な機能解析の実施に道を切り開いた。今後、より詳細なAt-HMT-3の酵素科学的性質を明らかにすることで、*A. thaliana*におけるSe代謝の全貌を明らかにしたいと考えている。

謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（2013年度～2017年度）」によって実施されたものである。なお、本研究は、以下の学生及び院生に実験の協力を得た。2章：廣瀬侑太郎、大塚政志、4章：高未麗、5章：紅谷貴之、6章：寺田俊輝。

参考文献

- 1) K. Okada, Y. Gogami, T. Oikawa, Amino acids, 44, 489-498 (2013).
- 2) 加藤志郎, 老川典夫, 平成27(2015)年度関西大学先端科学技術推進機構研究成果報告書, 55-56 (2015).
- 3) L. Kang, A. C. Shaw, D. Xu, W. Xia, J. Zhang, J. Deng, H. D. Wöldike, Y. Liu, J. Su, J. Bacteriol., 193, 1098-1106 (2011).
- 4) 吉田宗弘, 食品中のセレンの分布と栄養有効性, Biomed. Res. Trace Elements, 19, 290-296 (2008).
- 5) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic control of upregulation of GRP78 expression for promotion of neurite elongation and attenuation of cell death via PKA-mediated signaling in PC12 cells, Clin. Pharmacol. Biopharma., 4, 150-154 (2015).
- 6) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 7) Y. Matsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, Biocontrol Sci., 20, 35-42 (2015).
- 8) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, J. M. García-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh, RSC Adv., 5, 29563-29572 (2015).
- 9) M. Sasaki, T. Tsuchido, Y. Matsumura, J. Appl. Microbiol., 105, 1158-1169 (2008).
- 10) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 1895-1905 (2010).
- 11) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, J. Appl. Microbiol., 110, 568-579 (2011).
- 12) D. L. LeDuc *et al.*, Overexpression of selenocysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation, Plant Physiol., 135, 377-383 (2004).
- 13) S. M. Lyi *et al.*, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli, Plant Physiol., 138, 409-420 (2005).
- 14) P. Ranocha *et al.*, The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity, Plant J., 25, 575-584 (2001).

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

2016年度 研究成果一覧表

論文

- (1) T. Washio, S. Kato, T. Oikawa, Molecular cloning and enzymological characterization of pyridoxal 5'-phosphate independent aspartate racemase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* DSM 5473, *Extremophiles*, 20, 711-721 (2016).
- (2) T. Fujii, A. Sato, Y. Okamoto, T. Yamauchi, S. Kato, M. Yoshida, T. Oikawa, Y. Hata, The crystal structure of maleylacetate reductase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 provides insights into the reaction mechanism of enzymes in its original family, *Proteins*, 84(8), 1029-1042 (2016).
- (3) 廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸またはセレノメチオニンの栄養有効性に及ぼす投与期間の影響, *微量栄養素研究*, 33, 9-12 (2016).
- (4) 廣瀬侑太郎, 大塚政志, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の生育抑制と遺伝子発現量の変化, *微量栄養素研究*, 33, 112-117 (2016).
- (5) K. Shimoke, Epigenetic Regulation: Neurite Outgrowth by Hormonal or Chemical Mechanisms in PC12 Cells, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 6(5), 1000e123 (2016).

図書

- (1) Y. Mutaguchi, J. Kobayashi, T. Oikawa, T. Ohshima, Chapter 22 D-Amino Acids in Fermentative Foods, *D-Amino Acids Physiology, Metabolism, and Application*, 341-357, Springer, 総ページ数357 (2016).

国内学会

- (1) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, シロイヌナズナにおける微量D-アミノ酸の吸収および生育阻害解析, 第33回日本微量栄養素学会学術集会, O-2, 京都 (2016).
- (2) 加藤志郎, 老川典夫, *Lactobacillus sakei*由来新規二機能アミノ酸ラセマーゼ, MalYの機能解析, 第12回D-アミノ酸学会学術講演会, 10, 高知 (2016).
- (3) 鷲尾翼, 老川典夫, *Thermococcus litoralis* DSM 5473由来アスパラギン酸ラセマーゼとL-アスパラギン酸オキシダーゼを用いたD-およびL-Aspの新規定量法の開発, 第12回D-アミノ酸学会学術講演会, P11, 高知 (2016).
- (4) 由上文子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 生およびローストした牛肉に含まれる鉄とセレンの栄養有効性, 日本ビタミン学会第68回大会, I-II-1, 富山 (2016).
- (5) 廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸とセレノメチオニンの有効性に及ぼす投与期間の影響, O-7, 第33回日本微量栄養素学会, 京都 (2016).
- (6) 中澤知奈美, 柳井美穂, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, ラットの鉄栄養状態に及ぼす硫酸鉄およびヘモグロビン投与の影響, P-4, 第33回日本微量栄養素学会, 京都 (2016).
- (7) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, 神経突起伸長作用を有するNr4a1遺伝子の発現制御機構, 第59回日本神経化学会, P-O33, 福岡 (2016).
- (8) 井戸大記, 山本宇晃, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, バルプロ酸による神経突起伸長作用におけるNr4aファミリー遺伝子の役割, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, P2-60, 大阪 (2016).
- (9) 山添亮輔, 玄古宗一郎, 細見亮太, 福永健治, 丸岡弘規, 下家浩二, ヒストンH3内特定リシン残基のアセチル化を介したnur77遺伝子の発現上昇, 第10回日本エピジェネティクス研究会, P2-62, 大阪 (2016).
- (10) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Nr4aファミリー遺伝子プロモーター領域に対して特定ヒストン修飾部位が結合を介して示す転写活性制御機構, 第10回日本エピジェネティクス研究会, P2-104, 大阪 (2016).

- (11) 紅谷貴之, 永村光一, 金本真治, 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現株の抗菌剤耐性能評価とその変異領域の解析, 日本農芸化学会2017年度大会, 2C17p10, 京都 (2017).
- (12) 高未麗, 村澤友紀恵, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析と環境汚染物質分解能の安定化, 日本農芸化学会2017年度大会, 4J27a02, 京都 (2017).
- (13) 高未麗, 村澤友紀恵, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株の環境汚染物質分解能の向上と安定化, 第68回日本生物工学会大会, 2P-1p106, 富山 (2016).
- (14) 紅谷貴之, 永村光一, 金本真治, 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現株の抗菌剤耐性能評価とその変異領域の解析, 日本防菌防黴学会第43回年次大会, 27Pa-D19, 東京 (2016).
- (15) 阿部修平, 吉村友宏, 老川典夫, 山中一也, epsilon-Poly-L-lysine合成酵素(Pls)におけるタンデム縮合ドメインの機能解析, 日本農芸化学会2017年度大会, 2C11a01, 京都 (2017).
- (16) 安田真央, 老川典夫, 山中一也, 微生物二次代謝産物生合成研究をアシストする高効率TAR直接クローニング法の開発, 日本農芸化学会2017年度大会, 2C11a02, 京都 (2017).

その他

- (1) 竹下義隆, 新山義友, 老川典夫, 食酢の製造方法, 特許第6060456号 (2016.12.22).
- (2) 加藤志郎, 老川典夫, シロイヌナズナのD-アミノ酸代謝関連酵素, Trace Nutrients Research, 33, 118-121 (2016).
- (3) 松村吉信, バイオフィルムの生成メカニズムと洗浄・殺菌技術, クリーンテクノロジー, 26(11), 57-60 (2016).

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる
ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

研究代表者：老川 典夫
研究分担者：細見 亮太・下家 浩二・松村 吉信・吉田 宗弘
山中 一也
学外研究分担者：丸岡 弘規

1. The role of the putative amino acid racemase
MalY and the citrate metabolism for D-amino acid
production in *Lactobacillus sakei*

Johannes Pfeifenschneider^{*1}, Kazuya Yamanaka^{*2}
Tadao Oikawa^{*3}

D-amino acids are of high industrial interest and find application especially in the pharmaceutical field as part of antimicrobial compounds¹⁾.

