

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2017～2020
 課題番号：17H03796
 研究課題名(和文) 環境適応因子ホモキラルポリ グルタミン酸のレアアース依存増産機構の解明と応用"

研究課題名(英文) Molecular Mechanism and Applications of Rare Earth Elements-Dependent Stimulation in Microbial Production of Stereo-Regular (Homochiral) Poly-gamma-Glutamate as Novel Extremolyte-Like Materials

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) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：巨大菌と納豆菌のPGA合成遺伝子発現制御を担う非翻訳領域に着目した計算化学分析を進めてきた。巨大菌には、グローバルレギュレーターの中でも最上位に位置するDegU認識部位と近接するリボスイッチ様構造を含む特殊な塩基配列が存在する。そこで、該調節領域(Cap/5'-UTR)の高次機能や構造に対するレアアースの影響(減衰機構の解除や重希土元素に対する選択性等)を精査するため、阻害PCR法を考案した。また、DegUについては「ゲルシフトアッセイ」で解析を進めた。結果、非生物的金屬種(Dy)と翻訳後修飾された該タンパク質(DegU~P)の組み合わせで特定のDNA配列との結合挙動が制御されることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

堆肥から深海底までの地球環境に高度の適応した土壌細菌“巨大菌”にレアアース(特にジスプロシウム)を与えつつ培養すると、優位に増殖速度が増加することに加え、PGAと呼ばれる有用バイオポリマーの生細胞当たりの生産能まで増大するという画期的な応答現象を発見した。レアアースは重金属であることから、生物応答に関しては毒性や代謝抑制ありきの解析に焦点が絞られる中、本発見は生物と重金属の新たな接点に焦点を当てる千載一遇の機会と理解した。本研究成果は遺伝子発現制御を司る新たな構造モチーフの発見を介した基礎分子微生物学の発展に繋がるとともに、有価レアアースの高感度識別や探索に向けた応用展開にも期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting computational chemistry focusing on the untranslated regions responsible for the regulation of PGA synthesis gene expression in *Bacillus megaterium* and *Bacillus natto*, and *B. megaterium* has a special nucleotide sequence harboring a riboswitch-like structure, which is adjacent to the the global regulator (DegU)-recognition site. An inhibitory-PCR method was hence devised to examine the effects of rare earths on higher functions and structures of the regulatory region (Cap/5'-UTR) (nullification of the attenuation mechanism, selectivity for heavy rare earth elements, and so on). DegU was analyzed by "gel shift assay". As a result, it was found that the combination of the abiotic metal species (Dy) and the post-translationally modified protein (DegU-P) controls the binding behavior with a specific DNA sequence.

研究分野：応用分子微生物学

キーワード：超広域環境微生物 環境適応因子 ポリ グルタミン酸 レアメタル(レアアース) バイオロジー バイオツール化

1. 研究開始当初の背景

微生物は肉眼では見ることのできない微小な生物であるが、地球上のほとんどあらゆる環境に生息し、地球環境や私たちの生活と密接な関わりをもっている。熱水が噴出する海底の高温環境、極地等の低温環境、深海のような高圧/貧栄養環境、塩湖のような高塩環境等、極限的な環境にも微生物は適応している。地球外生命探索のモデルにもなりそうな、いわゆる極限環境微生物の適応戦略を深く理解し、新たな産業応用にまで繋げることへの期待は大きい。

芦内らは、陸域の土壤環境から深海底の堆積物、さらにその下の深部に至るまでの広域かつ多様な環境に生息する微生物の適応戦略について調査を始めた。便宜上、このような微生物を“超広域環境微生物”と呼ぶ。調査開始時から関心を持っていたのがコンポスト菌として有名な「巨大菌(図1)」である。該微生物は堆肥という有機物過多の“超富栄養環境”への適応性を示す一方で、深海底微生物としても頻繁に見つかることが分かっていた。深海底は陸域に比べて明らかに有機物が少なく、無機物が勝る“超貧栄養環境”とされている。最近、“レアメタル”と呼ばれる我が国の産業上極めて重要な金属種が深海底に豊富に存在することが判明し、レアメタルと微生物生理学との関連性にも光が当たるようになってきた。超広域環境微生物“巨大菌”には、富栄養環境下でも貧栄養環境下でも適応できるように働く未知の応答(言い換えれば、分子スイッチング)機構が存在している可能性があった。

