

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14419

研究課題名(和文) 深海底微生物のメタゲノム分析と新奇レアメタル依存遺伝子発現誘導機構の解明

研究課題名(英文) Novel Microbial Response for Critical Metals: Genetic and Computational Analyses on the Metal-Dependent Stimulation using Metatranscriptomics in Deep-Subseafloor Biosphere

研究代表者

芦内 誠 (Ashiuchi, Makoto)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授

研究者番号：20271091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物はあらゆる環境に生息しているが、その大半は既存の方法論では増やせない“難培養性”であることが分かってきた。メタゲノム技術の出現により、かかる難培養生命体の遺伝生理学の扉が開いた。今回、深海底コア試料を対象とする機能メタゲノム分析から、新奇レアメタル応答遺伝子配列の単離に成功した。また、計算化学的手法を応用し、リボスイッチ様の新たな構造モチーフの同定にも成功した。堆肥から深海底まで、様々な生息環境に適応した土壌細菌“巨大菌”にもレアメタル(レアアース)応答性が見いだされた。その細胞増殖や環境適応にも関わる生存戦略の概観が見えてきた。

研究成果の概要(英文)：Microbes are found throughout nature, the majority of which, however, are unculturable or quite difficult to be multiplied on traditional microbiology. Metagenomics has emerged to access the genetics and physiology of uncultured lives. Here we succeeded in newly identifying critical metals-responsive gene fragments using functional metatranscriptomics in deep-subseafloor biosphere, namely the substrate-induced gene expression screening. The computational analysis revealed riboswitch-like secondary structures in the nucleotide sequences of fragments identified. Such molecular responses for rare earth elements were also found in *Bacillus megaterium*, a soil bacterium thriving in a vast range of environmental conditions, e.g. in compost to deep-subseafloor. The paper also discussed its survival strategies for cell proliferation and conditional adaptation in the presence of heavy metals including lanthanoids.

研究分野：応用分子微生物学

キーワード：深海底 難培養性微生物 メタゲノム レアメタルバイオロジー 核酸スイッチ 金属イオン吸着 機能性バイオ高分子

## 1. 研究開始当初の背景

(1)『深海は宇宙と同じくらい不思議と謎に満ち溢れている』。最近まで人類の踏み込めなかった領域「深海(水深2000m以下)／超深海(6000m以下)」に生息する微生物種は、新たな生命像を理解するための格好の研究対象になるとして、注目されている。

(2) 深海底域はまた、産業鉱物資源、特にレアメタル／レアアースの豊富な領域であり、海底鉱脈の開拓が至上命題となっている。

(3) ところで、この二つの話題は一見無関係のように映る。確かに陸域(微)生物の生命活動に関わるレアメタルはマンガンやコバルト等、少数、例外的とされてきた。ただし、深海底微生物とレアメタルの関係についてはほとんど分かっていない。

(4) 深海底微生物の多くは、原核／真核生物とは異なる、第三の生物種“始原菌(アーキア)”に属する。分類学上も新種が大半である。そのため、深海底微生物が生み出す様々な化合物には、生命科学上の新奇性(未開拓バイオマテリアルとしての位置づけなど)、転じて、現代社会が抱える難問課題の解決に繋がる可能性をも秘めている。

(5) ただし、これら深海底微生物群の培養と増殖は現代微生物学の技術ではほぼ不可能、いわゆる「難培養微生物」で占められていることが微生物応用を目指す際の大きな壁になっていた。そのため、マンモス再生計画の深海底微生物版まで模索する必要があった。

(6) かかる現状の打破(深海底フロンティアに踏み込むためのブレークスルー)のための新技術領域として「先端(応用)メタゲノム」研究への期待が高まっている。

## 2. 研究の目的

人跡未踏の地とされてきた深海底に生息する未同定新種微生物のメタゲノム分析に取り組む。今回、『深海底域にはレアメタル／レアアース資源が相当量存在する』とした革新的な報告に対し、異分野からの斬新な切り口(基質依存的遺伝子発現誘導を指標とした先端メタゲノム)をもつてその重要性を再解釈する。これにより、生物機能の多様化に関する知識の拡充、なかでも鉱物(金属)に対する新たなバイオ応答システムの発見とその分子メカニズム(核酸スイッチによる新たな遺伝子発現誘導機構など)の検証に注力する。また、ここで得られた学問知見を産業応用に繋げる上で必要となる技術展開戦略を練るため、該下流遺伝子群の機能同定等、発展的課題にも着手する。具体的には、深海底堆積層(地下)から農場堆肥に至る多様な環境に適応した超広域環境微生物“巨大菌”に着目する。実際、レアアースの一つ“ジスプロシウム(Dy)”存在下で培養すると、環境適応因子として注目される“ポリγグルタミン酸”を過剰に作り始めるという画期的な発見を機に、巨大菌でも「ゲノム／遺伝子クラスターレベルのレアメタル応答解析」の重要性、緊急性が増している。かかる現状を鑑み、該分子機構の詳細解明にも挑戦する。

