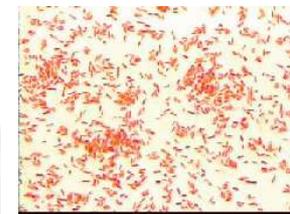


応用理数コース自然科学系 生物化学研究室 (佐藤高則准教授)

ご質問等は、tsatohアットマークtokushima-u.ac.jp まで

詳しくはWebで公開中

特殊な自然環境中微生物の環境
適応に関する遺伝子・タンパ
ク質の秘密に迫る！！



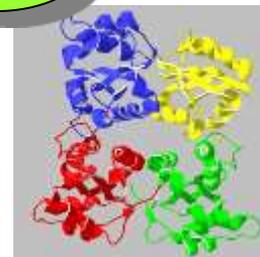
<http://www.geocities.jp/satokichi2004jp/>

徳島大学 生物化学

検索



Click!



主なテーマ

1. タンパク質の構造-機能相関の研究
2. タンパク質の人工改変と安定化手法の応用
3. 細菌改変と細菌の環境適応関連タンパク質の探索
4. バイオリソースを利用した好熱性細菌由来耐熱性酵素遺伝子ライブラリーの構築
5. 蛍光スペクトルを用いたタンパク質の構造変化や凝集状態の解析法
6. 鉱山跡採掘滓からの重金属耐性細菌の探索
7. Compostからの好熱菌探索とその機能
8. モンゴル国家畜乳・乳製品の微生物とペプチド・タンパク質の特性と機能
9. 石灰鉱山土壌由来微生物の炭酸カルシウム耐性と生成
10. 地域の発酵製品中の微生物相の解析
11. その他、産官学共同研究や生物教育活動

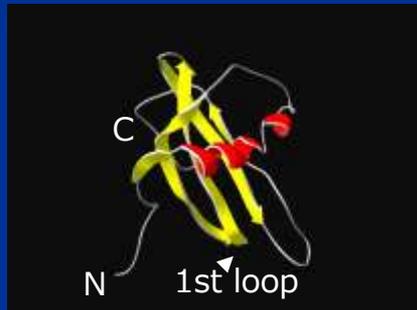
当研究室の主な進路 医薬品（ファイザー、大塚製薬、バイエル、和光純薬工業、長生堂製薬など）、金融・証券（大和証券、阿波銀行、JAバンク、日本郵便、香川県信用保証協会、徳島県信用保証協会、徳島県国民健康保険団体連合会など）、教員（徳島県、香川県、大阪府教員）、受託臨床試験機関（シミック、EPメイト）、メーカー他（JR四国、戸田建設、大塚倉庫、東洋ビューティ、三浦工業、高松帝酸、静岡精機など）、大学院（徳島大、京大、阪大、岡山大、鳴門教育大など）

生物化学研究室の研究概要

1. タンパク質の構造—機能相関の研究

生体由来の種々のタンパク質・酵素・ペプチドについて、その構造と機能の関係を研究している。以下は過去の研究。

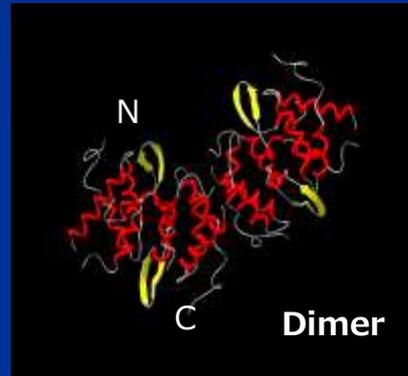
タンパク質性インヒビターの構造—機能相関



Human Cystatin A

Cystatin

- ・ヒトやラットの表皮などに存在するタンパク質性システインプロテアーゼ・インヒビター
- ・ヒトCystatinAやラットCystatinDの発現系確立阻害活性に与関する部位 (N末端と1st loop)の同定、C末端の構造安定性、三次元立体構造*に関する知見を得た。

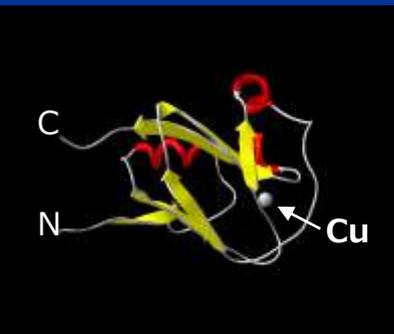


Wheat 0.19 α -amylase inhibitor

0.19 α -amylase inhibitor (α -AI)