D-amino acids are of high industrial interest and find application especially in the pharmaceutical field as part of antimicrobial compounds¹⁾. In this regard, the genomes of two *Lactobacillus sakei* strains that differ in their production of D-amino acids have been sequenced by our group. *L. sakei* LK-145 is a high-producing strain for D-alanine, D-aspartate, and D-glutamate whereas LT-13 only produces low amounts. The comparison of their genomes revealed two major differences: i) the gene *malY* that encodes for a putative amino acid racemase and is present in LT-13 but absent in LK-145, ii) *citD* (encoding γ -subunit of citrate lyase) is truncated in LT-13. Therefore, the effect of MalY and the citrate metabolism on the formation of D-amino acids was investigated. To study the function of MalY *in vivo* the plasmid-free *Leuconostoc mesenteroides* LT-38 was chosen as a host. In the first step an *Escherichia coli*-*L. mesenteroides* shuttle vector has been constructed to allow for the heterologous expression of *malY*. The constructed shuttle vector consists of the origin of replication and plasmid-stabilizing elements of a natural plasmid of *L. mesenteroides* LK-151, an origin

of replication for *E. coli*, an erythromycin-resistance cassette for selection in lactic acid bacteria, and a constitutive *ldhI* promoter from the genome of *L. sakei* LK-145 for heterologous gene expression³⁾. Different approaches including electroporation and conjugation using *E. coli* S17-1 Δmu and *E. coli* ET 12567 have been carried out to transform *L. mesenteroides* as well as other lactic acid bacteria. It was found that transformation of the tested lactic acid bacteria with the constructed shuttle vector is very challenging and yielded almost no correct clones (Table 1). As an alternative to establish a method for the transformation of lactic acid bacteria in our group, the plasmid pT1NX⁴⁾ from a *Lactococcus lactis* strain is going to be tested.

Table 1. Compatibility of different lactic acid bacteria with vectors pKshuttle and pSETshuttle

Strain	pKshuttle	pSETshuttle
<i>L. casei</i> BL23	no	no
<i>L. sakei</i> LK-145	no	yes
<i>L. sakei</i> LT-13	no	no
<i>L. mesenteroides</i> LT-38	yes	(yes)
<i>P. pentosaceus</i>	no	no

Previous experiments performed by our group have shown that *L. sakei* LK-145 cells grown in MRS-medium supplemented with citrate are able to produce 3- to 4-fold higher levels of D-aspartate, D-alanine, and D-glutamate. The ability for citrate utilization as sole carbon source and as energy source in *L. sakei* LK-145 and LT-13 was tested to reveal the mechanism and effect on D-amino acid production. Both strains were grown in MRS-medium supplemented with and without 1% citrate as well as in DLM-minimal medium⁵⁾ with 1% glucose, 1% glucose + 2% citrate,

*1 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー Ph.D.

*2 化学生命工学部准教授 博士（生物資源学）

*3 化学生命工学部教授 博士（農学）

and 2% citrate as sole carbon source (Table 2). Samples for analysis of the amino acid levels in the supernatant by HPLC were taken after 24 h (and after 48 h for LT-13 grown in MRS and MRS + citrate). Apparently, the addition of 2% citrate led to a growth inhibition. Therefore, the growth and amino acid production will be tested with different concentrations of citrate. Additionally, based on the pH-measurement a potential role of the citrate metabolism as a secondary proton motive force-generating pathway is going to be investigated⁶⁾.

Table 2. Growth of *L. sakei* LK-145 and LT-13 in MRS-medium and DLM-medium with and without citrate (Measurement of OD₆₀₀ after 24 h except for LT-13 grown in DLM (48 h))

Strain	Preculture	Main culture	OD ₆₀₀	pH
<i>L. sakei</i> LK-145	MRS	MRS	7.9 ± 0.3	4
		MRS + citrate	8.23 ± 0.6	5
		DLM + glucose	3.02	n.d.
		DLM + glucose/citrate	0.25	n.d.
		DLM + citrate	0.22	n.d.
	MRS + citrate	MRS		
		MRS + citrate		
		DLM + glucose	3.70	n.d.
		DLM + glucose/citrate	0.16	n.d.
		DLM + citrate	0.32	n.d.
<i>L. sakei</i> LT-13	MRS	MRS	5.3 ± 0.3	4
		MRS + citrate	6.2 ± 0.2	4-5
		DLM + glucose	1.8	n.d.
		DLM + glucose/citrate	0.13	n.d.
		DLM + citrate	0.12	n.d.
	MRS + citrate	MRS	4.72 ± 0.16	4
		MRS + citrate	4.7 ± 0.45	4-5
		DLM + glucose	2.07	n.d.
		DLM + glucose/citrate	0.29	n.d.
		DLM + citrate	0.22	n.d.

n.d. : not determined

2. セレン化合物曝露によるシロイヌナズナの遺伝子発現量の変化

吉田宗弘*4、細見亮太*5

2.1. はじめに

セレン(Se)は高等動物、および一部の細菌類では、酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン(SeCys)残基として存在しており、生存に必須の微量元素である。緑藻*Chlamydomonas reinhardtii*、円石藻*Emiliania huxleyi*では、Seを要求するタンパク質の存在が示されているが、高等植物ではSeが必須であるという明確な報告はなされていない。植物はSe化合物の持つ高い反応性を利用しておらず、蓄積されるSe化合物の化学形態は、解毒を目的に変換した反応性の低い化合物と考えられている。そのため、植物では特殊な含Seアミノ酸の生成が知られている。このような特殊なアミノ酸の生成は、高Se曝露の植物において特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。これまでにシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は、Se耐性が低いことが知られており、レンゲソウ(*Astragalus sinicus*)由来のセレノシステインメチルトランスフェラーゼ(SMT)遺伝子を過剰発現させることで、Se耐性が向上することが報告されている⁷⁾。また、シロイヌナズナの硫酸イオントランスポーター(Sultr)1;2 ノックアウト変異体は、細胞内のSe濃度を減少することで、野生株よりも高いSe耐性をもつことが報告されている。このような遺伝子は、高濃度Se曝露での植物体へのSe毒性の緩和に寄与していると考えられている。私たちも、シロイヌナズナに亜セレン酸ナトリウム(Na₂SeO₄)を曝露することによって引き起こされる遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析し、主にresponse to heat, response to temperature stimulus, response to high light intensityなどストレス応答に関わる遺伝子セットが変動していることを報告している⁸⁾。しかし、シロイヌナズナに無機Se化合物を曝露し、代謝変動の解析や植物体内の含Se化合物の構造決定は行われているが、有機Se化合物曝露による報告は見られない。昨年度、シロイヌナズナに曝露するSe化合物の化学形態の違いによって、Seの蓄積する部位が異なることを確認した。そのため本研究では、昨年度の研究において、生長に大きな変化の見られたNa₂SeO₄およびL-セレノメチオニン(SeMet)曝露による代謝変動について、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって探索を行った。

*4 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

*5 化学生命工学部准教授 博士(工学)

2.2. 実験方法

(1) Se曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナは、野生株(Columbia-0)を用いた。20 g/Lスクロース、4.6 g/Lムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類¹⁰⁾、3 mg/Lチアミン塩酸塩、5 mg/Lニコチン酸、5 mg/Lピリドキシン塩酸塩、8 g/Lアガーを含む培地に、 Na_2SeO_4 およびSeMetをSe濃度が1.0 ppmとなるように添加した。培地溶液をオートクレーブ滅菌後、90 mm滅菌シャーレに移し、滅菌種子を1粒播種し、長日条件の光周期のもと、無菌的に25℃で栽培した。4週間培養後、1粒の種子から得られた葉と根を分別して採取し、重量とセレン濃度を測定した。葉の一部は、RNAlater Tissue Storage Reagent (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京)に浸漬して-80℃で分析まで保管した。