## 3. 研究の方法

(1) 環境DNAの調製と増幅(JAMSTEC連携): 環境試料(深海底コア試料を含む)からのDNA抽出にはPowerMax Soil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories社製)を用いた。該環境DNAは、さらにMultiple displacement amplificationに供された(GE Healthcare社製GenomiPhi HY DNA Amplification Kit)を使用;メタゲノムラ

イブラリー作製に必要なDNA量を確保するため)。さらに、S1ヌクレアーゼ処理で余剰の一本鎖DNAを取り除いた。不適切な切込みに対しては、TaKaRa社製DNA polymerase Iを用いて修復した。

(2) 深海底メタゲノム／ショットガンライブラリー(JAMSTEC連携): IODP第315次研究航海で深海探索船「ちきゅう」によって採取された「南海トラフ熊野灘」深海底コア試料と、IODP第329次研究航海で採取された「南太平洋環流」深海底コア試料を対象にした。pK18-Green-TIR DNAをクローニングベクター、大腸菌MegaX 10Bを宿主にメタゲノム(ショットガン)ライブラリーを作製した。かかる挿入断片の下流(3'側)にはレポータ遺伝子が置かれている:「前者」*gfp*;「後者」*evoglow*。ほか、Kan耐性遺伝子・*Iac*プロモーター／オペレーター・SD配列・ストップコドンなども含む。挿入断片サイズにして~5 kb、 $10^4$ 程度の独立クローンを保証する。

## (3) 基質誘導性遺伝子発現スクリーニング法(SIGEX)の応用(JAMSTEC連携): 該選択培地

(0.25% Luria-Bertani培地(ミラー社製), 20 mM MOPS-NaOH, 0.2% マルトース, 20  $\mu$ g/mL Kan) 5 mLに、各メタゲノムライブラリー(~ $10^6$ 細胞)を植菌、濁度(測定波長は600 nm)が0.3に達するまで、37°Cで振とう培養した。この時点での実質的な生菌数は $2.4 \times 10^8$ /mLに及ぶことが判明した。SIGEX技術の最大の特徴は、大規模ライブラリーに特定の基質や化学物質を与えるだけで、遺伝子発現誘導を伴う応答機構を得た陽性クローンの探索と同定がハイスループット(蛍光強度の追跡)で実行可能、さらに従来の分子生物学的戦略に捉われない多様な遺伝子配列の取得可能であることも利点とされる。今回、SIGEXの特長を「新規金属応答遺伝子群の探索」技術として活用するため、以下の実験プロセスを考案した。具体的には、上記のライブラリー培養液に、適正量の金属イオン溶液を添加し、約15時間の追加培養を行った。次いで陽性クローン候補数を算出するため、クローン数 $2 \times 10^5$ に対して、BD-Accuri-C6フローサイトメータ(ベクトン社製)を用いることにより、クローン個々の蛍光強度(差異)を精査した(ベックマン社製カルザ解析ソフトを使用)。金属応答性(SIGEX法における基質誘導性と同意)クローンについては、次いで、MoFlo XDPセルソータ(ベックマン社製)による一細胞分離工程に供した。分離に成功した単一細胞クローンについては、標的金属イオンを含む選択培地に加え、対象区として選択培地のみ条件でも培養した。増殖した細胞数 $10^5$ に対して、上述のフローサイトメータと同解析ソフトを適用し、蛍光強度の変化を追跡した。さらに、同分析のハイスループット化を実現するため、マイクロプレートリーダーによる迅速分析法も考案した。実際、標的金属種の添加による濁度(波長600 nm)と蛍光強度(励起450 nm; 蛍光500 nm)の変化量について同時測定を実行した。今回、得られた濁度比(金属添加時の濁度/同無添加時の濁度)が(該条件が基盤的な細胞分裂や代謝経路に大きく影響しないとの前提のもと)1に近く、一方、蛍光強度比(金属添加時の蛍光強度/同無添加時の蛍光強度)は有意に1を上回ると推定された場合、陽性クローン候補とした。該候補クローンについては、かかる応答分析までの間、-20°C、非凍結条件下で保存した。

(4) 塩基配列の決定と特殊構造分析: 各候補クローンから得られたベクターDNAを鋳型に、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(サーモフィッシャー社製)を用いてPCRを行った後、ABI社製Prism 3100-Avant Genetic

Analyzer に供して該挿入断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の相同性分析については NCBI 発信の同分析アルゴリズムを、プロモータ領域の推定には FGENESB システムを利用した。リボスイッチスキャナーと RNA フォールド推定アルゴリズム (WEB 公開) を駆使することで、核酸二次構造分析にも成功した。以上の過程で得られた新奇塩基配列の情報に関しては、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した (番号 LC270323—LC270329)。

(5) レアメタル含有培地の調製：レアメタル類 (Dy 等のレアアースを含む) の多くは、酸性 pH の水溶液ではイオン化しているが、中性 pH に近づけることで水酸化物を形成し、不溶化する (図 1 上)。不溶化 (石灰化) した金属種を

