

# ミッション5：「高品位生存圏」

## 5-1) 人の健康・環境調和

### 1. 研究組織

サブミッション代表者：高橋けんし、杉山暁史

研究課題代表者：杉山暁史、棟方涼介、上田義勝、高橋けんし、矢吹正教

### 2. サブミッションの研究概要

本サブミッションでは、「生存圏の新領域開拓」で実施してきたテーマのうち「バイオマス由来の生体防御物質」「電磁場の生体影響」「大気質の安心・安全」に関係する研究を高品位生存圏の実現に向け発展的に継続し、人の健康ならびに環境との調和に資することを目的として研究を行ってきた。2020年度で「電磁場の生体影響」の研究を終了し、2021年度から新たに所内公募を経て「環境調和に向けた微細気泡水の利用」の課題に取り組んでいる。

### 3. 研究課題ごとの成果

#### 3.1 バイオマス由来の生体防御物質

##### 3.1.1 生理活性物質の生産機構と生物学（代表：棟方涼介）

###### 【研究概要】

脱化石資源社会における人間の健康維持や生活の質の維持向上にとって、植物が生産する多様な二次代謝産物は中心的な役割を果たすものとして大きな期待が寄せられている。特に、ヒトに対する生理活性物質は、細胞膜を透過することが機能発揮に必須であることから、化合物の脂溶性が鍵となる。そのため植物由来の脂溶性高付加価値化合物の生合成や蓄積メカニズムの解明、またこのような生産機構の生物工学的応用はいずれも重要な研究テーマである。本年度は、研究対象とする化合物群の中でもプレニル化フェノール類について、養蜂製品プロポリスの薬効成分であるアルテピリンCの新規微生物生産系の構築、及び生合成上の要となる芳香族基質プレニル化酵素の触媒機構の解析という2つのプロジェクトを進めた。

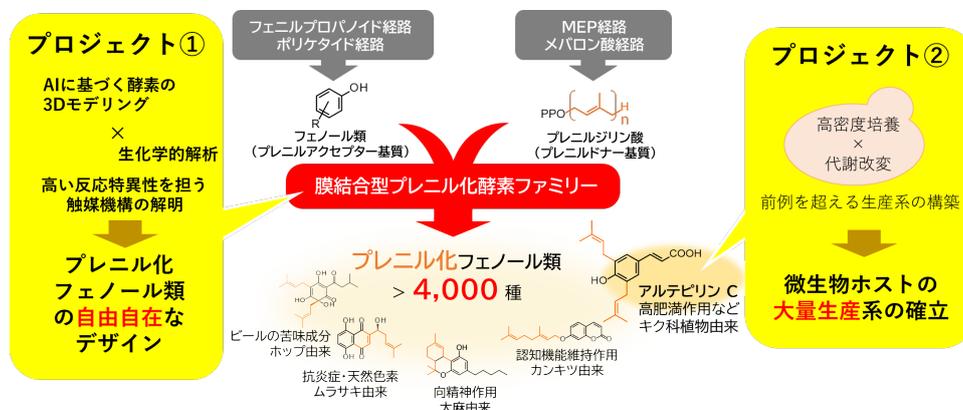


図1 高付加価値プレニル化フェノール類の創出と大量生産に関する研究成果

## 【研究の背景と目的】

植物が生産するプレニル化フェノール類は約 4,000 種に及び、この中には抗菌活性や抗ウイルス活性、また抗肥満作用など、人に有益な化合物が多く含まれる (図 1)。しかしながら、プレニル化フェノール類は現状社会で活用されていない化合物種が殆どであり、それには生産植物種における蓄積量が微量、また生産植物種自体の取得や大規模栽培が困難といった理由が挙げられる。一方、近年は有用な植物成分について、その生産の分子機構を安定生産可能な微生物に付与することで、微生物に生産させる合成生物学的な物質生産系が報告されている。そこで本研究では、プレニル化フェノール類の合成生物学的生産の基盤技術の開発を目的とした。