(2) RNA抽出とRNA-sequence解析

シロイヌナズナの葉からRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて総RNA抽出を行った。抽出した総RNAは、NanoDrop1000を使用してRNA濃度を測定し、バイオアナライザー(Agilent Technologies)による品質検査を行った。次に、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina)によりライブラリー調製を行い、次世代シーケンサー(NGS) HiSeq 2500 (Illumina) で、100 bpのペアエンドリード解析を行った。

(3) データマインニング

FastQCプログラムを用いてクオリティを評価し、trimmomaticを用いて不要なデータを削除した。クオリティチェック後のデータに対して、tophat2 プログラムを用いて、リードをゲノムにマッピングした。リファレンスゲノムはTAIR10を用いた。マッピング後のデータから、HTSeq v0.6.1p1 プログラムを用いて、発現の見られた遺伝子のリード数をカウントした。カウントされた値に対して、DESeqプログラムを用いて、発現変動遺伝子を算出した (P value<0.05)。発現変動遺伝子のアノテーション情報を利用してGene Ontology (GO) のBiological Processに基づいてDAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) のgene-annotation enrichment analysis⁹⁾とQuick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)¹⁰⁾によって解析した。また、Pathway解析はDAVIDにおいて、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を利用して解析した。

(4) 統計解析

データは、平均±標準誤差で示した。葉・根重量およびSe含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用い、P値が0.05以下を有意差ありとした。

2.3. 結果および考察

4週間培養したシロイヌナズナから採取した葉の重量は、 505 ± 23 mg(無添加群)、 293 ± 16 mg(Na_2SeO_4 群)、 294 ± 53 mg (SeMet群) であり、Se化合物曝露群において無添加群と比較して有意な低下が確認された。根の重量は、 284 ± 47 mg (無添加群)、 261 ± 15 mg (Na_2SeO_4 群)、 84 ± 25 mg (SeMet群) であり、SeMet曝露群において無添加群および Na_2SeO_4 群と比較して有意な低下がみられた。このため、SeMet曝露は顕著に根の生長を阻害していると考えられる。一方、葉に含まれるSe含量は、 1.7 ± 0.1 $\mu\text{g/g}$ (無添加群)、 5.9 ± 1.1 $\mu\text{g/g}$ (Na_2SeO_4 群)、 10.5 ± 2.0 $\mu\text{g/g}$ (SeMet群) であり、Se化合物曝露群において無添加群と比較して有意な増加が確認され、さらにSeMet群で Na_2SeO_4 群よりも有意に高い値を示した。根に含まれるSe含量は、 3 ± 1 $\mu\text{g/g}$ (無添加群)、 160 ± 12 $\mu\text{g/g}$ (Na_2SeO_4 群)、 245 ± 38 $\mu\text{g/g}$ (SeMet群) であり、SeMet群で他の2群と比較して有意に高い値を示した。

次に、網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、シロイヌナズナの葉よりRNAを抽出し、NGSを用いたRNA-Sequence解析に供した。Table 3に無添加群、 Na_2SeO_4 群とSeMet群間で見られた発現変動した遺伝子数を示した。無添加群と Na_2SeO_4 群、またはSeMet群間で比較した場合、ほぼ同等の発現変動遺伝子数を示した。

Table 3. 発現変動遺伝子数

	無添加 vs Na_2SeO_4 [†]	無添加 vs SeMet [‡]	Na_2SeO_4 vs SeMet [§]
上昇	496	464	315
低下	620	649	637

[†] 無添加群と比較して、[‡] 無添加群と比較して、[§] Na_2SeO_4 群と比較して

各群間の発現変動遺伝子を用いて、GO Biological Processのアノテーションに基づきGene-Annotation Enrichment Analysisを行った。無添加群と Na_2SeO_4 群、またはSeMet群間で比較した場合に共通して見られる変化として、response to wounding、response to jasmonic acidが見られた。一方、 Na_2SeO_4 群とSeMet群間で比較した場合には、response to chitin、response to water deprivation、response to wounding、plant-type cell wall looseningといったストレスに関わる遺伝子セットが顕著に濃縮されていた。

次に、発現変動した遺伝子をDAVIDのKEGGアノテーションを用い、発現変動遺伝子中に濃縮されたKEGGパスウェイを検討した。3群間ともに変化が見られたパスウェイとしてPlant hormone signal transduction、alpha-Linolenic acid metabolismが見られた。さらに、KEGG Pathway中のSelenocompound metabolismに含まれる遺

伝子を選抜し、各遺伝子の発現変動倍率をTable 4 に示した。

Table 4. セレン化合物代謝に関わる遺伝子

	無添加 vs Na ₂ SeO ₄ †	無添加 vs SeMet ‡	Na ₂ SeO ₄ vs SeMet §
methionine S-methyltransferase	1.22	1.32	1.07
methionyl-tRNA synthetase	0.78	0.89	1.13
probable methionine-tRNA ligase	1.00	0.95	0.93
methionine gamma-lyase	0.46*	0.30*	0.65*
methionine synthase 2	1.03	1.26	1.200
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0.68	0.78	1.14
methionine synthase 3	0.81	0.90	1.10
cystathionine beta-lyase	0.89	1.05	1.17
cystathionine gamma-synthase	1.22	1.28	1.04
cysteine desulfurase 2	1.14	1.21	1.05
NADPH-dependent thioredoxin reductase A	1.17	1.03	0.87
ATP sulfurylase 2	0.90	1.02	1.12
pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	未検出	未検出	未検出

* P<0.05, † 無添加群と比較して, ‡ 無添加群と比較して

§ Na₂SeO₄群と比較して

Selenocompound metabolismに含まれる遺伝子の中で発現変動が見られたのは、メチオニンをメチルメルカプタンと α ケト酪酸、アンモニアに不可逆的に分解する methionine gamma-lyaseのみであった。これまでにを行った同植物への亜セレン酸ナトリウム 10 ppm曝露では、無添加群と比較してセレノシステインをSeとアラニンに分解するcysteine desulfurase 2 (selenocysteine lyase) と、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン合成系の glutathione S-transferaseの発現上昇が見られたが、本研究ではSe化合物曝露濃度が低かったためか、変動は見られなかった。

3. 各種HDAC阻害剤による神経突起伸長作用の分子基盤

下家浩二^{*6}

3.1. はじめに

神経変性疾患では、脳内の神経細胞が死滅することから、生体の様々な部位において特有の症状が生じる。例えば、パーキンソン病では、黒質のドーパミン作動性神経細胞が特異的に死滅（小胞体ストレス誘導型アポトーシス様に神経細胞が死滅する）し、その結果、主として無動、固縮、振戦（ふるえ）の様な行動異常の症状が現れる。この症状に対し、ドーパミンを補充する薬剤（L-DOPA）による治療方法が確立している。ただし、長期間服用していると薬の効果が下がり、効果がある時とない時が出てくることが良く知られている（ウェアリング・オフ現象）。そこで、効果が出ない時期に別の作用点を有する薬剤も開発された。さらに、アルツハイマー病においても、コリン作動性神経細胞が小胞体ストレス

誘導型アポトーシス様に死滅するが、その死滅を抑制し、痴呆や認知異常などの症状を改善するためにコリンエステラーゼ阻害剤が処方されるようになった。この薬剤も長期に服用してもコリン作動性神経細胞の死滅は止まらず、症状は次第に進行する。従って、小胞体ストレス誘導型アポトーシス様に神経細胞が死滅する現象を抑制しながら薬効を期待することにはそもそも限界がある。そのために、ヒトiPS細胞による神経細胞の補充療法による完治を目指した応用研究が全世界的に進められている。しかし、無限増殖する細胞を脳内に注入して副作用の無い効果が見込めるのか、特定の神経細胞からなる神経回路を再構築できるのか、治療後の患者の性格や記憶が元にもどるのか、などの根本的な疑問点が残されたままであり、実用化にはかなり高いハードルを越える必要がある。