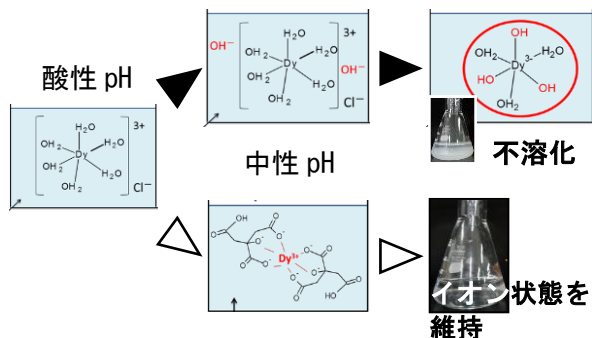


図 1. レアメタルイオンの pH 安定性と水溶液中での挙動例示は Dy。黒矢印はキレート物質無添加での中和；白矢印はクエン酸塩の共存下での中和。微生物 (大腸菌等) の培養に用いる培地の pH は中性付近で調整する場合が多い。

取り込むことは、いかなる微生物をもってしても至難である。また、微生物研究とレアメタルの接点を探る中で、今なお、その対象が好酸性微生物群に集中していることに気付いた。対象レアメタルイオン種の pH 安定性の影響とみても間違いないだろう。今回、レアメタルバイオロジーの研究対象の拡大 (中性 pH での活動性に富む土壌細菌等) を狙い、はじめにレアメタル含有培養培地の調製法の改良に取り組んだ。種々検討の結果、図 1 (下) の通り、レアメタル含有培地の最適化に成功した。

#### 4. 研究成果

(1) 深海底メタゲノムライブラリー由来レアメタル応答性クローンの選抜：研究開始当初から我が国で指定されているレアメタル 31 鉱種 47 元素を対象としてきた (かかる研究プログラム終了後も継続して分析を進める対象も含まれる；Dy をはじめとする希土類 (ランタノイドと呼ばれる重希土元素は先端産業分野でも特に重要視されている) など)。今回の「南海トラフ熊野灘」関連の報告では、ニッケル (Ni)、コバルト (Co)、モリブデン (Mo)、ならびにガリウム (Ga) に焦点を当てる。なお、Ni、Co、Mo は、産業上、レアメタルに属する一方、金属酵素やビタミン B<sub>12</sub> のように必須構成成分になる場合も多く、「バイオメタル」としての側面を持つことが知られている。対して、Ga の生物学的役割や生理学上の必須性に関しては未だ明確になっていない。さらに、前者は全て「遷移金属元素」に含まれる。生物では重金属毒性を回避するため、イオンの価数を変動させることがある。実際、ビタミン B<sub>12</sub> 中の Co は二価ではなく一価の陽イオンである。価数変換により、Co 独特の猛毒性がビタミン必須の機能に書き換えられている。猛毒性で知られる六価クロムを三価に還元する微生物反応はバイオのデトックス戦略として注目されている。レアメタルの中でも遷移金属系の場合、「生化学的

価数」という新たな概念を持ち込む必要がある。その一方、Ga は基本的なイオン価数を変えない「典型金属元素」に含まれる。加えて、金属毒性が特に顕著な「アルミ族」に属することからも、従来、バイオメタルとして機能する可能性は乏しいとされてきた。そのため、前者 3 種と比較しながら進める Ga への応答性分析は、本計画で、非常に重要な示唆を与えるものになると予想された。続いて「南太平洋環流」関連の報告では、Co、Mo、レアメタルの代表格であるインジウム (In；Ga と同じくアルミ族)、ならびに先端産業上の有価性に富むレアアース (ランタン (La)、ジスプロシウム (Dy) など) に焦点を当てた。南太平洋環流は、南海トラフ熊野灘に比して、圧倒的に有機化合物が少ない環境である。今のところ、地球上で最も貧栄養 (低 C/N 比) な条件のひとつとされる。生命とは無縁にも見える該還流域にも微生物は生息している。その大半は難培養微生物で、未同定種も多く、微生物種レベルでの多様性も高かった。まさに生物情報/遺伝資源の宝庫といえる。他方、同還流域にはレアメタル (レアアース) などの未開拓金属 (無機) 資源が眠っていることも示されている。レアアース (希土類) のイオン態は三価カチオンを基本とするが、遷移金属元素であるため、価数変換も可能である (その一部は実際に電子機器や永久磁石部材の基盤的特性として応用されている)。ただし、レアアース (17 種) の場合、Co や Mo とは異なり、生物の物質代謝や環境応答には関与しないとされてきた。現代のメタルバイオロジーは (易培養性の土壌環境微生物を含む) 陸域生物群を対象に、富栄養条件下での解析を主体として発展してきた。従って、本提案の (超貧栄養下難培養微生物を主体とする) 深海底メタゲノムを用いたレアメタル (レアアース) バイオロジーには、従来研究の範疇に留まらない学問的展開にも期待が持てると思え、非生物学的金属種であるとの一般認識にも対峙するような挑戦的研究を立案した。実際、La と Dy のバイオメタルとしての側面を追求することになる。

