

第6期 第7回創発セミナー
第9回酵母コンソーシアム

「細胞が産生する有用物質～基礎と応用の視点から」

九州大学大学院農学研究院 教授
竹川 薫

大隅基礎科学創成財団は 2023 年 5 月 16 日午後 4 時から、「細胞が産生する有用物質～基礎と応用の視点から」というテーマのもと、東京大学駒場 I キャンパス 21KOMCEE を会場に於いて対面で創発セミナーを開催しました。

冒頭、本セミナーの世話人である千葉大学大学院理学研究院教授 松浦 彰氏から、酵母コンソーシアムの創発セミナーが対面で開催されるのは 3 年ぶりであること、また東大の駒場キャンパス会場での開催を強く思っていたことを話されました。

次に大隅良典理事長は、学部から大学院までの期間を駒場キャンパスで過ごし、研究室を初めて開設したのがこのキャンパスであり、まるで故郷に帰ってきたような気分になったこと、また 50 年程前の学生時代から比べると、木々の成長に大変驚かされることを話されました。本財団も設立してから 6 年が経過しようとし、厳しい財政状況の中、生物機能探求コンソーシアムが新設され徐々に活動の幅が広がり、更に微生物のプラスミドのデータベースの構築についての活動が新たにスタートしていることも話されました。

その後、3 人の講師によるご講演の後、50 人の登録参加者との間で、2 時間強の活発な討論が行われました。以下にその要旨を報告します。



講演1

思いがけず見出された脂肪酸の機能～分裂酵母の細胞間コミュニケーション～ ～分裂酵母の細胞間コミュニケーション～

財団フェロー、理化学研究所 副チームリーダー
八代田 陽子

最初に、理化学研究所の八代田陽子氏（当財団フェロー）には、酵母が産生する脂肪酸の新規機能について紹介していただきました。

これまで微生物同士は化合物を使ってコミュニケーションを行っていることが知られていました。例えば同種の菌の生育密度を感知して、バイオフィームや毒素などの物質の生産をコントロールする機構としてクオラムセンシングが良く知られています。酵母では性フェロモンを使って細胞の接合を行い、芳香族アルコールにより仮性菌糸の形成制御などが行われていることも報告されています。理化学研究所の吉田稔先生の研究室で、高橋秀和博士が分裂酵母変異株菌体のスポットアッセイを行ったところ、隣の変異株のそばに生えないはずのコロニーが形成されていることから、隣の変異株から何か物質が分泌しているのではという考えに至りました。酵母は、窒素源として利用しやすいグルタミン酸やアンモニアを先に取り込むことが知られており、バリン・ロイシン・イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸は後から取り込むという窒素カタボライト抑制という現象が存在します。高橋博士が使用していた変異株は、*eca39*という分岐鎖アミノ酸の生合成に関与する遺伝子の破壊株であり、培地に分岐鎖アミノ酸を添加すると生育できますが、さらに利用しやすいグルタミン酸などを添加した場合には生育できません。*eca39*破壊株



は、このような条件下で野生株を隣に生育させると生えてくる、という適応生育ができたという現象から研究がスタートしました。この*eca39*株の適応生育は出芽酵母野生株では見られません。このように、通常は*eca39*破壊株でグルタミン酸添加時にアミノ酸トランスポーターの発現が抑制されますが、野生株が分泌する物質によりその抑制が解除されていることが示唆されました。そこで分裂酵母野生株が分泌している化合物の単離を目指しました。

適応生育誘導物質は脂溶性であり、酸性物質であることが予想されました。さらに学生の孫さんは、40リットルの培養液から誘導物質を2つ精製して、質量分析やNMRなどにより、10(R)-aetoxy-8(Z)-octadecenoic acidと10(R)-hydroxy-8(Z)-octadecenoic acidであることを明らかにしました。これらの化合物はナノモルオーダーという低い濃度で誘導活性を示します。さらに類似物質の解析結果から、オレイン酸やリシノール酸などには誘導活性を示さないことなどを明らかにしました。そこでこれらの物質を窒素シグナリング因子 (Nitrogen Signaling Factor: NSF) と命名して、さらなる解析を行いました。