そこで、本研究では脳内に存在している神経幹細胞に対し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDAC阻害剤）が、神経突起伸長に必要な遺伝子をエピジェネティックな遺伝子発現機構を介していることや発現上昇した遺伝子を同定する。この研究により、神経突起伸長作用の能力を最大限に引き出し、神経変性疾患の薬剤の開発に寄与することが期待される基礎研究を本稿で紹介する。

3.2. バルプロ酸とMS-275による神経突起伸長作用

バルプロ酸（VPA）とMS-275は、クロマチン構造をユークロマチンに変化させるHDAC阻害剤として広く知られている（Fig. 1）。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）の活性が優勢になり、転写因子などのタンパク質が接近できる空間を提供している（Fig. 1）。そして、VPAは既に上市された薬剤であり、神経突起伸長作用について優秀な研究結果が得られれば、効能追加申請も可能であり、開発にかかるハードルはかなり低くなることからヒトiPS細胞での再生医療が安定的な治療法として確立されるまでの間に開発を進めることが重要であると考えている。

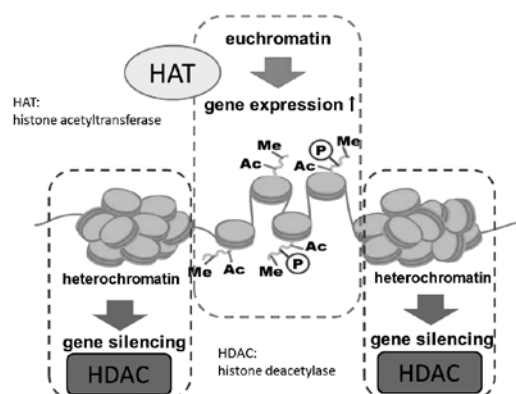


Fig. 1. ヒストン修飾によるクロマチン構造の変化

*6 化学生命工学部教授 博士（理学）

この研究手法は、所謂、トランスレーショナルリサーチに分類されるが、本研究では、基礎研究として新たな創薬ターゲット遺伝子の発掘なども研究の目標としている。これまでの研究成果として、両薬剤はヒストンH3内の14番目のリシン残基のアセチル化(H3K14ac)を介し、*nur77* 遺伝子の発現上昇によって神経突起伸長を誘導することを報告している¹²⁾。その結果に加え、ヒストンH3内の9番目のリシン残基のアセチル化(H3K9ac)を介し、*nur77* 遺伝子の発現上昇によって神経突起伸長を誘導することを見出した。更に、Nur77はNeuroD1やSynapsin1の発現を上昇させることも見出した。この結果から、NeuroD1やSynapsin1の発現上昇を誘導する薬剤が神経変性疾患に対して有用であることを示唆することができた。次に、これらの遺伝子の発現抑制に関与するHDACを探索するため、HDAC1、2、3に対するsiRNAを設計し、それぞれを細胞内に導入する実験を行った。その結果、HDAC3に対するsiRNAを導入した細胞では、神経突起の伸長作用が抑制されたことから、少なくともHDAC3を含む大型の転写因子複合体が存在し、神経突起伸長作用を制御していることが明らかになった。

4. フォルスコリンによる神経突起伸長作用

下家浩二、細見亮太、丸岡弘規^{*7}

4.1. はじめに

フォルスコリン (FSK) は、*Coleus forskohlii* より発見された植物由来の天然物である。現在ではサプリメントとしても販売されている。FSKは、動物細胞内に移行した場合、アデニレートサイクレース活性を上昇させる作用を有することから、細胞内cAMP量の上昇を引き起こす。その後の細胞内では、PKAによるリン酸化のシグナル伝達(最終的には、CREBのリン酸化による転写活性化)や遺伝子発現によるシグナル伝達によって様々な表現型が現れる。PC12細胞に限定すると、神経突起が大きく伸長する³⁾。この時の細胞内分子機構を解析した。これまでに、HDAC阻害剤の添加後と同様にヒストンH3内の14番目のリシン残基のアセチル化(H3K14ac)を介し、*nur77* 遺伝子の発現上昇が神経突起の伸長につながることを証明している。新たに解明したこととして、ヒストンH3内の9番目のリシン残基のアセチル化(H3K9ac)を介し、*nur77* 遺伝子の発現上昇によって神経突起伸長を誘導することを見出した。また、FSK添加後24時間でβIII-TubulinやSynapsin1の発現の上昇が観察されたが、*nur77* 遺伝子に対する特異的なsiRNAを用いて解析した結果、Synapsin1のみが神経突起伸長に必要であることが分かった (Fig. 2)。

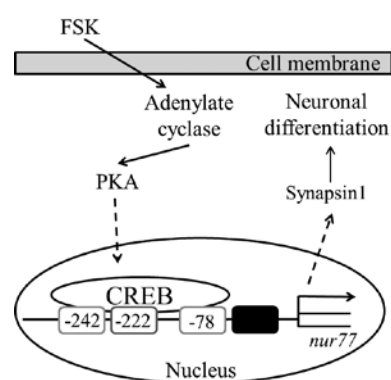


Fig. 2. FSKによる神経突起伸長のメカニズム

4.2. まとめ

HDAC阻害剤やFSKが神経突起伸長作用を有していることは明らかにしていたが、Nur77の下流分子の探索や新たなエピジェネティックな遺伝子発現の分子機構を解析したところ、表現型は同じ神経突起の伸長を示すが、NeuroD1やSynapsin1の下流分子における分子の使い分けがあることが分かった。また、エピジェネティックなヒストン修飾もH3K14acだけではなく、H3K9acも神経突起の伸長に寄与していることが分かった。更に、PKAによるシグナル伝達では、CREBのリン酸化が大きく寄与している可能性があり、解析の課題を残した。あらゆる課題を解明し、分子機構がどのように使い分けられ、神経突起の伸長を誘導するかを解析することが、今後の臨床応用に向けた研究の展開に重要である。更なる研究結果を蓄積せねばならない。

5. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信^{*8}

5.1. はじめに

科学技術の進歩や新興国への技術移転によってヒトの社会生活は安全で快適なものに大きく変わっている。一方で、世界規模の工業化による環境汚染の広がり、特にCO₂排出量の増加に伴う地球温暖化と自然分解速度の遅い合成有機化合物による環境破壊が世界的にも懸念されている。また、多量の合成・使用されるプラスチック製品やその原料は使用量の膨大さと高い環境安定性および生物毒性が隠れた問題として認識されている。我々の研究室では、合成化学物の微生物処理法の開発に着手し、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA (BPA) を分解する*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株の単離に成功している。さらに、本株の特性から環境浄化および有機系廃棄物の生物学的処理への可能性につ

*7 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士 (工学)

*8 化学生命工学部教授 博士 (工学)

いて検討した¹⁴⁾。さらに、研究室内だけではなく、土壌環境中でも十分に合成化合物分解能を発揮することも示した¹⁵⁾。また、AO1株由来のビスフェノールA分解遺伝子を他菌種に導入し、遺伝子組換え体のBPA分解能の向上が確認された¹⁶⁾。これら研究成果はAO1株の応用利用の可能性を広げるものであるが、一方で、AO1株で一部遺伝子領域が欠落する機能低下現象を経験し¹⁷⁾、ゲノム構造の不安定性がAO1株の利用を困難にしている。そこで、本プロジェクトでは昨年度までにAO1株の完全なゲノム構造を明らかにし、RNA-Seq法を利用したトランスクリプトーム解析からAO1株のBPA分解の一部の遺伝子発現が非常に高い状態であること、一方でBPA分解の下流に位置するβ-ケトアジピン酸経路に関わる遺伝子の一部の発現が極端に低いことを見出している。そこで、本年度はこれまでのAO1株における遺伝子アノテーションからのBPA代謝経路予想とAO1株