以下、具体例をもって詳解する。はじめに、本研究期間を通じて取得した陽性クローン候補は 384 株 (現在解析進行中のもの、本件終了後も解析を続ける予定の候補株を含む) に及ぶことを報告する。研究開始当初、本件は挑戦的な色合いの濃い研究であったため、二桁前後の候補株を取得するのが限度との予測を立てていたが、実際にはこれを遥かに上回る成果となった。ハイスループットかつ従前に捉われぬ先端メタゲノム法「SIGEX」が新規金属応答遺伝子群の探索計画に最も適した方法論の一つになることを意味する。ここでは一般公開可能なレベルまで解析の進んだクローンについて紹介する。

①「南海トラフ熊野灘」深海底メタゲノム：該掘削地点 C0001 及び C0002 の環境試料からライブラリーを作製し、SIGEX 分析に供した。条件別蛍光強度の分析値から *gfp* (レポータ遺伝子) の発現誘導比率を参照したところ、Ni・Ga に応答性を示すクローンは高頻度で単離されるのに対し、Co・Mo 応答性のクローンは皆無であった。Ni 選択性の高い Ni-1 株と選択性の低い Ni-2、-3 株を得た (図 2)。また、Ga 応答性クローンで分析済み 4 株のいずれも Ga への選択性が認められた。かかる応答性の違いは遺伝子配列上 (実際に読み取られる情報) の違いを反映していると示唆された。

②「南太平洋環流」深海底メタゲノム：今回は掘削地点 U1368 及び U1369 の環境試料からライブラリーを作製し、SIGEX 分析に供した。はじめに、10<sup>5</sup> 個超の独立クローンを保証する 6 種の

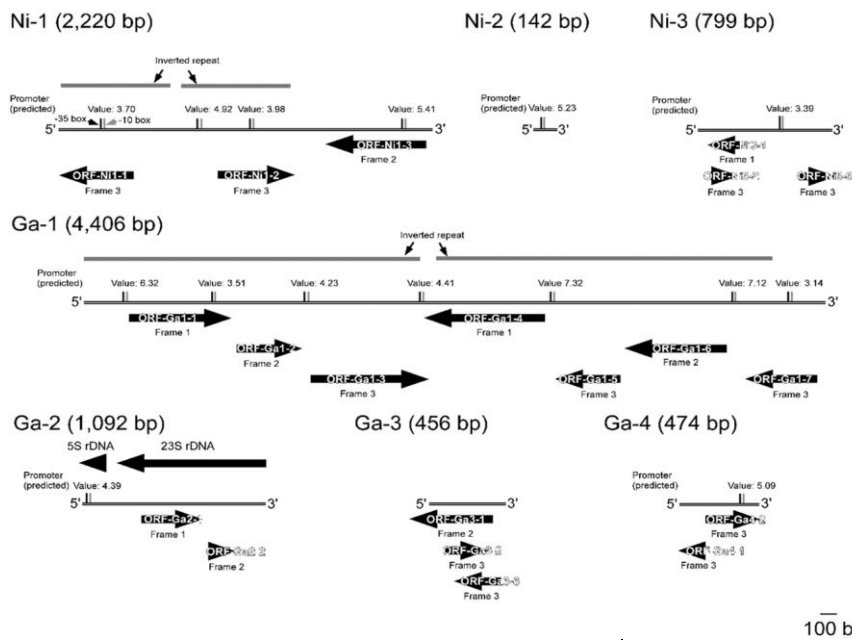


図2. 南海トラフ熊野灘／深海底メタゲノムより見いだされた新規金属応答遺伝子の概要

Ni-1は*Flavobacterium*のDNA結合タンパク質と*Sunxiuqinia*のcAMP結合タンパク質のオルソログを含む。Ni-2, -3は新奇配列。Ga-1に含まれる7つのORFはすべて*Thiomicrospira*のABCトランスポーター関連タンパク質のオルソログ。Ga-2は既知難培養微生物の細胞壁結合タンパク質のオルソログを含む。Ga-3は放線菌カルバミル転移酵素のオルソログを含む。Ga-4は*Thiomicrospira*のLPS放出に関わる輸送タンパク質のオルソログを含む。ORFはBLASTXとORFファインダー、構造遺伝子はBLASTN、プロモータ部位はFGENESBアルゴリズムによる解析を基に決定した。なお、これら全ての構造の閾値は3.0以上に設定している。