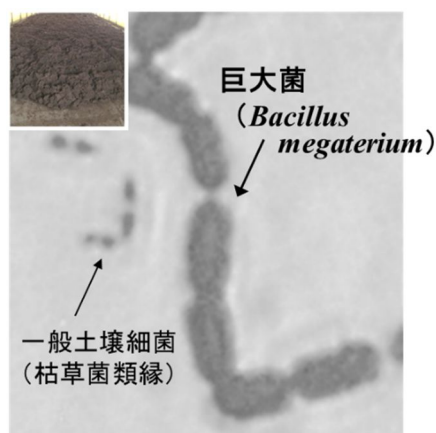


図1. 堆肥の写真と巨大菌の顕微鏡イメージ

2. 研究の目的

農場堆肥から深海底堆積土壌にも及ぶ多様な環境に生息する超広域環境微生物「巨大菌」は、新たな環境適応因子として注目されるホモキラルポリ グルタミン酸(PGA)を生産する。最近、有価金属のレアアースに属するジスプロシウム(Dy)を少量加えるだけで、2倍以上の増産が可能という画期的な成果を得た。レアアース依存の遺伝子発現機構に関する知見が皆無に近い現状を鑑み、本研究では新たに見いだされたPGA増産現象を足掛かりとして、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の解明を目指す。また、先例のない特色を備えた遺伝子発現調節機構の分子レベルでの解析が進めば、それを利用した独創的な応用技術の創出/展開まで見えてくる。ここで明らかにされた基盤知見を環境調和指向のレアメタル回収/高感度検出新技术などに応用することでバイオ産業の発展にも貢献できるものと期待される。

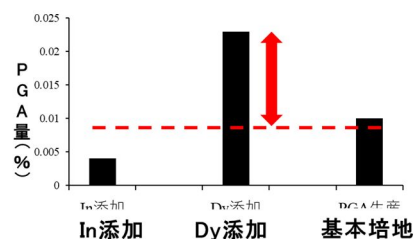


図2. Dy添加によるPGAの増産

3. 研究の方法

(1) 阻害PCR法: 巨大菌染色体DNA (25 ng; 染色体DNA使用量の厳密化)を鋳型に各種プライマーDNA (50 nM; プライマーDNA濃度の厳密化)を用いるPCRを企画した。その際、既定した温度変動条件(94 / 30 sec 56 / 30 sec 72 / 30 sec)のもと、30サイクル固定で実施した。また、標準金属イオンとして1.5 mM Mg²⁺を添加した。さらに、種々のレアアースイオンを追加する条件(10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷, 10⁻⁹ mM)を設定し、本反応に対する各々の影響について調査した。PCRとは二本鎖DNA特有の熱力学特性を応用した反応で、一本鎖DNAへの変性プライマーDNAの結合(アニーリング)DNAポリメラーゼによるDNAの複製プロセスを繰り返すことにより標的DNA断片を天文学的な数値に増幅させることができるとされる。その成立を重要なキーププロセスがアニーリングであり、なかでもプライマーDNAの塩基配列における3'末端領域の結合不良は標的DNAの致命的な増幅阻害に繋がるということが分かっている。それ故、プライマーを設計する際、非常に大きな結合エネルギーを持つとされる二次構造領域の塩基配列は採用しない(できない)のが通念化していた。本件はPCR法の本質的な弱点を逆手にとった独創的な分析技術という位置づけにある。さて、巨大菌PGA合成オペロン(cap)の上流に位置し遺伝子発現調節に

名称	配列(5' 3')
F0_Bm_-909	TTGTTTTCTCCTTTTGGATGA
F1_Bm_-242	TTTGAGCTATTGACCACTAAT
F2_Bm_-243	ATTTGAGCTATTGACCACTAA
F3_Bm_-246	AACATTTGAGCTATTGACCAC
F4_Bm_-247	TAACATTTGAGCTATTGACCA
F5_Bm_-248	ATAACATTTGAGCTATTGACC
R0_Bm_-51	GTTGGATACGTTATGAATGC

関与する「非翻訳調節領域(5'-UTR)」に特化した塩基配列分析を進めた結果、該capの31塩基上流(-31)から247塩基上流(-247)にわたる計237塩基の領域で大きな結合エネルギーが算出され、二次構造(ループ)が安定的に形成されること(ただし、72の条件下で進行するDNA複製プロセスにおいては速やかに二次構造が解除されるものと推定)が計算化学上でも予測された。本実験では、配列設計された上述7種類のプライマーを使用した。例えば、F0_Bm_-909の場合、該capの909塩基上流(-909)が3'末端塩基に相当することを示している。なお、リバースプライマーを一種類に固定することでフォワードプライマー配列のわずかな違いが標的DNAの増幅率にどのように影響するかに焦点を当てて観察できるように計画した。PCR完了後、アガロースゲル電気泳動に供した。泳動結果をデジタル化し、はじめにマーカーDNAs(100~20000bp)の蛍光強度と使用量(ng)から二本鎖DNA断片の検量線を作成した。次いで各種PCR産物の増幅量を算出した。標準的なPCRによる定量的な増幅(二次構造領域を含む910塩基対のDNA断片)が確認されたプライマーの組み合わせ「F0_Bm_-909×R0_Bm_-51」での正味の増幅率を100と定義した。阻害PCR法を基本とする予備実験によれば、「F5_Bm_-248×R0_Bm_-51」による増幅率は「F0_Bm_-909×R0_Bm_-51」のそれと類似する数値であったことから、248塩基上流からのPCRの場合、二次構造の形成による増幅阻害(以後は「減衰」と呼ぶ。)は発生しないことを示唆している。一方、より内側(242~247塩基上流)に位置する塩基配列をフォワードプライマーに配置した場合、明確な減衰現象が確認され、例えば、その効果が最も顕著に現れた「F2_Bm_-243×R0_Bm_-51」での増幅率は「F0_Bm_-909×R0_Bm_-51」に比べ、30%以下にまで減衰することが判明した。そこで、本件の阻害PCR法は「F2_Bm_-243×R0_Bm_-51」の組み合わせで実施することにした。