プレニル化フェノール類が生理活性を示すには、フェノール骨格に結合したプレニル側鎖の存在が鍵となる。この重要な反応を担うのが膜結合型プレニル基転移酵素であり、これまでに、様々な植物種から、多くのプレニル化酵素遺伝子が発見されてきた。これらの酵素機能解析から、個々のプレニル化酵素は基質認識やプレニル化部位に対して高い特異性を有することが明らかとなっていたが、この反応特異性の高さを担う触媒機構は不明であり、これが PT の機能向上・改変の障壁になっていた。そこで、① プレニル化酵素の反応特異性を担う触媒機構の解明を目指した (図 1)。また、プレニル化フェノール類の大量生産にむけては、これまでに抗肥満活性を有するアルテピリン C について、安定に生産可能な出芽酵母を宿主とした生産系の構築が報告されていたものの (Munakata et al., *Commun Biol*, 2019)、その生産性は産業利用のレベルには遠く及んでいなかった。そこで、第 2 のアプローチとして、② 高密度培養が可能というメリットを持つメタノール資化性酵母を宿主としたアルテピリン C 生産に着手した (図 1)。

## 【研究の結果および考察】

### ①プレニル化酵素の反応特異性を担う触媒機構の解明 (成果発表 1)

反応特異性の中でもプレニル基の転移位置に対する特異性が異なる 2 つのプレニル化酵素 (PsPT1 及び PsPT2) を解析対象とした。両酵素間で、ドメインレベル、次いでアミノ酸残基レベルの様々な組み合わせで交換し、キメラ酵素群を得た。これらを個々に生化学的解析に供して位置特異性を評価した結果、位置特異性に重要なアミノ酸残が見出された。さらに、3D モデリング解析によって、このアミノ酸がプレニルアクセプター基質との相互作用を介して位置特異性を制御していることが示唆された。

### ②メタノール資化性酵母によるアルテピリン C 生産系の構築 (成果発表 2)

メタノール資化性酵母 (*Komagataella phaffii*) は高密度培養が可能であり、また安価メタノールを炭素源にできるというメリットを持つ。この種に対して、プレニル化酵素を含むアルテピリン C 生合成経路の導入、各生合成段階の改良を通じて、従前の出化酵母の生産性を 10 倍以上凌駕する合成生物学的な微生物生産系を構築した。

### 【今後の展開】

プロジェクト1では、プレニル化酵素の反応特異性を担う触媒機構の一端を解明した。これは、プレニル化酵素の反応特異性を向上させる基盤的な知見となり、今後プレニル化フェノール類について不純物の少ない特異的な酵素合成が可能になると期待できる。さらに、新たな反応特異性の付与にも繋がる可能性があるため、新規生理活性物質の創出にも繋がると期待される。また、プロジェクト2で構築した微生物生産系は、アルテピリンC以外のプレニル化フェノール類の生産にも適用可能である。そのため、今後プロジェクト1で得られた知見も融合させながら生産系の改良を続けることで、アルテピリンCだけでなく多様な高付加価値プレニル化フェノール類の大量生産が可能になると期待できる。

### 【成果発表】

1. Han, J., Munakata, R., Takahashi, H., Koeduka, T., Kubota, M., Moriyoshi, E., Hehn, A., Sugiyama, A., Yazaki, K., Catalytic mechanism underlying the regiospecificity of coumarin-substrate transmembrane prenyltransferases in Apiaceae. *Plant Cell Physiol.*, in press, DOI: 10.1093/pcp/pcae134
2. Bamba, T., Munakata, R., Ushio, Y., Kumokita, R., Tanaka, S., Hori, Y., Kondo, A., Yazaki, K., Hasunuma, T. De novo production of the bioactive phenylpropanoid artemillin C using membrane-bound prenyltransferase in *Komagataella phaffii*. *ACS Syn. Biol.* 2024, 13, 4040–4049, DOI: 10.1021/acssynbio.4c00472

### 【共同研究者】

杉山暁史（京都大学 生存圏研究所）、矢崎一史（京都大学 生存圏研究所）、高橋宏暢（徳島文理大学 薬学部）アラン ヘーン（ロレーヌ大学 INRAE）、フレデリック ブルゴー（ロレーヌ大学 INRAE）、肥塚崇男（山口大学大学院創成科学研究科）、番場貴弘（神戸大学 先端バイオ工学研究センター）、蓮沼誠久（神戸大学 先端バイオ工学研究センター）