ライブラリーを用意し、ドラフト試験に供した結果、Mo、La、ならびにDyによる誘導現象が確認できた。一方、CoとInに対する応答性は認められなかった。①の実験でもCo応答は認められなかったことから、かかる二価イオンが初期の想定を超える金属毒性を有している可能性がある。猛毒性のIn（三価カチオン）でもよく似た挙動と結果であったことから、かかる二つの強毒レアメタルの場合、生物学的／生理学的側面を推し量る前に、まずはその有害性をどのような形で制御していくのが喫緊の課題になるとの結論に達した。話題を戻す。現在まで、Mo・La・Dy応答クローンについて、それぞれ、1株・4株・1株の分析が完了している。副次的な金属応答も認められ、Mo株はわずかながらCoにも反応する。本発見は金属毒性からの回避戦略を理解する上で重要な示唆に繋がる可能性がある。他方、該La株はDy、Dy株はLaにも同水準のevoglow蛍光性（レポータ遺伝子発現誘導量に相当；応答性）を示すことが判明した。かかる6株については、一般バイオメタル（鉄イオン等）に対する応答性まで調べた結果、evoglow蛍光誘導は認められなかった。今日、非鉄重金属類に対する生物応答の多くは「鉄イオンに対するバイオシステムの誤作動」との解釈が有力とされているが、本件、かかる仮説（通説）にそぐわない特殊性まで備えていることを示している。LaとDyは希土類のランタノイド族に分類され、同族間の物理化学性は著しく似通っている。そのため、生物工学的技術による画期的なDy選択吸着法や分別戦略創造に寄せられる期待は大きい。今回の深海底メタゲノム研究では、LaとDyを完全に分別認識できるほどの画期的な分子戦略を導くまでには至らなかったが、未分析のまま残る陽性クローン候補を着実に調べ上げていくことで突破口も見えてくるとの感触を得た。

## (2) レアメタル応答性塩基配列の同定と分析：

(1) ①, ②の作業を通じて得られた計13種の陽性クローンについては、各外来DNA挿入断片の塩基配列を調査した。今回決定した塩基配列間の類縁性は皆無である一方、個別に見ていくと、そのいくつかは既知の塩基配列／遺伝子産物との相同性を示すことが判明し、「南海トラフ熊野灘」深海底メタゲノム由来の塩基配列で顕著であった(図2)。現在継続中の追跡研究も手早い、新たに同定した「金属応答要素群」の大別化に

至った(引用①投稿中)：I群、転写制御因子に類縁のタイプ；II群、リボスイッチ型核酸配列(c-di-GMP結合因子など)；III群、鉄イオン(バイオメタル)応答因子に類縁のタイプ；IV群、機序不明プロモータ様配列。他方、「南太平洋環流」深海底メタゲノム由来のものに注目すると、今現在、その全てがII群に属すると予想される塩基配列で占められていた(未公開情報)。配列相同性に立脚した“前世紀の”分子生物学では分析困難であった「応答遺伝子群の構成原理」の発見にも繋がるのではないかと期待される。ここまでの成果はSIGEX法の優れた特長によって齎されたとの見解に異論を挟む余地はない。一方、ここに至り、本技術の弱点も浮き彫りになってきた。例えば、現行でクローン化可能なDNAサイズは数kbに止まるため、特にII群配列によって制御される下流構造遺伝子が欠けてしまう危険性が高い。事実、大規模データによる「メタゲノム分別」ほか、最新の応用ゲノム研究への進展にも制限がかかっているのが現状である。今回、生物の秘められた金属応答現象を分子レベルで理解するための足掛かりを得たという点、学術上の評価に十分値すると考える。ただし、その全容解明にあたっては、中長期(5~10年規模)的な進展を見据えた本格的な「深海底メタゲノム計画」に移行する必要がある。比較的短期(3年規模)の、集約的かつ挑戦的な側面を持つ本研究では、新たな切り口を求め、不足する部分(情報)については(可能な限り)補う不断の試みが必要と考えた。具体的には、微生物のゲノムに秘められた機能制御の戦略とかかる細胞本体に認められる(特殊な)生理を繋ぐ実学的観点に沿った情報が不足している。加えて、「深海底等の極限環境への適応」ほか、より俯瞰的な切り口で展開することが適えば、応用ゲノム研究の更なる発展にも繋がるのではと考えた。今回、かかる発展研究の対象として、超広域環境微生物“巨大菌”に注目した。

(3) 超広域環境微生物“巨大菌”に見いだされた新たなレアメタル応答現象：巨大菌は、堆肥から深海底まで、ほぼあらゆる環境に適応した土壌細菌である。富栄養(高C/N)下でバイオプラスチック「ポリヒドロキシアルカン酸」を蓄積する一方、貧栄養(低C/N)、海水にも匹敵する高塩条件に曝すと、一転して「ポリγグルタミン酸(PGA)」を作りはじめる。外部刺激に応じて環境適応因子の代謝経路を転換する等、