(2) DegS・DegUタンパク質の精製: 以下に示すプライマーDNAの組み合わせに基づいてPCRを実施した。巨大菌染色体DNAを鋳型にdegS及びdegU遺伝子を増幅した。各々を大腸菌pET系ベクターに連結後、大腸菌JM109に形質転換した。次いで終濃度0.1mMになるようにIPTGを加え、各タンパク質を発現させた。発現後の菌体破砕液をヒスタグラムに供しワンポットで精製した。

増幅遺伝子	プライマーの組み合わせ
degU	BMD_5108_F / BMD_5108_R2
degS	BMD_5109_F / BMD_5109_R2

名称	配列	融点(°C)	mer
BMD_5108_F	TATACATATGCAGACAAGAATTATCATAATCGACGATCACC	61	41
BMD_5108_R2	TATACTCGAGTCTTACTTCTACCCAACCGTTTTTGATTGCCAC	62	43
BMD_5109_F	TATACATATGTCGAAACATAAATTAACAAGTAAGGCACTTGATGAAATTTTTG	62	53
BMD_5109_R2	TATACTCGAGAGCGGCTATAATCGGTACTTTAATCATAACAAGCG	62	45

(3) DegUのリン酸化: 先行論文(Thi-Huyen Do, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8249-8258 (2011))を参照した。具体的には、DegUを基質タンパク質とし、そのリン酸化酵素であるDegSとATPを加え、28°Cで30minのインキュベーションにより、リン酸化DegU(DegU~P)を形成させた。

(4) ゲルシフトアッセイ: EMSA(ゲルシフト)標準緩衝液に対して(ゲルシフトアッセイには影響しないクエン酸緩衝液で可溶化した)Dy、標的配列を有するPCR増幅DNA断片(50ng; 使用量の厳密化)並びにDegU(あるいはDegU~P)タンパク質を添加し、全量で160µLになるように調製した後、28°C・30minのインキュベーションに供した。なお、標的DNA使用量の厳密化を図りつつ、一方でDyとDegUの濃度を変化させることにより、各々の効果についての理解を深めようとした。今回、100Vで電気泳動した後のゲルをSYBR染色に供した。

4. 研究成果

(1) 超広域環境微生物「巨大菌」特有の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)条件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)で、かつ海水にも匹敵する高塩条件に曝すと、一転して「ポリグルタミン酸(PGA)」を作り始める。本件は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、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い。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抑制的に働いたためと思われる。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)。ただし、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関しても不明であった。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的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ものの、それ以外の微生物が作るPGAに関しては「環境適応因子」

としての役割が知られるようになった。故に、巨大菌の P G A 合成が D e g U 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。D e g U の構造生物学によれば、その実体は金属非依存タンパク質であることが示される中、芦内らは微量の D y を添加するだけで 2 倍以上の P G A の増産に成功する等、画期的な研究成果を示してきた。因みに、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、実際に達成された増産率は元株の 1.3 倍にも満たない。そこで巨大菌には未だ発見に至っていない金属（レアアース）感知バイオシステムが眠っているとの仮説の下、非翻訳調節領域（5'-UTR）の特殊構造予測を進めた。結果、D e g U 認識部位と第 2 プロモータを含む - 2 6 1 塩基（n t）までの配列に新規のアテニュエータ、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」の存在を発見するに至った（図 4）。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、m R N A に限定されず、一本鎖 D N A でも生じる。芦内らは P C R 法の根本的な原理に着目した。具体的には、変性からアニーリングにまでの過程で鑄型一本鎖 D N A 分子内での二次構造形成の方がプライマー D N A との結合よりも早く起こる場合を想定し、P C R 産物量の減衰を指標とする「阻害 P C R 法」を新たに考案し、今回の分析調査に利用した。次に、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、二次構造の起点となる塩基配列の分析を進めた。