### 3.1.2 生理活性物質の輸送体の同定と有用物質生産への応用（代表：杉山暁史）

#### 【研究概要】

植物細胞等を用いた生理活性成分の生産を効率的に生産するために、輸送体を同定し、生合成系遺伝子と組み合わせて異種発現系に導入することを目指す。これまでに、ダイズ根から分泌されるイソフラボンに関して、イソフラボンの根圏への分泌に関与することが示唆されたABC輸送体の候補遺伝子をトランスクリプトーム解析から絞り込んだ。今年度は、BY-2細胞を用いた輸送体の機能解析とともに、微生物の酵素を利用した植物由来有用物質の変換にも取り組んだ。

#### 【研究の目的】

ダイズの生産するイソフラボン分泌および変換に関与する遺伝子の同定と機能解析

### 【研究の結果および考察】

イソフラボン生合成と協調的に発現する2種の ABCG タンパク質遺伝子を、イソフラボン分泌に関わる候補遺伝子とした。これらの遺伝子のうち1遺伝子を、タバコ BY2 細胞発現させ、形質転換培養細胞を作出した。細胞膜ベシクルの形成は確認されているが、輸送活性は見出されていない。一方で、今年度はダイズ根圏の微生物を用いて、植物由来イソフラボンを変換することを試みた。ミッション1の成果で記載した通り、ダイズ根圏細菌 *Variovox* sp. V35 より、イソフラボンを酸化的に代謝する遺伝子クラスターを発見した。このうち、初発酵素である IFCA は、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン等イソフラボンのアグリコンの A 環 8 位をヒドロキシ化する活性を有することが見出された。これら 8-ヒドロキシイソフラボンは、IFC クラスターの2段階目の遺伝子である IFCB を欠損する遺伝子破壊株で蓄積することが明らかになった。

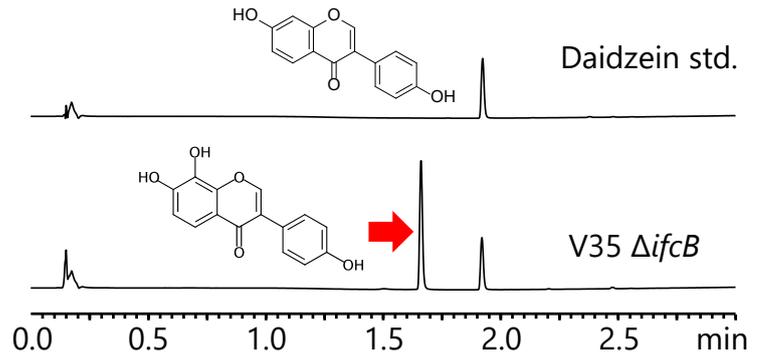


図2 IFCB 変異体での 8-ヒドロダイゼインの生産

### 【今後の展開】

輸送体遺伝子の同定を目指すとともに、微生物による変換系も活用した有用物質生産系を確立する。

### 【成果発表】

1. N. Aoki, T. Shimasaki, W. Yazaki, T. Sato, M. Nakayasu, A. Ando, S. Kishino, J. Ogawa, S. Masuda, A. Shibata, K. Shirasu, K. Yazaki, A. Sugiyama, An Isoflavone Catabolism Gene Cluster Underlying Interkingdom Interactions in the Soybean Rhizosphere, ISME Communications, 4, ycae052
2. 杉山 暁史 「根圏共生微生物の代謝機能を基盤とした相互作用育種」バイオインダストリー協会発酵と代謝研究会 2024年12月16日（招待講演）

### 【共同研究者】

土反伸和（神戸薬科大学）、青木裕一（東北大学）、永野惇（龍谷大学）

## 3.2 環境調和に向けた微細気泡水の利用（殺菌・洗浄）とその作用機序の解明（代表：上田義勝、渡邊崇人）

### 【研究概要】

殺菌や洗浄において対象となる真菌や細菌（以降、微生物とする）と微細気泡水技術との関係性においては、その活性への影響が様々に考慮されている。実用化の主な手法としては、基本的