高度な適応戦略を備えていることを意味する。微生物のPGA合成制御に種々のバイオメタルが関与する可能性は古くより指摘されてきたが、一方で非生物学的な金属種とされてきた「レアアース」に光を当てるような挑戦的な試みは、我々の知る限り、先に例がなかった。PGA研究の標準株“納豆菌”ではレアアースへの応答性が認められないとする前例があり、かかる発展研究に向けられた関心や期待、(着手当初の時点でいえば)それほど大きくなかったはずである。実際、PGA合成に関わる構造遺伝子群のラインナップ(オペロン構成)は、納豆菌Pgsと巨大菌Capの間で類似する(保存されている)。一方、より上流の調節領域を核とする議論は乏しく、機能レベルでの差異についても不明であった。計算化学的手法により、納豆菌ではCCpA/CodY、巨大菌ではDegUが転写制御因子として働いていることが示された。DegUは多様な環境刺激に応答する「グローバルレギュレータ」の中でも最上位に位置する司令塔の役割が知られている。納豆菌におけるPGAの役割は判然としない一方、それ以外の微生物が作るPGAには環境適応因子としての役割が知られるようになった。よって、該PGA合成がDegUの直接的な支配下に置かれることは分子生理学的に見ても理に適っている。DegU構造生物学から、その実体は金属非依存のタンパク質構造であることが明らかになる中、我々は微量のDyを添加するだけで2倍以上のPGA増産に成功する等、画期的な知見を得た。ちなみに、納豆菌類縁種のゲノム縮小株を利用した代謝設計学が大きな注目を浴びているが、実際に達成された同増産率は元株の1.3倍にも満たない。巨大菌には未だ発見に至っていない金属(特にレアアース)感知バイオシステムが眠っているとの結論に達した。その探索には、先の深海メタゲノム研究で培った経験が決定的に役立った。実際、非翻訳調節領域(5'-UTR)の特殊構造予測を進めた結果、DegU認識部位と第2プロモータを含む-261塩基(nt)までの配列にアテニューエータ、あるいはリボスイッチ様構造を生じる可能性のあるホットスポットを推定した(図3)。かかる核酸二次構造の形成は塩基配列依存的と考えられる。mRNAに限らず、一本鎖DNAでも生じる。我々はPCR法の原理に着目し、変性からアニーリングにまでの過程で鋳型一本鎖DNA分子内での二次構造形成の方がプライマーDNAとの結合よりも早く起こる場合を仮定し、PCR産物量の減衰を指標とする阻害PCR法を考案した。さらに、一塩基ずつ上流にずらしたフォワードプライマーセットを用いることで二次構造の起点となる塩基対についても同定を試みた。結果、図3A-Cまでに相当するDNA配列の増幅は著しく阻害され、正常増幅に比して30%以下であったのに対し、図3Dでは正常なPCR増幅が認められた。以上より、先の二次構造予測の結果は実体に照らしても十分に

信頼できるものであるとの結論に達した。現在、かかるPCR増幅断片(変性一本鎖DNA)を固定した「レアアース分離カラム」でのプルダウンアッセイ(Dy吸着性の立証)、Shiらのフットプリントアッセイの応用(リボスイッチ機能の立証)、巨大菌PGA合成のDy特異性(標的mRNA量の追跡/増減挙動)等、鋭意継続中の研究が新たな金属応答性リボスイッチ構造の存在する可能性を強く後押ししている(引用②作成中)。

(4) 今後の展望：巨大菌とレアメタルの接点を探る研究は、全く想定していなかった方向にも進みはじめた。レアメタルは重金属であるため、毒性による増殖抑制が当然ながら予想されていた。実際、代表的なInでは増殖抑制の挙動が明白であった(図4)。一方、Dy添加培地では反って菌数の増大が認められた。図4は巨大菌における正常な細胞分裂の加速と菌体密度上限の打破を意味する。レアメタルの中でも、Dyを含むレアアース(ランタノイド族)とバイオとの接点は特に希薄な今日の状況下において、本件はまさに微生物学上の重要な発見に繋がる可能性を秘めている。PGA増産性はDy特異的であったのに対し、かかる増殖促進効果はDy以外のランタノイド族(Hoなど)でも認められるという最新知見によれば、より普遍的かつ生命現象の根幹にも触れる可能性、微生物学の新たな地平を開く可能性さえある。地球生命の大半が、既存技術では培養困難な微生物で占められている。メタゲノム技術の急速な進歩は、難培養性微生物の遺伝子解析の道を開いたが、依然としてその優れた機能を応用する段階には達していない。応用生物学における“難培養性”は大きな課題のままである。逆に、このような微生物群を自在に培養することができるようになれば、生物学のパラダイムシフト/産業技術のイノベーションにも繋がる。将来、地球上のあらゆる環境に超微量で存在するレアアースが難培養性解消の一端を担うことになれば面白い。

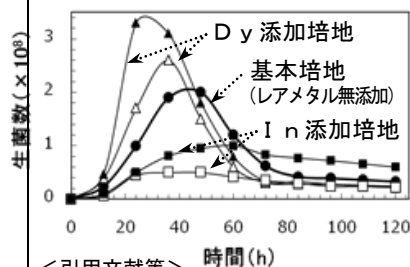


図4. 巨大菌の増殖に及ぼすレアメタルの影響  
基本培地中での生育は●で示した。レアメタルイオンの終濃度：黒塗シンボル、0.05 mM；白抜きシンボル、0.1 mM。

<引用文献等>

- ① T. Wakamatsu *et al.* Metal ion-induced expression of gene fragments from subseafloor microorganisms in the Kumano forearc basin, Nankai Trough, *J. Appl. Microbiol.* 2018年, submitted for publication.
- ② M. Ashiuchi *et al.* Novel microbial response for rare earth elements: Dysprosium-dependent stimulation in cell proliferation and poly- $\gamma$ -glutamate productivity of *Bacillus megaterium*, 2018年, in preparation.