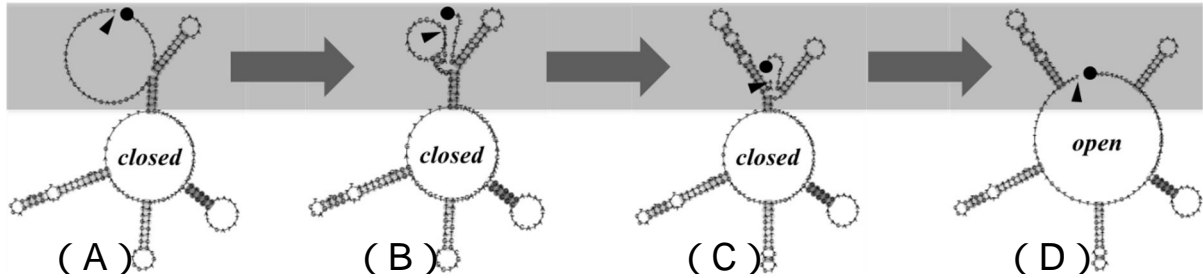


図 4. 巨大菌 Cap / 5'-UTR の P2 プロモータから転写される推定 mRNA の二次構造分析

全長は 261nt. そのうち、CapORF から遡って 248nt 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) -242; (B) -243; (C) -246; (D) -247. 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。

(2) 阻害 P C R 法を利用した新規レアメタル応答機構の分子解析: 図 4 に示した通り、巨大菌 C a p 上流の 5'-U T R にはアテニュエータとして働きうる二次構造の形成が強く示唆された。一方、これまでの巨大菌 P G A 研究によれば、重金属 (D y 等) による未知の増産メカニズムが存在するという仮説が立証されるのもそれほど遠くないことが示されてきた。今回の研究では、D y を含むレアアース (ランタノイド) イオン 14 種にバイオメタルとしての機能が明らかになっているマンガン ($M n^{2+}$) とコバルト ($C o^{2+}$) を加えた計 16 種のレアメタルを対象に、阻害 P C R (上記 3-(1) を参照) に対する効果 (影響) について調査した。また、標的 D N A 断片の正味の増幅率を評価基準とし、増幅率が半減以下で「- (減衰機構の増強)」、倍増以上で「+ (減衰機構の解除)」と判定することにした。一方、半減・倍増のいずれにも到らない場合、便宜上、「± (影響なし)」と表記することにした。以下、阻害 P C R に与える各種金属イオンの効果をまとめた。本結果に従えば、D y の外、プラセオジウム (P r) とイッテルビウム (Y b)

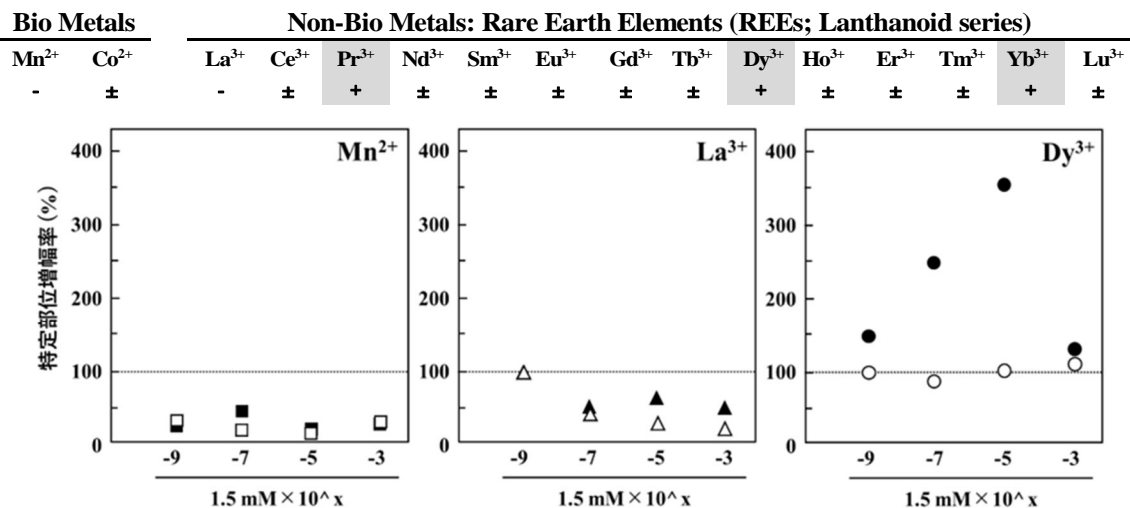


図 5. 阻害 P C R の応用展開: 「D y 特異的」高感度検出法及び定量分析法の確立

白抜きシンボルはプライマー D N A 「F0_Bm_-909 x R0_Bm_-51」の組み合わせで実施した標準 P C R に対するレアメタルイオン添加の効果を分析したデータ、黒塗りシンボルはプライマー D N A 「F5_Bm_-248 x R0_Bm_-51」の組み合わせで実施した阻害 P C R に対するレアメタルイオン添加の効果を分析したデータを示している。以上の結果は、M n と L a に認められた減衰効果が P C R 反応、より具体的には、D N A ポリメラーゼへの直接的な阻害効果が主因であることが強く示唆された。他方、D y をはじめ、今回対象としたレアアース種の酵素活性自体に対する影響は皆無、若しくは限定的との結論に達した。