まず、アミノ酸トランスポーターの各破壊株の解析から、*Agp3*というアミノ酸トランスポーターがNSFにより発現抑制されていることがわかり、NSFにより窒素カタボライト抑制が解除されていることを見出しました。さらにマイクロアレイ解析の結果から、*gcn5Δ*、*ada2Δ*、*ada3Δ*などのヒストンのアセチル化酵素の破壊株と類似した発現パターンを示すことから、NSFにより*Gcn5*を介した*Agp3*の発現抑制解除が起こっていることが示唆されました。まだまだ多くのことを明らかにする必要がありますが、まずどのようにNSFが合成されているのか解析することを開始しました。LC-MSにより解析を行うと、500マイクロリットルの培養上清からNSFが同定可能であることがわかりました。この方法により、これまで最少培地でのみ分泌していると考えられていたNSFが、リッチな培地でも多量に分泌していることを見出しました。また細胞内にも多量のNSFが蓄積していることもわかってきました。また細胞の密度が高くなるとNSFの分泌量も増加することから、NSFは分裂酵母におけるクオラムセンシングのような機能を果たしているのではないかと考えられました。

最後にNSFが分裂酵母でどのように合成されているのか解析を行いました。NSFはオレイン酸と構造が類似していることから、オレイン酸からNSFが合成されていると予想されますが、どのような酵素が関与しているのかは現時点では不明です。最近、バクテリアである緑膿菌が、コミュニケーション分子としてオレイン酸から分裂酵母のNSFと類似物質を合成していることが海外のグループから報告されました。その合成には、オレイン酸およびジオキシゲナーゼが関与していると報告されましたが、分裂酵母*S. pombe*には類似した酵素は存在しないため、別の合成機構が存在する可能性があります。そのため、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーからNSFを生産しない株を探索するため、スポットアッセイを行ったところ、興味深いことにNSFの合成には、ミトコンドリアに局在しているタンパク質が関与していることが示唆されています。

酵母における脂肪酸の代謝や合成については古くから研究が行われていますが、今回私たちが発見した分裂酵母のNSFも、シグナル伝達物質として機能していることを見出しました。今後はこの物質が引き起こす細胞間のコミュニケーションが、分裂酵母*S. pombe*に特有な現象であるのか、さらなる解析を行っていきたいと考えています。

講演後には、会場から今回明らかにできたNSFは分裂酵母*S. pombe*に特異的な物質であり、どのような条件で分泌するのか、ヒストンのアセチル化に関係する*Gcn5*はNSFの生産にどのように関与しているのか、またオレイン酸から今回のNSFの合成経路の詳細はわかっているのか等の質問があり、活発な議論が行われました。

講演 2

ひそかに活躍する微生物が作る酵素・有用物質

キッコーマンバイオケミファ株式会社 企画部長

五味 恵子

次に、キッコーマン株式会社の五味恵子氏には、麴菌をはじめとした微生物を用いた物質生産に関してご講演いただきました。

最初にキッコーマン株式会社の概要について、説明がありました。なぜ千葉県野田市は、しょうゆ作りが盛んであるのか。それはしょうゆの原材料である大豆・小麦・塩が入手可能であったこと、江戸川を使って江戸にしょうゆを容易に輸送できたことから発展してきたようです。全国にしょうゆ会社は1,000社くらいありますが、キッコーマンはその34%をシェアしていること、また現在しょうゆの売り上げの85%が、日本以外の国で取引されていること、また研究所は1904年に開設され2019年に新しい中央研究所が新築されたことなども紹介されました。