の培養液中から単離されBPA非分解変異株AO1L株の全塩基配列の決定を試みた。

5. 2. AO1株のBPA代謝経路の推測

次世代シーケンサーMiseq(Illumina社)とPacBioII(Pacific Biosciences社)の解読配列データをHGAP3ソフトウェア(Pacific Biosciences社)とCLC genomic workbench(QuiaGen社)を用いて、2個の染色体と4個もプラスミドからなる全ゲノムの完全な塩基配列を明らかにした。この配列をもとに、NMPDRデータベース(<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/WebHome>)を用いたRASTシステム(<http://rast.nmpdr.org>)で遺伝子推定を行い、代謝経路予測を試みた結果、BPA代謝経路はFig. 3であると予測された。これまでの生化学的研究からBPAはモノオキシゲナーゼによって水酸化された後、脱水反応あるいは水和反応を経て、二

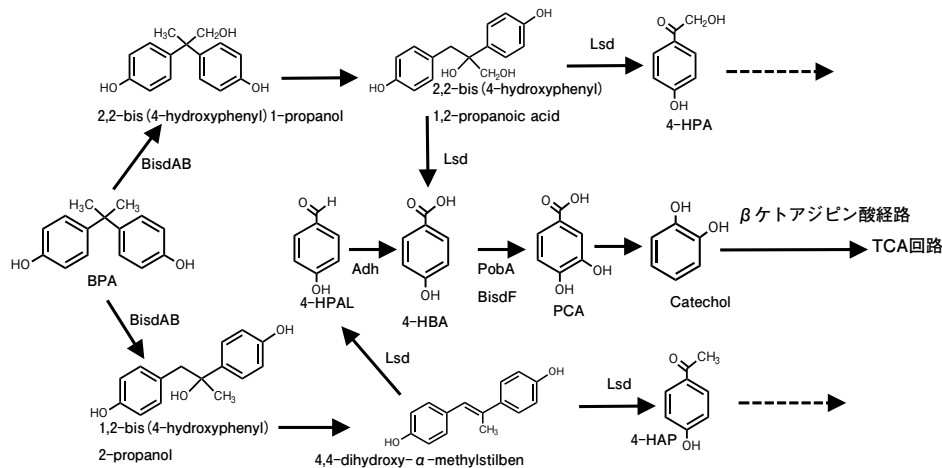


Fig. 3. AO1株による予想BPA代謝経路

Table 5. BPA非分解変異株AO1L株の欠失遺伝子一覧

Mutation region	Gene (function)
pBAR1	
region 1 (33651bp)	TonB-dependent receptor, Mobile element protein, Choline dehydrogenase, Integrase/recombinase clustered with segregation and condensation protein B, bisdF (P-hydroxybenzoate hydroxylase), Transcriptional regulator AraC family, lsd (Lignostilbene- α , beta-dioxygenase and related enzymes), adh (Aldehyde dehydrogenase), Predicted thioesterase, Transcriptional regulator, Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase, Methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit, Pyruvate:Oxaloacetate transcarboxylase domain protein, predicted sugar phosphatase of the HAD superfamily, RlgA, etc
region 2 (20bp)	Conjugative transfer protein TrbL
region 3 (9819bp)	bisdB (putative cytochrome P450 hydroxylase), bisdA (Ferredoxin, 2Fe-2S), Conjugative transfer protein TrbB, etc
Plasmid4	
region 1 (45493bp)	Phage DNA invertase, Type IV secretion system protein VirD4, nucleotidyltransferase, probable conjugal transfer protein traD, Conjugative transfer protein TraA, Uncharacterized protein/domain, possibly involved in tellurite resistance, Serine protease inhibitor, RNA polymerase sigma-70 factor ECF subfamily, DNA-invertase, Choline dehydrogenase, adh (Aldehyde dehydrogenase), Transcriptional regulator AraC family, Enoyl-CoA hydratase, salicylate esterase, Outer membrane receptor proteins, mostly Fetransport, Transcriptional regulator TetR family, 2-nitropropane dioxygenase NPD, Thiolase:Thiolase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, Long-chain-fatty-acid--CoA ligase, Dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase, Butyryl-CoA dehydrogenase, Acyl-CoA dehydrogenase, Dipeptide-binding ABC transporter, periplasmic substrate-binding component, etc

つのフェノール系化合物に開裂されることが確認されていた。今回の研究で、4-hydroxybenzoateがカテコールに変換後、 β ケトアジピン酸経路を介してTCA回路に進むことが予想された。一方、4-hydroxyphenacyl alcoholや4-hydroxyaceto-phenoneの代謝については不明であった。

5.3. BPA非分解変異株AO1L株の変異部位

AO1L株のゲノムDNAを定法にしたがって抽出し、MiSeq (Illumina社) でシーケンシングし、AO1株ゲノム配列を参照配列としたde novoシーケンス法を行った。その結果、pBAR1とplasmid 4の複数箇所に欠失領域が確認された (Table 5)。この欠失領域には多くのBPA代謝経路遺伝子が含まれており、AO1L株のBPA分解能の欠失に繋がっていると予想された。今後、AO1株において可動因子や不要遺伝子の欠失と環境汚染物質分解に関わる低発現遺伝子の発現量改善により、AO1株の機能改良を行う予定である。

6. 抗菌剤耐性株に生じたゲノム変異の特定と耐性菌の形質解析

松村吉信、中田訓浩*⁹

6.1. はじめに

病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底や効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて大きな脅威ではないものの、医療環境などでは薬剤耐性菌の出現により、入院患者を中心とした集団感染の発生が報告され、場合によっては死亡事故にもつながり、大きな社会問題となっている。この薬剤耐性菌の発生原因について解明されていないものの、継続的な必要以上の抗菌剤使用が微生物を耐性化させているものと予想され、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発が求められている。本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程とその耐性株の形質の解析から耐性菌制御に向けたシステム構築を目的とした。

これまでの研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤 (第四アンモニウム塩) 臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) で連続処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している¹⁸⁾。この過程で取得された大腸菌CTAB耐性株OW66株のゲノム構造を野生型OW6株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることを確認し、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていた。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に、*soxR66*は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐

性化に最も重要な変異であると予想された。さらに、*soxR66*変異はSoxR機能を構成的とするため、結果として細胞のスーパーオキシド適応性が向上していた¹⁹⁾。一方、同様の処理で新たに取得したCTAB耐性株でも複数のゲノム上の変異が確認され、抗菌剤処理による変異の蓄積に再現性が確認された。さらに、新規耐性株L-200株で、対数増殖期中の永生細胞 (persister cell) の割合が高い変異株であると確認された。そこで、今年度の研究では永生細胞の抗菌処理耐性能を調査した。

6.2. 新規耐性変異株の永生細胞の抗菌処理耐性能調査

複数の変異株から調製した永生細胞を50℃熱処理、0℃または10℃低温処理、カナマイシン処理した結果、カナマイシン処理に対して永生細胞は高い耐性を示したが、50℃熱処理 (Fig. 4) や低温処理では野生株より感受性化していた。CTAB耐性株の栄養細胞の耐熱性は永生細胞よりも高いものであった。これまでの結果を総合すると、CTAB耐性株は様々な抗菌剤には耐性を示すものの温度変動には感受性を示したことから、加熱処理などの温度変動処理と抗菌剤処理の併用処理、あるいはこれらの連続処理が薬剤耐性株の殺滅に有効であると予想された。