でも「巨大菌 Cap 上流の 5'-UTR で発生する減衰機構」の解除とそれに伴う P G A の増産に期待が持てることを意味している。一方、元素化学的に似通った性質を示す「ランタノイド」に対して明確な化学的選択性を示す P C R 条件を発見できたことは技術展開の観点からも重要で、例えば、有価レアアースの高感度検出法や未開拓資源の探索技術への応用(図5)が期待される。

(3)ゲルシフトアッセイによる該レアメタル応答機構の分子解析: 図6にゲルシフトアッセイも結果をまとめた。上段の実験結果は、リン酸化されていない Deg U タンパク質 (0 ~ 1.6 μM) を用いた場合、Dy 濃度 (0 ~ 10 mM) を変化させてもゲルシフト効果を与えないことを意味し、その状態では標的 DNA 配列と結合できないものと示唆された。そこで、リン酸化処理後の Deg U タンパク質 (Deg U ~ P) で再試験を行った。結果、下段の通り、Dy 存在下で Deg U ~ P は標的 DNA 配列に対してゲルシフト効果を与えることが判明した。これまで非生物性金属種とされてきたレアアースイオン(本件では、Dy)と翻訳後修飾された制御タンパク質(本件では、Deg U ~ P)の組み合わせで特定の DNA 配列との結合性が制御されていることを示す(世界的にも先例のない)画期的な成果を得ることができたと考えている。

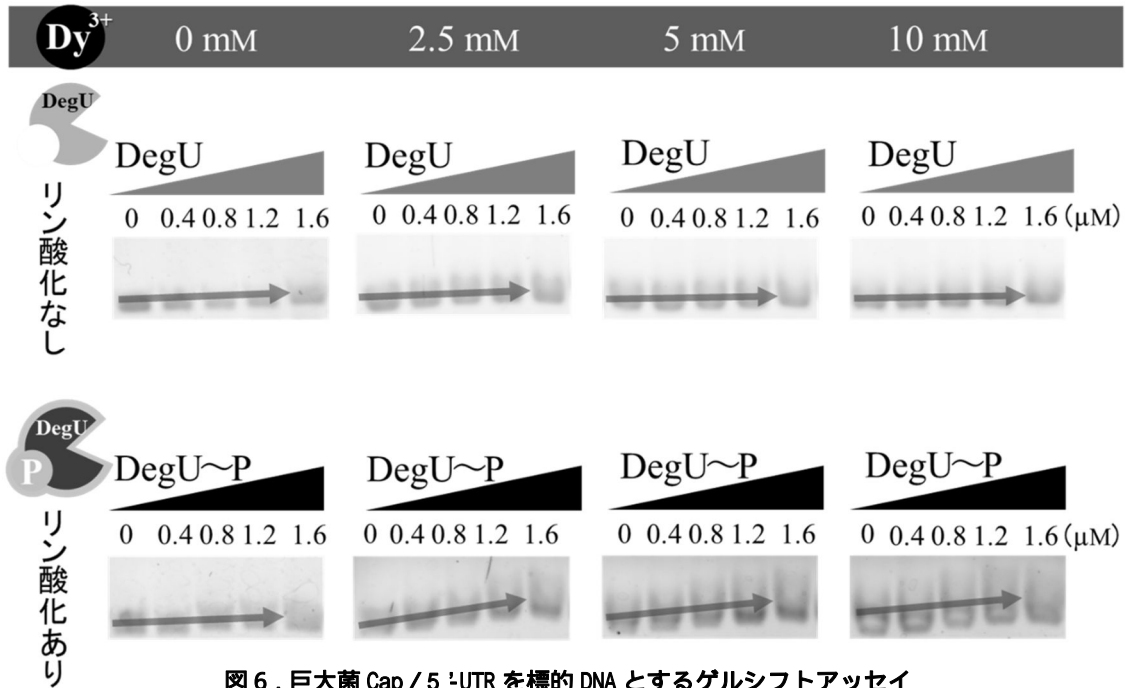


図6. 巨大菌 Cap / 5'-UTR を標的 DNA とするゲルシフトアッセイ

今回の研究成果を受け、遺伝子発現制御機構に新たな概念を持ち込む必要があると考えている。例えば、金属生物学や生化学の分野では制御因子や酵素のような「タンパク質」性の高分子との機能的相互作用を分子解析の基本に置く一方、発展めざましい核酸生化学においては「RNA」に傾倒したリボスイッチが今日的な主役といっても過言ではない。ただし、セントラルドグマの最上位に位置する「DNA」に「タンパク質」や「RNA」にも匹敵する「動的」発現制御機構が潜んでいる可能性を否定するには至っていない。