基本的なしょうゆの作り方については、江戸末期からほとんど変わっておらず、大豆・小麦に麴菌を生育させてもろみを作り、数ヶ月後に圧搾・火入れを行うという微生物が作る酵素と時間によりしょうゆは作られています。そのため、古くからキッコーマンでは、麴菌の酵素を研究してきました。例えば1957年には麴菌の耐酸性プロテアーゼのモルシンを胃腸薬として販売し、1988年には茶飲料の清澄化の用途でタンニンを分解する麴菌のタンナーゼが商品化されました。最初は麴菌から酵素を精製・販売してきましたが、遺伝子組換え系が開発され、さまざまな酵素を組換えることにより、大腸菌での生産も開始しました。現在では、キッコーマンで開発した大腸菌・麴菌の異種タンパク質発現系と関連会社のヒゲタ醤油が開発したブレビバチルスの発現系を用いて、酵素を生産・販売しています。

次に熱処理により遺伝子の発現誘導が起こる大腸菌スリーパーベクターシステム（誘導物質を使わず熱誘導により遺伝子発現が上昇するプロモーターを利用）の応用例として、臨床診断用の酵素であるクレアチナーゼの開発について紹介されました。この酵素を用いて、腎臓の働きを示すマーカーであるクレアチニンを色素に変換して、定量を行っています。さらに糖尿病の検査診断のために、糖化ヘモグロビン HbA1c を測定する酵素の開発も行なってきました。糖尿病は血糖値が高いことにより、網膜症・腎症・神経障害などを引き起こすため、早期発見と治療が必要とされます。糖尿病の診断としては、血中のグルコース濃度を測定する方法と、糖化ヘモグロビンを測定する方法があります。糖化ヘモグロビンは、血糖値が高いとメイラード反応によりヘモグロビンに糖が付加され、血中グルコースは直前の食事内容によりかなり影響を受けることとなります。一方で、HbA1c は1-2ヶ月の平均血糖値を反映しているために、2010年からHbA1cをより多く診断に用いるようになりました。HbA1cは、これまでHPLC法やイムノアッセイ法などが使われてきましたが、酵素を用いることで、より迅速な再現性とより安価な測定の開発に取り組んできました。まず糖化ヘモグロビンをプロテアーゼにより断片化する方法を試みました。HbA1cをプロテアーゼ処理し、フルクトースを含むペプチドが検出できる酵素を微生物から探索したところ、新規酵素フルクトシルペプチドオキシダーゼ(FPOX)を糸状菌から発見することができました。この酵素反応により生成する過酸化水素をペルオキシダーゼによって検出を行い、HPLC法と良好な相関関係を持つアッセイ系を開発できました。さらにFPOXの機能を向上させる研究を行ないました。例えば測定キット中で使われている界面活性剤へ耐性を示す酵素の取得を目指しました。FPOXの疎水度の高い領域には負電荷を持つグルタミン酸が存在するため、このグルタミン酸に変異を導入して界面活性剤耐性の酵素を取得することができました。FPOXはHbA1cからプロテアーゼにより遊離したペプチドを基質として反応するため、プロテアーゼが必要となりますが、酵素

自身の分解や他の検査項目測定試薬にも影響を与える可能性があるため、プロテアーゼ処理を行わず直接測定可能な FPOX の開発を行ないました。FPOX の活性中心付近に、基質が入るためのスペースを阻害するアミノ酸を変異することで、HbA1c を直接測定できる酵素の開発に成功しました。これらの酵素は現在世界中で用いられています。

次に衛生検査試薬として、ルシフェラーゼの開発に取り組みました。まずゲンジボタルのルシフェラーゼのクローニングを行い、大腸菌スリーパーシステムにより量産化に成功しました。さらにルシフェラーゼ遺伝子に変異を導入して、赤色など発光色の異なる変異体も得ることができました。そこで、まな板の上に残っている食品残渣や微生物を、ATP 量を測定することで清浄度を評価できないか検討を行ないました。これを事業化する上で、酵素の安定性・感度・コストが大きな課題となるため、その課題を解決するための研究を進めてきました。まず、ルシフェラーゼを 1 アミノ酸変異によることで、耐熱性が上昇した変異体の取得に成功しました。次に ATP からルシフェラーゼにより生成した AMP を、さらに ATP へ変換するホスホエノールピルビン酸ジキナーゼ (PPDK) を好熱性放線菌より取得して、高発光で発光時間が持続する方法も可能になりました。開発できたキットは、30 秒という短時間で判定可能となり、その場で簡便に数値化できるため、食品衛生検査指針にも収載され広く使われるようになっています。さらに他社の製品と差別化するため、ATP だけでなく AMP, ADP もピルベートキナーゼと PPDK を併用して、さらに感度よく検出するためのテスターの開発にも成功しています。