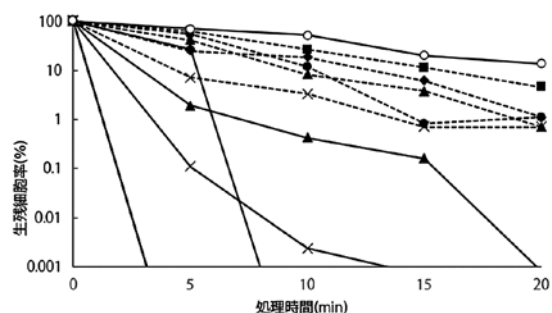


Fig. 4. CTAB耐性大腸菌変異株 (Lシリーズ株) 細胞の50℃加熱処理による死滅 (実線は永生細胞、点線は栄養細胞の熱処理後の生細胞数。○は野生型OW6株栄養細胞、■はL-100株、●はL-200株、◆はL-300株、×はL-420株、▲はL-540株を示す。)

7. シロイヌナズナ由来ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ3の発現と酵素科学的特性解明

山中一也、老川典夫

7.1. はじめに

セレン (Se) は、動物においてグルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素に要求される必須微量元素であり、生体内で代謝され最終的にセレン糖として尿中に排泄される。一方、植物においても微量のSeが間接的に植物の成長を促すことが知られており、有用元素と考えられている。

*⁹ 有限会社日革研究所研究員 博士 (工学)

selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	1	MVTGNTKAEYFYSMKELIKETGGVAILDGGATLELRHGADINDPLWSAKOITTSPIH	60
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	1	----MVLEKKSALLIEDLIKCGGAVVDGGBATGLEIHGAINDPLWSAVSLIKNPETIK	56
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	1	----MTGNSFNMSKDFLKQTGGVAVDGGATLEFRHGADINDPLWSAKOITTSPIH	55
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	1	-MGSFVKEETSSILMTDFLEKCGGAVVDGGATLELRHGADINDPLWSAKOITTSPIH	59
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	61	TVHLLYLEGAGAILSSASYCATIGCFEARGSIIEKSESLARSVEIACEARSTYYDKC--	118
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	57	RVHMEYLEGAGAILVVTSSYCATIGFPLSRGLSIESESLLEKSEVLAIVEARDRFEWK--	113
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	56	TVHLLYLEGAGAILSSASYCATIGCFEARGSRREESESLARSVEIATEARSTYYDKC--	113
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	60	RVHLLYLEGAGAILITTSYCATIGCFVAKGTSVGEADNLLARSVEITYEARSTFYNRCKT	119
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	119	--KDDDKKILKRPPILVAASVGSYGALADGSEYSGHYGLITLLEIKDFHRRRQVMA	176
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	114	---VSKVSGHSYNRA-LVAASVGSYGALADGSEYSGHYGVNLDKDFHRRRQVMA	169
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	114	GTSSMDDKILKRPPILVAASVGSYGALADGSEYSGHYGSITLLEIKDFHRRRQVMA	173
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	120	GSWDFAYAGKASRPDILVAASVGSYGALADGSEYSGHYGVSVSKGILKDFHRRRQVMA	179
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	177	ESGADLLAFETIPNKEACAFALLDQVARTPWFSPNSGSDGVNVVSGHSIFECIAIE	236
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	170	EACGDLIAFETIPNKEACACVLLDPEKVCIPFQICPTSDGEXAPSGSPFECLEPIN	229
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	174	ESGADLLAFETIPNKEACAFALLDQVARTPWFSPNSGSDGVNVVSGHSIFECISIAE	233
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	180	KSGADLLAFETIPNKEACAFALLDQVARTPWFSPNSGSDGVNVVSGHSIFECIAVAD	239
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	237	ACEKVVAVGINGCTPERFEGILEIAKVSRSEIVVYPSNGSERMDPERKRWENTGVGNE	296
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	230	KNNIYVVGINGCAPOFTEMLTKFALIKKRAIVVYPSNGSEVMDGKAKQWLPSCQFGDE	289
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	234	NCEKVVAVGINGCTPERFEGILEIEKVSRSEIVVYPSNGSEVMDADRWENTGVGNE	293
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	240	SKNVVVAVGINGCTARYHALIISLRMRERSEIVVYPSNGSEVMDLNRKWKIKGSESED	299
selenocysteine methyltransferase [Brassica oleracea]	297	FVSIVERNWDGVSLLGGCCRTTPTTIRAIHKRVVRRSLFSSSSSSSHH	346
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-1	290	FEMFATNRWDGAKLGGCCRTTPTTINAISRDARR-----	326
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-2	294	FVSIVERNWDGVSLLGGCCRTTPTTIRAIHKRVVNRSL-----	333
homocysteine S-methyltransferase AtHMT-3	300	FVSIVERNWDGASLLGGCCRTTPTTIRAIKRVISDEPSAASKPFQGQ--	347

Fig. 5. レンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) とイロイヌナズナHMTアイソザイムのアミノ酸配列アライメント

種々の高等植物の内、Se高蓄積植物として知られるレンゲソウ (*Astragalus bisulcatus*) やブロッコリー (*Brassica oleracea*) では、SeをSe-methylselenocysteine (Se-MeSeCys) として蓄積し、更にSe-MeSeCysは揮発性のdimethyl diselenide (DMDSe) へと代謝された後、生体外へ排出される。このSe代謝経路における鍵酵素selenocysteine methyltransferase (SMT) は、selenocysteine (SeCys) のSe-メチル化により非タンパク性アミノ酸であるSe-MeSeCysへの変換を特異的に触媒する酵素であり、SeCysから誘導され得るselenomethionine (SeMet) のタンパク質への取り込みを抑制することで、高濃度Se環境下での植物体への毒性緩和に寄与している。実際、レンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) を高発現させることにより、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 及びカラシ菜 (*Brassica juncea*)、更に大腸菌においてもSe耐性及び蓄積が増強することが報告されている²⁰⁾。また、セレン酸暴露下のブロッコリーでは、SMT遺伝子の発現及びSe-MeSeCys生産量が顕著に上昇することも確認されていることから²¹⁾、他の多くの生物においてもSMTがSe代謝の中心的役割を果たしていると言える。

一方、モデル植物である*A. thaliana* (シロイヌナズナ) においては、SMTに関する研究報告はない。しかし、同植物ゲノム上にはレンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) と高い一次構造上の相同性を示す3つのHomocysteine S-methyltransferase (*At*-HMT-1, -2, -3) 遺伝子の存在が確認されていることから (Fig. 5)、*A. thaliana* ではHMTがSe代謝に関与する可能性が考えられる。実際、本プロジェクトにおいて先行して実施された亜セレン酸暴露した同植物のmRNAマイクロアレイ解析の結果は、*At*-HMT-3の発現がSe暴露に応答する、すなわちSe代謝への関与を示すものであった。更に、植物体内での

Se-MeSeCysの蓄積も観察されている。これまでに、A. D. Hansonらの研究によって*At*-HMT-1及び-2が共にSMT活性を示さないことが示されているが²²⁾、*At*-HMTアイソザイムの内、唯一*At*-HMT-3は直接的なSMT活性評価は行われておらず、本酵素のSe代謝への関与は未だ不明なままである。

そこで本研究では、Ab-SMTと高い相同性を示し、その遺伝子発現がSe暴露に対して明確な応答を示す*At*-HMT-3の酵素科学的性質を明らかにし、シロイヌナズナにおけるSe代謝への関与を検証することを目的として、研究に着手した。

7. 2. 方法及び結果

(1) 難可溶性発現タンパク質の可溶性発現を実現するT7プロモーター駆動型MBP融合タンパク質発現系の開発

理化学研究所から入手した*A. thaliana*のcDNAクローン (RAFL19-23-M07) から、*At*-HMT3遺伝子をPCR増幅し、汎用大腸菌発現ベクターであるpET-21bにクローン化した。定法に従い*E. coli* Rosetta (DE3) を宿主として*At*-HMT3の発現を試みたが、そのほとんどは不溶性顆粒 (インクルージョンボディ) を形成し、機能的可溶性酵素として得ることは出来なかった。そこで*At*-HMT3の可溶性発現検討に先立って、可溶性発現の向上に高い効果を有することが知られているマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として目的タンパク質発現を実現するT7プロモーター駆動型の新規MBP融合タンパク質発現系の開発に着手した。NEB社製のMBPタグ融合発現ベクターpMAL-c5Xを鋳型として、Factor Xa recognition siteコード領域を含むmalE遺伝子をPCR増幅し、pET-21bマルチクローニングサイト上流へ挿入した。構築したpET21-MALbベクター