本件は非生物学的とされてきた金属種が介在することで調節機構が成立する「デオキシリボスイッチ」の存在を予言した最初の報告になると考えている。今後、「デオキシリボスイッチ」にあたるバイオ装置(図7)の精密構造分析等を通じ、構造生物学とレアメタルバイオロジーの境界融合的な研究がさらに加速すると思われる。

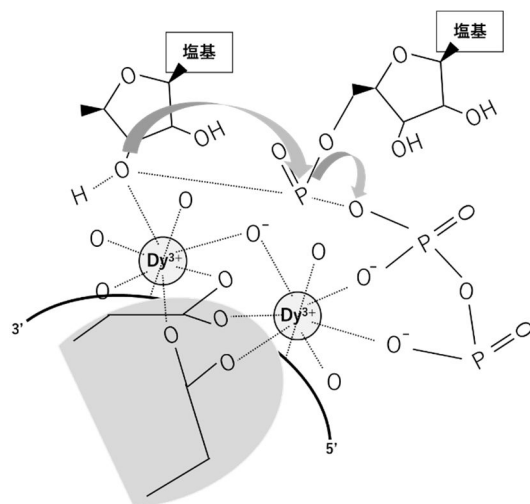


図7. DNA塩基とDyの間で形成可能な「正八面体型錯体」の推定構造

DNAは配列依存的な二次構造形成能や金属イオンに特異的な結合能を有している。これらの機能的相互作用を介して自身の分子構造を動的に変化させている可能性が高い。DNAの潜在機能に対する理解の深化がもたらす新奇な遺伝子発現調節装置を「デオキシリボスイッチ」と呼ぶ。セントラルドグマの最上位に位置するDNAの高次構造変化に起因するため、複製や転写といった生命活動の根幹にも今回の仮説は影響する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 白米優一, 芦内 誠	4. 巻 36
2. 論文標題 アーキアポリ グルタミン酸の新用途開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 27-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Wakamatsu, Y. Morono, T. Futagami, T. Terada, S. Nishikawa, T. Morisawa, K. Ohshita, F. Inagaki, M. Ashiuchi	4. 巻 125
2. 論文標題 Metal ion-induced expression of gene fragments from subseafloor microorganisms in the Kumano forearc basin, Nankai Trough	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1396-1407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.14061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Fukui, A. Harada, T. Wakamatsu, A. Minobe, K. Ohshita, M. Ashiuchi, T. Yano	4. 巻 592
2. 論文標題 The GIY-YIG endonuclease domain of Arabidopsis MutS homolog 1 specifically binds to branched DNA structures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 4066-4077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Minobe, K. Fukui, H. Yonezu, K. Ohshita, S. Mizobuchi, T. Morisawa, Y. Hakumai, T. Yano, M. Ashiuchi, Taisuke Wakamatsu	4. 巻 75
2. 論文標題 Biochemical characterization of mismatch-binding protein MutS1 and nicking endonuclease MutL from a euryarchaeon Methanosaeta thermophile	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Ashiuchi	4. 巻 35(3)
2. 論文標題 Microbial control using engineered poly- -glutamate-based materials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn. J. Food Microbiol.	6. 最初と最後の頁 116-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohshita Koki, Fukui Kenji, Sato Mizuki, Morisawa Takashi, Hakumai Yuichi, Morono Yuki, Inagaki Fumio, Yano Takato, Ashiuchi Makoto, Wakamatsu Taisuke	4. 巻 284
2. 論文標題 Archaeal MutS5 tightly binds to Holliday junction similarly to eukaryotic MutS	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3470 ~ 3483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ashiuchi Makoto, Hakumai Yuichi, Nakayama Sawami, Higashiuchi Haruna, Shimada Kosuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Engineering antimicrobial coating of archaeal poly- -glutamate-based materials using non- covalent crosslinkages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4645 [1-9]
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23017-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計55件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 A.Yoshida, T.Wakamatsu, T.Morisawa, T.Terada, S.Ishii, F.Inagaki, M.Ashiuchi, Y.Morono
2. 発表標題 Screening of Methane-, Acetate-, or Manganese-inducible Genes from Subseafloor Sediments of the South Pacific Gyre (SPG) Using Substrate-induced Gene Expression (SIGEX) Method
3. 学会等名 A S M E 2 0 1 9 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美濃部亜衣, 大下紘貴, 福井健二, 武村政春, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 巨大ウイルス由来 R3Hドメイン含有 3'-5'エキソヌクレアーゼの生化学的機能解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会 / 日本細胞生物学会・合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白米優一, 山内七海, 芦内 誠
2. 発表標題 イオンコンプレックス化技術を利用したポリ グルタミン酸の効率的な回収技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会・年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M.Ashiuchi, Y.Hakumai
2. 発表標題 Molecular identification and biochemical analysis of archaeal machinery in poly- -glutamate synthesis
3. 学会等名 日本生化学会・年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦内 誠, 白米優一
2. 発表標題 アーキアのポリ グルタミン酸合成装置：分子同定と生化学分析
3. 学会等名 日本生化学会・年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦内 誠, 白米優一
2. 発表標題 機能性ポリ- -グルタミン酸イオンコンプレックス
3. 学会等名 高分子学会・第68回高分子討論会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M.Ashiuchi, Y.Hakumai