にはオゾンガスを気泡内に導入し、オゾンの溶解度や攪拌効果を高めることで殺菌や処理の効果を促進させている例が多い。近年では、空気を利用したプラズマ殺菌法の開発が進められ、オゾンと窒素酸化物を両方生成させることで、オゾンでは十分に死滅しない芽胞菌やバイオフィルムの滅菌が可能になってきているものもある。微細気泡水利用研究のうち、特にウルトラファインバブル（UFB）についてはこれまでは気泡の特性、特に気体種別とその気泡数密度との関係性を考察したものが多かった。一方で、水としての特性も含めた考察を行う必要もあるため、本提案の中の一つの技術的解決課題の方法として、UFB と関連のある、水の特性（pH、溶存酸素、電気伝導度）との関係性について調査し、微生物との関係をより簡易に計測・検証できる手法となるかどうか、検討を行った。

### 【研究の結果および考察】

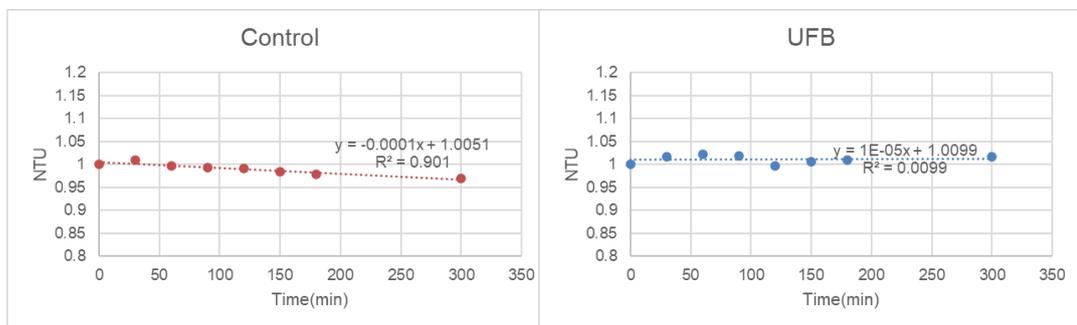


図3 微生物活性のリアルタイム計測の一例(濁度データ、左:Control としての酸素調整水、右:酸素 UFB 水)

微生物を添加した後の各サンプル水については、気泡数密度計測は微生物が不純物として混入しているため、正確に計測できなかった。一方で、微生物活性としての各パラメータ計測をおこなうことで、UFB が微生物に与える影響を評価できている。特に、図に示す様に、微生物の成長度合いとして NTU の変化が UFB と Control とで逆傾向を示すことが、溶存酸素と関係あることを容易に示せた他、水の特性として電気伝導度と連動している事は、今後の計測評価項目として重要な示唆を示している。仮説ではあるが、今回用いた微生物 (*Pseudomonas* sp. UJI-902) の大きさは顕微鏡カメラ実測にておおよそ 500 nm, UFB の大きさは 100-200nm であり、微生物の大きさは UFB と同程度の大きさであった。その結果、お互いに吸着、もしくは反発などの作用も発生するため、その結果として局所的な酸素供給や、電気的な特性変動が起こっている可能性がある。EC の変化があまりないという事は、気泡数密度変化はほとんどなかった可能性もあるため、今後より詳細なデータ計測を行っていく必要がある。

### 【今後の展開】

UFB と微生物の関係としては、特にオゾンの直接的な効果を高める研究が多い。その一方で、通常の大気や酸素を用いた UFB の効果について、より簡易でわかりやすい効果を示し、最適化条

件を示す必要もあると考えている。本計測評価の手法では、UFBの気泡数密度だけではなく、水の特性パラメータを詳細に確認することで、UFBの影響評価を示すことができた。時間的に詳細にデータを取ることで、今後よりはっきりとUFBを含めたファインバブルの可能性を示すことができると考えている。また、本提案では細菌を用いた試験方法を採用しているが、環境浄化として考える場合は真菌を用いての実験も今後行っていく必要があると考えている。

#### 【成果発表】

##### 国際会議発表

1. [Invited] Yoshikatsu Ueda, Ayana Ito, Tetsuji Okuda, Yomei Tokuda, Minoru Tanigaki, Akifumi Sugiyama, Shuichiro Kuwajima, Transdisciplinary Research on Fine Bubble Applications in Japan: Fundamentals and Innovations, Student Lecture at National Taiwan University, Dec 5, 2024
2. [Invited] Yoshikatsu Ueda, Ayana Ito, Tetsuji Okuda, Yomei Tokuda, Minoru Tanigaki, Akifumi Sugiyama, Basic Research and Applications of Fine Bubbles in Japan, Plasma and Finebubble seminar at National Yang Ming Chiao Tung University, Dec 3, 2024