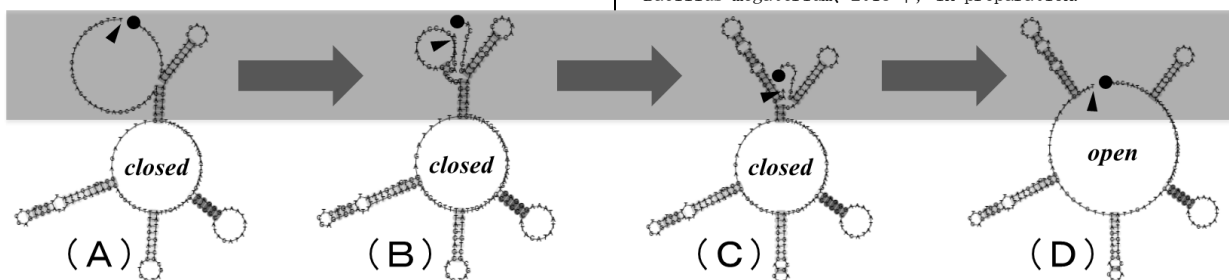


図3. 巨大菌Cap/5'-UTRのP2プロモータから転写される推定mRNAの高次構造分析

全長は261nt。そのうち、CapORFから遡って238nt上流までの塩基配列について分析した。なお、さらに上流を含めても事実上(D)と同一であることが分かっている。●, CapORFから31nt上流の塩基(-31); ▶, (A)-233; (B)-234; (C)-237; (D)-238。1塩基の増減で著しく高次構造を変化させる可変領域(ホットスポット)を灰色で影付けした。結合エネルギー計算から(A)=(B)>(D)>(C)の順に安定; また、Closed spaceの存在はリボスイッチ機能発現に重要とされる。

③ *Nucleic Acid Res.* **36** (2008) D93; ④ *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 11353; ⑤ *Nat. Prod. Rep.* **30** (2013) 1087

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

① M. Ashiuchi et al. (5人中1番目)、Engineering antimicrobial coating of archaeal poly- $\gamma$ -glutamate-based materials using non-covalent crosslinkages, *Sci. Rep.*、査読あり、8巻、4645、2018年  
DOI : 10.1038/s41598-018-23017-x

② M. Ashiuchi et al. (10人中9番目)、Archaeal MutS5 tightly binds to Holliday junction similarly to eukaryotic MutS $\gamma$ , *FEBS J.*、査読あり、284巻、3470-3483頁、2017年  
DOI : 10.1111/febs.14204

③ M. Ashiuchi et al. (8人中7番目)、Structural insights into L-tryptophan dehydrogenase from a photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*, *Appl. Environ. Microbiol.*、査読あり、83巻、e2710-16、2016年  
DOI : 10.1128/AEM.02710-16

④ M. Ashiuchi et al. (4人中4番目)、Effective elimination of water-borne *Escherichia coli* using archaeal poly- $\gamma$ -glutamate-based materials, *AIMS Microbiol.*、査読あり、2巻、222-229頁、2016年  
DOI : 10.3934/microbiol.2016.3.222

⑤ M. Ashiuchi et al. (3人中3番目)、Cooperative adsorption of critical metal ions using archaeal poly- $\gamma$ -glutamate, *BioMetals.*、査読あり、29巻、527-534頁、2016年  
DOI : 10.1007/s10534-016-9928-2

⑥ M. Ashiuchi et al. (7人中1番目)、Poly- $\gamma$ -glutamate-based materials for multiple infection prophylaxis possessing versatile coating performance, *Int. J. Mol. Sci.*、査読あり、16巻、24588-24599頁、2015年  
DOI : 10.3390/ijms161024588

⑦ M. Ashiuchi et al. (5人中1番目)、Rapid purification and plasticization of D-glutamate-containing poly- $\gamma$ -glutamate from Japanese fermented soybean food *natto*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*、査読あり、116巻、90-93頁、2015年  
DOI : 10.1016/j.jpba.2015.01.031

⑧ M. Ashiuchi et al. (3人中3番目) / Extra-chromosomal DNA maintenance in *Bacillus subtilis*, dependently of flagellation factor Flif and moonlighting mediator EdmS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読あり、460巻、1059-1062頁、2015年  
DOI : 10.1016/j.bbrc.2015.03.152