2. 発表標題 Transforming archaeal poly- -glutamate into functional plastics, including engineered antimicrobial coatings
3. 学会等名 I C B P 2 0 1 9 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝淵早紀, 若松泰介, 寺田武志, 芦内 誠, 諸野祐樹
2. 発表標題 嫌気条件下での基質誘導性遺伝子発現解析法を用いた海底下微生物由来機能性遺伝子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会・中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美濃部亜衣, 福井健二, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 アーキアにおけるDNAミスマッチ修復の分子機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会・中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田真帆, 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 巨大菌のポリ グルタミン酸合成調節領域
3. 学会等名 日本農芸化学会・中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 今注目の腸内細菌 Akkermansia muciniphila について
3. 学会等名 第459回ビタミンB協議会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Hakumai, S. Nakayama, H. Higashiuchi, M. Ashiuchi
2. 発表標題 Development of archaeal poly- γ -glutamate-based antimicrobial coating materials
3. 学会等名 日本生物物理学会中国四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 バイオベースオルガノゲルの創製とその新たな可能性
3. 学会等名 高分子学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 オルガノゲル化能を有する機能性新素材 P E L I C の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ グルタミン酸のイオンコンプレックス化における「協同性」の発見
3. 学会等名 ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 中山沢水, 東内遥菜, 芦内 誠
2. 発表標題 抗菌素材 “ P G A I C ” の生成機構分析とオンサイトコーティングへの応用
3. 学会等名 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 立体規則性ポリ グルタミン酸のイオンコンプレックス化
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 中山沢水, 東内遥菜, 島田幸育, 芦内 誠
2. 発表標題 アーキア由来ポリ グルタミン酸の実用材料化
3. 学会等名 高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 松村歩梨, 芦内 誠
2. 発表標題 巨大菌レアメタル依存的応答因子の探索と機能性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ リジンベース新素材のオルガノゲル化に必須の分子構造
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 機能性ポリ グルタミン酸イオンコンプレックス: 開発、改良、並びに応用
3. 学会等名 エコマテリアル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 超好塩アーキアに見いだされた新たなポリ グルタミン酸合成システム
3. 学会等名 ビタミンB 研究協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Hakumai, A. Matsumura, M. Ashiuchi
2. 発表標題 Novel microbial response for dysprosium and its application for polymer designing
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 美濃部亜衣, 福井健二, 米津ひとみ, 大下紘貴, 溝淵早紀, 森澤高至, 白米優一, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 Methanosaeta thermophila由来ミスマッチ結合タンパク質MutS1及びニッキングヌクレアーゼMutLの生化学的機能解析
3. 学会等名 極限環境生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川奈七, 若松泰介, 森澤高至, 溝淵早紀, 寺田武志, 稲垣史生, 芦内 誠, 諸野祐樹
2. 発表標題 嫌気条件下での基質誘導性遺伝子発現解析法(SIGEX)による海底下微生物由来機能未知遺伝子へのアプローチ
3. 学会等名 極限環境生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 極限環境微生物のポリ- γ -グルタミン酸
3. 学会等名 極限環境生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 美濃部亜衣, 大下紘貴, 福井健二, 原田明子, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 シロイヌナズナ由来MSH1 C末端GIY-YIGヌクレアーゼドメインの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保秀平, 大下紘貴, 福井健二, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 巨大ウイルスが持つR3Hドメイン含有推定上エキソヌクレアーゼ MIMI_R431 の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下紘貴, 美濃部亜衣, 福井健二, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 巨大ウイルス由来推定上DNAミスマッチ修復酵素MutS7の生化学的機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝淵早紀, 若松泰介, 森澤高至, 西川奈七, 寺田武志, 稲垣史生, 芦内 誠, 諸野祐樹
2. 発表標題 海底下微生物遺伝子を対象とした基質誘導性遺伝子発現解析法(SIGEX)による基質応答解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田隼平, 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ リジンベースオルガノゲル
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 左々玲奈, 佐藤あゆみ, 福永 愛, 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 超好塩アーキアのポリ グルタミン酸合成遺伝子
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内七海, 白米優一, 尾池翔太, 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ グルタミン酸の効率回収に向けた検討
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 “ ホモキラルポリ- -グルタミン酸 ” 生合成装置の分子解析と微生物工学利用
3. 学会等名 日本農芸化学会大会（産学官学術交流フォーラム）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 納豆菌由来 グルタミル加水分解酵素：構造と機能、その応用