その他にも微生物検査をするための簡易培地シートの開発を行い、特定の微生物が生産する酵素に反応する発色基質を添加することにより、例えば大腸菌や黄色ブドウ球菌などの検出を可能にしています。最後に糸状菌が生産する抗酸化剤のエルゴチオネインについて紹介されました。エルゴチオネインはビタミン E の 1,000 倍の抗酸化能を持ち、キノコ類に多く含まれるアミノ酸の一種です。現在はキノコの抽出物や化学合成によって作られています。コストがかかるため微生物での生産を試みました。解析の結果、しょうゆ中にもエルゴチオネインが含まれていることがわかり、麹菌がそれを生産していることが予想されました。そこで麹菌ゲノムデータから生合成遺伝子を探索して、酵素高生産に必要な酵素を特定することができました。現在はタンク培養で麹菌を培養することで、安定的にエルゴチオネインの生産も可能となっています。さらにセレン源を培地に添加すると、エルゴチオネインのさらに 1,000 倍の抗酸化能を持つセレノネインも生産できることを見出し、エルゴチオネインとセレノネインの販売を検討しています。

以上のようにしょうゆ醸造に用いる麹菌などから、酵素や有用物質を生産販売する事業の詳細について報告されました。

講演後には会場から、「しょうゆやビールの生産に於いて酵素は非常に重要であるが、味や香りを形成するしょうゆ造りの研究から発展していったものなのか」、「今回お話された酵素は非常に多様であるが、どのような観点でどの酵素の開発を行うかを予め決めているのか」等の質問があった。これらの質問に対し、しょうゆの味や香味の形成のために、麹菌だけでなく酵母・乳酸菌の研究も深く行っていること、またこれらの微生物の研究によってキッコーマン独自の酵素の研究へと発展していることが説明された。今回は成功した事例だけを紹介したが、実際には事業化できなかった研究も多くあることも紹介された。また今回紹介されたエルゴチオネインやセレノネインはどのような形で製品化を目指すのか教えてほしいという質問に対して、エルゴチオネインについてはサプリメントとしてではなく、食品に添加することや化粧品などの製品化を目指していると回答され活発な議論が行われました。

講演 3

「基礎研究の発展と若手人材の育成を目指したアカデミア－企業間連携」

大隅基礎科学創成財団 理事
阪井 康能

最後に本財団の阪井理事から、酵母コンソーシアムの今後の構想についての紹介がありました。

今回の五味さんの講演を拝聴することで、アカデミアの研究者が新たな視点をもって基礎研究へフィードバックすることができれば、酵母コンソーシアムの創発セミナーを開催する意味があると考えています。また、酵母コンソーシアムでは日本の酵母研究者、特に企業で研究している若手の研究者に酵母基礎研究の良さをどのように伝えることができるか議論を行なってきました。1990年代に、フランスのパスツールがワイン業界からの依頼を受けて、毎年美味しいワインを作るための問題解決を目指した研究を行い、酵母のアルコール発酵がワイン醸造に重要であることを見出しました。パスツールのこの研究は、純粋な基礎研究とも、現実問題の解決を目指す応用研究とも違います。このようなパスツール型の研究は日本では弱く、酵母コンソーシアムではアカデミアの研究者と企業の研究者が議論する場を提供するため、クローズドのセミナーが出来ればと考えています。具体的にはゴードン会議のように参加者を制限して秘密保持契約を結んで、企業から現場の理由のつかない現象などを発表してもらい、アカデミアと議論するセミナーを行いたいと考えていることが紹介された。



セミナー後には久しぶりに対面での交流会が開催され、講演内容に関する議論が続いていました。企業とアカデミアが共通の話題で議論できる、酵母研究の良さを改めて感じた創発セミナーでした。

以上