(Fig. 6)で形質転換した*E. coli* BL21(DE3)は、IPTGによる発現誘導で著量のMalEタンパク質を細胞内に生産蓄積したことから、本ベクターシステムの機能性が確認された。

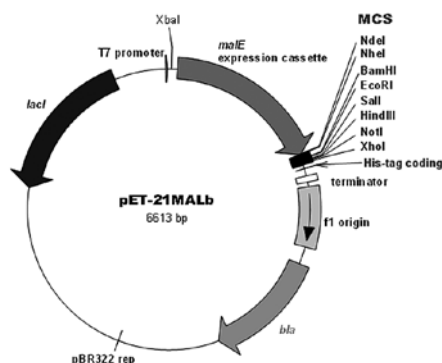


Fig. 6. 新規MBP融合タンパク質発現ベクター

(2) 新規MBP融合タンパク質発現ベクターを用いた*At*-HMT3の可溶性発現

PCR増幅した*At*-HMT3 遺伝子を定法に従い、pET21-MALbベクターへクローン化した。構築したpET21-MALb-*At*-HMT3を同様に*E. coli* Rosetta(DE3)へ導入し、低温下で発現誘導したところ、期待したとおりMBP-*At*-HMT3融合タンパク質の大部分はサイトゾル可溶性タンパクとして生産されていた。また、C-末端ヘキサヒスチジンタグを介したNi-アフィニティーシステムを用いた簡易精製により、MBP融合*At*-HMT3タンパク質をSDS-PAGE上で単一のバンドを示す精製タンパク質として得ることに成功した(Fig. 7)。更にこの精製酵素標品のFactor Xa切断により、MBPタグを含まない可溶性*At*-HMT3を調製することにも成功した。

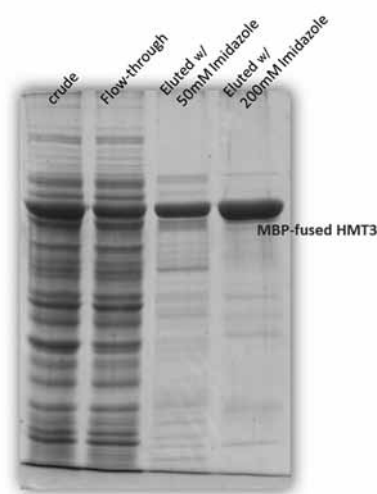


Fig. 7. MBP-*At*-HMT3の発現と精製

(3) MBP融合*At*-HMT3の*in vitro*機能解析

得られた精製MBP融合*At*-HMT3の機能性を確認するために、*in vitro*でメチル基供与体MeMetからL-homocysteine

へのメチル基転移反応を行い、反応の結果生じるL-Metの増加をHPLC法により評価した。その結果、期待した通り、反応時間依存的なL-Metの増加、すなわちHMT活性が検出され、MBP融合タンパク質として発現させた*At*-HMT3の機能性が確認された。このように当初は大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系では機能的可溶性酵素として調製することすら不可能であった*At*-HMT-3を、MBP融合タンパク質として発現させることで機能的可溶性酵素として調製することに成功した。

一方、SeCysを基質とした際にはL-Metの生成は認められなかったことから、予想に反して*At*-HMT3はSMT活性を示さないことが確認された。しかしながら、先述のように、本プロジェクトにおいて先行して実施された亜セレン酸暴露した同植物体からは、Se-MeSeCysの蓄積が観察されている。従って、シロイヌナズナ植物体においては、既知のSMT及びHMT経路非依存的なSe-MeSeCys生成機構が存在する可能性が示唆される。また、*At*-HMT3の酵素科学的諸性質は未解明であることから、本研究の過程で構築したMBP融合*At*-HMT3を用いた機能解析を通して、本酵素の生理的役割を明らかにすべく研究を進めているところである。

謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（2013年度～2017年度）」によって実施されたものである。なお、本研究は以下の学生及び院生に実験の協力を得た。（2章：大塚政志、7章：山口健祐）

参考文献

- 1) S. Martínez-Rodríguez, A. I. Martínez-Gómez, F. Rodríguez-Vico, J. M. Clemente-Jiménez, L. Heras-Vázquez, F. Javier, Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids : an overview, *Chemistry & biodiversity*, 7(6), 1531-1548 (2010).
- 2) Y. Mutaguchi, T. Ohmori, H. Akano, K. Doi, T. Ohshima, Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids, *SpringerPlus*, 2(1), 691 (2013).
- 3) Q. H. Yu, S. M. Dong, W. Y. Zhu, Q. Yang, Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus* in the gastro-intestinal tract of chicken, *FEMS microbiology letters*, 275(2), 207-213 (2007).
- 4) L. Steidler, J. Viaene, W. Fiers, E. Remaut, Functional display of a heterologous protein on the surface of *Lactococcus lactis* by means of the cell wall anchor of *Staphylococcus aureus* protein A, *Applied and environmental microbiology*, 64(1), 342-345 (1998).

- 5) T. Møretrø, B. F. Hagen, L. Axelsson, A new, completely defined medium for meat lactobacilli, *Journal of Applied Microbiology*, 85(4), 715-722 (1998).
- 6) C. Magni, D. De Mendoza, W. N. Konings, J. S. Lolkema, Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis* : resistance against lactate toxicity at low pH, *Journal of bacteriology*, 181(5), 1451-1457 (1999).
- 7) D. R. Ellis, T. G. Sors, D. G. Brunk, C. Albrecht, C. Orser, B. Lahner, K. V. Wood, H. H. Harris, I. J. Pickering, D. E. Salt, Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase, *BMC Plant Biol.*, 28, 1 (2004).
- 8) 廣瀬侑太郎, 大塚政志, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生育抑制と遺伝子発現量の変化, 微量栄養素研究, 33, 112-117 (2016).
- 9) W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, 4, 44-57 (2009).
- 10) D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O'Donovan, R. Apweiler, QuickGO : a web-based tool for Gene Ontology searching, *Bioinformatics*, 25, 3045-3046 (2009).
- 11) K. Shimoke, T. Tomioka, K. Okamoto, D. Fujiki, S. Uesato, H. Nakayama, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor for neurodegenerative diseases : A possible medicinal strategy by prevention of ER stress-mediated apoptosis and neurite elongation, *Clinic. Pharmacol. Biopharmaceutics*, S1, 004-006 (2013).
- 12) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the nur77 gene, *Neurosci. Res.*, 88, 39-48 (2014).
- 13) H. Maruoka, K. Shimoke, Mechanisms of neurotrophic activities via low-molecular-weight compounds : post-transcriptional regulation in PC12 cells and neurons, *Clinic. Pharmacol. Biopharmaceutics*, S1, 001-003 (2013).
- 14) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 15) Y. Matsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, *Biocontrol Sci.*, 20, 35-42 (2015).
- 16) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, J. M. Garcia-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh, *RSC Adv.*, 5, 29563-29572 (2015).
- 17) M. Sasaki, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1158-1169 (2008).
- 18) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 1895-1905 (2010) .
- 19) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *J. Appl. Microbiol.*, 110, 568-579 (2011).
- 20) D. L. LeDuc *et al.*, Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation, *Plant Physiol.*, 135, 377-383 (2004).
- 21) S. M. Lyi *et al.*, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli, *Plant Physiol.*, 138, 409-420 (2005).
- 22) P. Ranocha *et al.*, The S-methylmethionine cycle in angiosperms : ubiquity, antiquity and activity, *Plant J.*, 25, 575-584 (2001).