### 〔学会発表〕(計 56 件)

① 芦内 誠ほか、ホモキラルポリ $\gamma$ -グルタミン酸によるレアメタル協同吸着現象の熱応答挙動、生命科学系学会(合同年次大会)、2017.12.6-9、兵庫県・神戸市

② 芦内 誠ほか、基質誘導遺伝子発現解析法を用いた南海トラフ海底下コア試料からの金属イオン応答遺伝子の取得、環境微生物系学会(合同年次大会)、2017.8.29-31、宮城県・仙台市

③ 芦内 誠ほか、アーキア由来機能未知 MutS ホモログ MutS5 の DNA 結合特異性解析、日本農芸化学会(中四国支部例会)、2017.6.17、徳島県・徳島市

④ M. Ashiuchi et al.、Screening of metal-ion inducible genes from subseafloor sediments of Nankai Trough using substrate-induced gene expression method、JpGU-AGU Joint Meeting 2017、2017.5.20-25、Chiba・Chiba

⑤ 芦内 誠、“ホモキラルポリ $\gamma$ -グルタミン酸”生合成装置の分子解析と微生物工学利用、日本農芸化学会(産学官学術フォーラム;受賞講演)、2017.3.19、京都府・京都市

⑥ M. Ashiuchi et al.、Cooperative adsorption for critical metals using stereo-regular poly- $\gamma$ -glutamate, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016)、2016.12.13-16、Fukuoka・Fukuoka

⑦ 芦内 誠ほか、ジスプロシウムで惹起される巨大菌の

ポリ $\gamma$ -グルタミン酸増産現象と関連遺伝子分析、日本生物工学会(年次大会)、2016.9.28-30、富山県・富山市

⑧ 芦内 誠ほか、最先端技術を用いた深海底微生物の生態解明 ~SIGEXを用いたレアメタル応答遺伝子の同定など~、D-アミノ酸学会(年次大会) / 日本農芸化学会(中四国支部例会) 合同シンポジウム [環境・ひと・微生物]、2016.9.15、高知県・高知市

⑨ 芦内 誠ほか、ディスプレイシウムに対する新たな微生物応答:増大する生育速度と D-グルタミン酸含有ポリ $\gamma$ -グルタミン酸の合成、日本分子生物学会/日本生化学会(合同年次大会)、2015.12.1-4、兵庫県・神戸市

⑩ 芦内 誠ほか、深海底コア試料を用いた SIGEX 法によるレアメタル応答遺伝子の網羅的探索と解析、日本農芸化学会(中四国支部大会)、2015.9.17-18、愛媛県・松山市

ほか46件(うち、国際会議4件)

### 〔図書〕(計 2 件)

① 若松泰介、(旬)中島出版、未来の資源に向かって—高知大学におけるレアメタルをキーワードとして研究について—、82-87頁、2018年

② 芦内 誠、(旬)中島出版、未来の資源に向かって—高知大学におけるレアメタルをキーワードとして研究について—、88-93頁、2018年

### 〔産業財産権〕

#### ○出願状況(計 3 件)

① 発明者、芦内 誠、白米優一;権利者:高知大学;種類、特許;番号、特願 2017-55221;出願日、2017年3月22日;対象、国内;名称、静電複合体およびオルガノゲル

② 発明者、芦内 誠、白馬弘文、柴谷滋郎、小林久人;権利者、高知大学、東洋紡;種類、特許;番号:PCT/JP2016/51173;出願日、2016年1月15日;対象、国際;名称、耐水耐有機溶媒性組成物

③ 発明者、芦内 誠、白米優一;権利者、高知大学;種類、特許;番号、特願 2015-220305;出願日、2015年11月10日;対象、国内;名称、ポリ $\gamma$ -グルタミン酸生産菌の培養方法およびポリ $\gamma$ -グルタミン酸の製造方法

#### ○取得状況(計 1 件)

① 発明者、芦内 誠、大矢遥那;権利者、高知大学;種類、特許;番号、JP5822273;取得日、2015年10月16日;対象、国内;名称、生分解性ハイドロゲルおよびその製造方法

### 〔その他〕

ホームページ等:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芦内 誠 (ASHIUCHI, Makoto)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号:20271091

### (2) 研究分担者

若松泰介 (WAKAMATSU, Taisuke)  
高知大学・教育研究部総合科学系・講師  
研究者番号:60597938

### (3) 連携研究者

稲垣史生 (INAGAKI, Fumio)  
独立行政法人 海洋研究開発機構・高知コア研究所・上席研究員(研究所長代理)  
研究者番号:50360748

### (4) 連携研究者

諸野祐樹 (MORONO, Yuki)  
独立行政法人 海洋研究開発機構・高知コア研究所・主任研究員  
研究者番号:30421845

### (5) 研究協力者

白米優一 (HAKUMAI, Yuichi)  
愛媛大学・連合農学研究科・博士課程  
日本学術振興会 特別研究員・DC2