##### 受賞

第2回ファインバブル産業会 学術研究奨励賞, (研究テーマ) ウルトラファインバブルを活用した種々の応用研究と作用メカニズム解明のための総合的学際研究とその主導, 令和6年(2024年)

#### 【共同研究者】

渡邊 崇人 (生存圏研究所), 徳田 陽明 (滋賀大学 教育学部), 谷垣 実 (京都大学 複合原子力科学研究所), 西崎 嘉浩, 後藤 裕 (株式会社 クレハトレーディング)

### 3.3 大気質の安心・安全 (代表: 高橋けんし、矢吹正教)

#### 【研究概要】

人の健康に深くかかわる人間生活圏における大気質(air quality)の診断方法の開拓を目的として、車載型のライダー装置の開発、および、その検証実験を実際の都市域で実施したほか、cavity-attenuated phase shift 法による都市型大気汚染の観測を行った。

#### 【研究の背景と目的】

大気微量成分、とりわけ、オゾンや窒素酸化物といった微量ガスや大気エアロゾル粒子は、大気環境への影響のみならず、ヒトへの健康影響も懸念される。我々は、人間生活圏および森林圏に近い大気の化学的動態を探查する新しい手法の開拓を目指している。

#### 【研究の結果および考察】

本課題では、都市大気汚染の動態探査を目的とした連続観測を、大阪公立大学との共同で実施している。Cavity-Attenuated Phase Shift Spectroscopy 法を用いた二酸化窒素( $\text{NO}_2$ )センサーと超音波風向風速計を大阪府堺市庁舎の屋上に設置し、渦相関法による  $\text{NO}_2$  フラックスを計測した。その結果、 $\text{NO}_2$  フラックスの日内変動が  $\text{CO}_2$  フラックスの日内変動と類似していた。また、週末と週間のフラックスの違いが、大型のディーゼル車と小型ガソリン車の走行台数の変化に対応していることが分かってきた。また、車載ライダーを用いた富士山周辺のエアロゾル鉛直分布の移動観測を継続したほか、農業や建造物への塩害の要因になる凍結防止剤の飛散状況可視化実験を北陸地方の高速道路近傍で行った。

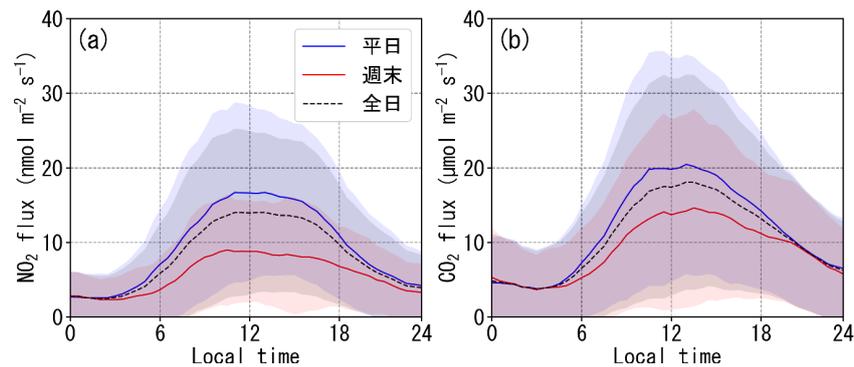


図4 堺市役所の屋上（地上 122 m）で観測された  $\text{NO}_2$  および  $\text{CO}_2$  フラックスの平日、週末、全日の変動特性

#### 【成果発表】

1. S. Okamura, M. Ueyama, K. Takahashi, " Temporal and spatial variations in  $\text{NO}_2$  fluxes by the eddy covariance measurements over a dense urban center in Sakai, Japan", *Atmospheric Environment.*, 339 (2024) 120870, doi: 10.1016/j.atmosenv.2024.120870
2. 矢吹正教, 三浦和彦, 車載ライダーを用いた山岳大気エアロゾルの立体観測, 第 42 回レーザーセンシングシンポジウム, 2024 年 9 月 12-13 日 (大阪) .