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦内 誠, 白米優一, 福永 愛
2. 発表標題 極限環境微生物の新奇ホモキラルポリ- -グルタミン酸合成システム
3. 学会等名 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 河本友輝, 芦内 誠
2. 発表標題 ホモキラルポリ 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
3. 学会等名 生命科学系学会 合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大下 紘貴, 福井 健二, 佐藤 瑞希, 森澤高至, 溝淵早紀, 美濃部 亜衣, 白米優一, 諸野祐樹, 稲垣史生, 矢野 貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 MutS5はHoliday junction DNAなど分岐鎖DNAと強く結合する
3. 学会等名 日本蛋白質科学会 年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 中山沢水, 東内遥菜, 芦内 誠
2. 発表標題 ホモキラルポリ グルタミン酸の高機能材料化、及びそれを利用した微生物増殖の制御
3. 学会等名 第2回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 グリーンオルガノゲルの創製と応用
3. 学会等名 日本生物工学会 大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 “ホモキラルポリ- -グルタミン酸” 生合成装置の分子解析と微生物工学利用
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第48回例会（受賞記念講演）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ リジンを基礎とするプラスチック新素材に見いだされたオルガノゲル特性
3. 学会等名 第66回高分子討論会 (依頼・指名)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ グルタミン酸イオンコンプレックスによる微生物制御
3. 学会等名 日本食品微生物学会 総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 バイオで作るキラルナイロンの先端機能材料化
3. 学会等名 日本農芸化学会 Visionary 農芸化学100 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大下紘貴, 福井健二, 佐藤瑞希, 森澤高至, 白米優一, 諸野祐樹, 稲垣史生, 矢野貴人, 芦内 誠, 若松泰介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第48回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森澤高至, 若松泰介, 二神泰基, 寺田武志, 西川聡美, 大下紘貴, 稲垣史生, 芦内 誠, 諸野祐樹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 環境微生物系学会 合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福井健二, 若松泰介, 大下紘貴, 森澤高至, 白米優一, 諸野祐樹, 武村政春, 芦内 誠, 矢野貴人
2. 発表標題 巨大ウイルスの持つDNAミスマッチ修復タンパク質
3. 学会等名 生命科学系学会 合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 東内遥菜, 芦内 誠
2. 発表標題 新素材ポリ グルタミン酸デカリニウム (PGA/DEQ) を基礎とした機能性向上に寄与する骨格構造の検討
3. 学会等名 日本生化学会中国四国支部 第58回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白米優一, 中山沢水, 東内遥菜, 芦内 誠
2. 発表標題 極限環境微生物のポリ グルタミン酸を利用した超耐久性抗菌ポリマーの創製
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuichi Hakumai, Hisaaki Nakamura, Makoto Ashiuchi
2. 発表標題 Enzymatic processing and genetic engineering for stereo-regular poly- γ -D-glutamate production
3. 学会等名 The International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Morisawa, Yuki Morono, Takeshi Terada, Satomi Nishikawa, Koki Ohshita, Fumio Inagaki, Makoto Ashiuchi, Taisuke Wakamatsu
2. 発表標題 Screening of metal-ion inducible genes from subseafloor sediments of Nankai Trough using substrate-induced gene expression method
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田幸育, 中山沢水, 白米優一, 芦内 誠
2. 発表標題 ポリ- γ -グルタミン酸イオンコンプレックスの高機能化と強靱化
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第50回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 放線菌バイオポリマー“ポリ- γ -リジン”のオルガノゲル化とその応用性
3. 学会等名 ビタミンB研究委員会 第451回記念研究協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白米優一, 山口かなえ, 芦内 誠
2. 発表標題 PGAイオンコンプレックスを利用した活性炭の効率的な除菌担体化
3. 学会等名 日本農芸化学会 大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芦内 誠
2. 発表標題 “ホモキラルポリ-γ-グルタミン酸” 生合成装置の分子解析と微生物工学利用
3. 学会等名 日本農芸化学会 産学官連携フォーラム（一般公開企画シンポ）（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 芦内 誠	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)技術情報協会	5. 総ページ数 6
3. 書名 ナノファイバーの製造・加工技術と応用事例: : ポリ-γ-グルタミン酸イオンコンプレックスのナノファイバー化と抗菌機能材料化	

1. 著者名 高知大学「レアメタル」プロジェクト研究研究メンバー（芦内 誠共著）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (有)中島出版	5. 総ページ数 163
3. 書名 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た研究について	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 静電複合体およびオルガノゲル	発明者 芦内 誠, 白米優一	権利者 高知大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2018-159064	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 イオン性ポリマーの製造方法	発明者 芦内 誠, 白米優一, 大岩聖佳, 石原 悠	権利者 高知大学, 出光 興産(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-060980	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>生体高分子がつなく未来 - バイオ新素材の最前線 http://www.kochi-u.ac.jp/seimei/pickup/610_912.html</p>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------