次世代ベンチトップ型シーケンサーによる
ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究

2017年度 研究成果一覧表

論文

- (1) S. Kato, T. Oikawa, A Novel Bifunctional Amino Acid Racemase with Multiple Substrate Specificity, MalY from *Lactobacillus sakei* LT-13: Genome-Based Identification and Enzymological Characterization, *Frontiers in Microbiology* (2018). [DOI: 10.3389/fmicb.2018.00403]
- (2) T. Washio, T. Oikawa, Thermostable and highly specific L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning, overexpression, and enzymological properties, *Extremophiles*, 22(1), 59-71 (2018).
- (3) 鷺尾翼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM5473の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ及び耐熱性L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いたD-およびL-アスパラギン酸の新規酵素定量法, *微量栄養素研究*, 34, 1-7 (2017).
- (4) S. Kato, T. Oikawa, Whole-Genome Sequence of *Lactobacillus sakei* LT-13 Isolated from Moto Starter of Sake, *Genome Announcements*, 5(31), e00651-17 (2017).
- (5) S. Kato, T. Oikawa, Genome Sequence of *Lactobacillus sakei* LK-145 Isolated from a Japanese Sake Cellar as a High Producer of D-Amino Acids, *Genome Announcements*, 5(33), e00656-17 (2017).
- (6) S. Kato, T. Oikawa, Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LK-151 Isolated from a Japanese Sake Cellar as a High Producer of D-Amino Acids, *Genome Announcements*, 55(30), e00661-17 (2017).
- (7) S. Kato, T. Oikawa, Whole-Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LT-38, a Non-Spore-Forming Gram-Positive Lactic Acid Bacterium, *Genome Announcements*, 5(31), e00670-17 (2017).
- (8) 大塚政志, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 老川典夫, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物の曝露がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, *微量栄養素研究*, 34, 8-13 (2017).
- (9) 大津浩平, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, セレン強化スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化活性の評価, *微量栄養素研究*, 34, 27-32 (2017).
- (10) K. Matsuura, R. Yamazoe, H. Maruoka, K. Shimoke, Epigenetic Regulation by Bisphenol A as a Neuronal Morphogen, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 7(4), 1000e128 (2017).

図書

- (1) 松村吉信, 一般的なバイオフィーム構造とその形成過程、バイオフィーム評価, 「バイオフィーム制御に向けた構造と形成過程—特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ—」, 監修: 松村吉信, シーエムシー出版, 総ページ数209, 1-12 (2017).
- (2) 松村吉信, 殺菌・滅菌・除菌, 「食と微生物の辞典」, 編集: 北本勝ひこ, 春田伸, 丸山潤一, 後藤慶一, 尾花望, 齋藤勝晴, 朝倉書店, 総ページ数512, 284-285 (2017).
- (3) 松村吉信, 微生物細胞死滅の反応速度論, 「食と微生物の辞典」, 編集: 北本勝ひこ, 春田伸, 丸山潤一, 後藤慶一, 尾花望, 齋藤勝晴, 朝倉書店, 総ページ数512, 288-289 (2017).

国際学会

- (1) R. Yamazoe, D. Ido, K. Yatsuo, S. Genko, K. Shimoke, Upregulated expression of *nur77* gene is important for neurite outgrowth induced by HDAC inhibitors, 9th Annual Congress on Drug Design & Drug formulation, Seoul, South Korea (2017).
- (2) R. Yamazoe, D. Ido, K. Yatsuo, S. Genko, K. Shimoke, Upregulated expression of *nur77* gene is important for neurite outgrowth induced by three HDAC inhibitors, 72nd Fujiwara seminar: International Symposium on Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community, Hokkaido, Japan (2017).

- (3) M. Koh, S. Koba, Y. Matsumura, Determination of the whole genome sequence of bisphenol A degradation bacterium *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Singapore (2017).

国内学会

- (1) 岩田音々, 山中一也, 老川典夫, 黒酢醪由来D-アミノ酸高生産乳酸菌*Pediococcus pentosaceus* KTCC12のD-セリンデヒドラターゼの機能解析, 日本農芸化学会関西支部例会(第502回講演会), 9, 京都 (2018).
- (2) 宮本将崇, 花岡真弓, 山中一也, 老川典夫, D-アミノ酸高生産乳酸菌*Lactobacillus casei* M10-8由来新奇二機能グルタミン酸ラセマーゼのC末端側ドメインの機能解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学大会), 1P-0308, 兵庫 (2017).
- (3) 鷲尾翼, 老川典夫, 食品中のD-アスパラギン酸定量への応用を目的としたD-アスパラギン酸の酵素定量法の開発, 第34回日本微量栄養素学会学術集会, O-1, 大阪 (2017).
- (4) 大塚政志, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 老川典夫, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物曝露がシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, O-4, 第34回日本微量栄養素学会, 大阪 (2017).
- (5) 加藤志郎, 老川典夫, クエン酸による乳酸菌のD-アミノ酸生産量の変化とゲノム情報の統合的解析, 第34回日本微量栄養素学会学術集会, O-8, 大阪 (2017).
- (6) 大津浩平, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, セレン強化スプラウトの抗酸化性の評価, 第34回日本微量栄養素学会, P-4, 大阪 (2017).
- (7) 寺田俊輝, 山中一也, 吉田宗弘, 老川典夫, シロイヌナズナ由来ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ3遺伝子の大腸菌での高発現系の構築と*in vitro*での機能解析, 第34回日本微量栄養素学会学術集会, P-14, 京都 (2017).
- (8) 大塚政志, 大津浩平, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物曝露がシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, 第3回セレン研究会, 東京 (2017).
- (9) 谷尾啓介, 舘上祐希, 山添亮輔, 下家浩二, 神経突起伸長作用を有するNr4aファミリー遺伝子の発現制御機構, 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学大会), 2P-1150, 兵庫 (2017).
- (10) 松浦玖実, 山添亮輔, 下家浩二, Bisphenol Aが神経細胞に与える形態変化とその作用機構の分子生物学的解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学大会), 2P-1151, 兵庫 (2017).
- (11) 井戸大記, 高橋亮太, 山添亮輔, 下家浩二, HDAC阻害剤による特定遺伝子群の発現上昇と神経突起伸長作用との関連, 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学大会), 2P-1152, 兵庫 (2017).
- (12) 松浦玖実, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Bisphenol A attenuates neuronal differentiation in cerebral cortical neurons, 第60回日本神経化学会大会, 2P-26, 宮城 (2017).
- (13) 井戸大記, 丸岡弘規, 山添亮輔, 谷尾啓介, 下家浩二, The effect of forskolin on the differentiation of PC12 cells via the histone H3 acetylation, 第11回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京 (2017).
- (14) 安岡甫, 平山彩, 紅谷貴之, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析, 日本農芸化学会, 2A02a08, 愛知 (2018).
- (15) 野田浩史, 井上貴晴, 富岡敏一, 脇田克也, 松村吉信, 洗濯衣類のバクテリア叢と洗濯工程におけるバクテリア叢変動の解析, 日本農芸化学会2018年度大会, 3A02a02, 愛知 (2018).
- (16) 村上将和, 高未麗, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株の環境汚染物質分解の効率化, 日本農芸化学会2018年度大会, 3A06a14, 愛知 (2018).
- (17) 松村吉信, 抗菌剤連続処理による薬剤耐性株の出現とその耐性株の特性に関する知見, 日本防菌防黴学会第44回年次大会, 1S2-Bp05, 大阪 (2017).
- (18) 紅谷貴之, 永村光一, 金本真治, 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現変異株の取得とそれらの抗菌剤耐性能評価, 日本防菌防黴学会第44回年次大会, 2P-Aa67, 大阪 (2017).

その他

- (1) 老川典夫, シロイヌナズナのセレンの取り込み, 輸送, 耐性機構に関する研究の現状と展望, 微量栄養素研究, 34, 114-118 (2017).