- ・小麦中に存在するタンパク質性 α -アミラーゼ・インヒビター
 - ・0.19 α -AIの発現系確立、阻害活性に与関する部位(N末端とTrp残基)に関する知見を得た。
 - ・パン製造業者に見られるアレルギーの原因が α -AIであることを明らかにした*。
- *共同研究

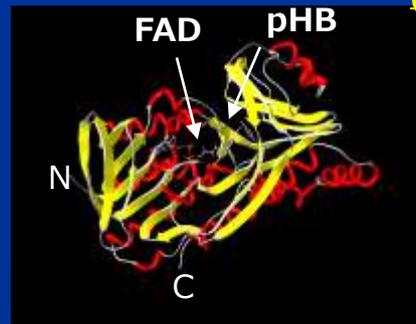
補酵素・金属を必要とする酵素の構造—機能相関



Cucumber Stellacyanin

Bilirubin oxidase (BO)

- ・Cu原子を必須とし、ビリルビンをビリベルジンに酸化する酵素。
 - ・不完全糸状菌BOの発現系の確立*とTypeI,II,III銅原子の配位部位と配位形態に関する知見を得た。
- *共同研究

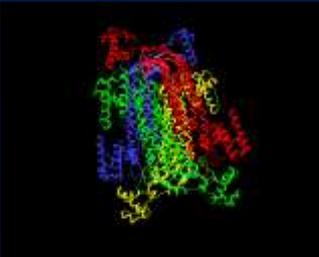


Pseudomonas aeruginosa
p-hydroxybenzoate hydroxylase

4-aminobenzoate hydroxylase (ABH)

- ・Mushroom由来ABHは、FAD,NADHの存在下、4-アミノベンゾエートを脱炭酸的に4-ヒドロキシアニリンに変換する酵素。
 - ・そのC末端領域やFAD結合部位の探索を行った。
 - ・ABHの発現系の確立と γ -GTPの臨床検査法への応用を検討した*。
- *共同研究

眼球タンパク質の安定化機構



Duck δ -crystalline

Crystalline

- ・ウシ眼球中の水晶体に存在する高分子量タンパク質
 - ・ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -クリスタリンが存在する。白内障への関与が考えられている。
 - ・このうち、 α -クリスタリンの分光学的特性、熱凝集へのシャペロン活性について知見を得た。
- *台湾との共同研究

抗菌性ペプチドの構造—機能相関



Human ApoA-II

Apolipoprotein A-II (ApoA-II)

- ・ウシ由来ApoA-IIは76残基からなる抗菌性ペプチドである。
 - ・種々の欠損体および変異体ApoAIIペプチドの機能と二次構造の相関を検討した。
 - ・抗菌性発現に關与するLys残基と領域について知見を得た。
- *共同研究

現在の研究

好熱性細菌酵素の構造—機能相関と耐熱性機構

熱に強い細菌の持つ耐熱化酵素の安定化機構について研究している。

Inorganic pyrophosphatase (PPase)

- ・高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* および *Geobacillus stearothermophilus* 無機ピロリン酸加水分解酵素 (*Tth* および *Bst* PPase) は、無機ピロリン酸を二分子のオルトリン酸に加水分解する酵素であり、高い耐熱性を有する。

- ・*Tth* および *Bst* PPase 遺伝子のクローニングと発現系の構築、部位特異的変異法により耐熱化に寄与する部位と役割を明らかにした。
- *Academy of Russia, EMBLとの共同研究



Tth PPase



Bst PPase (Model)

Nucleoside diphosphate kinase (NDK)

- ・中等度好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来 NDK (*Bst* NDK) と大腸菌由来 NDK (*E.coli* NDK) は、NDPをリン酸化し、NTPを生成する酵素
- ・*Bst* および *E.coli* NDK 遺伝子のクローニングと発現を行い、組み換え体酵素の性質を検討した。

- ・*Bst* NDK は熱に強く、*E.coli* NDK は弱い。その耐熱性の差異や四次構造形成に關与する部位を明らかにした。



E.coli NDK



Bst NDK

2.タンパク質の人工改変と安定化手法の開発

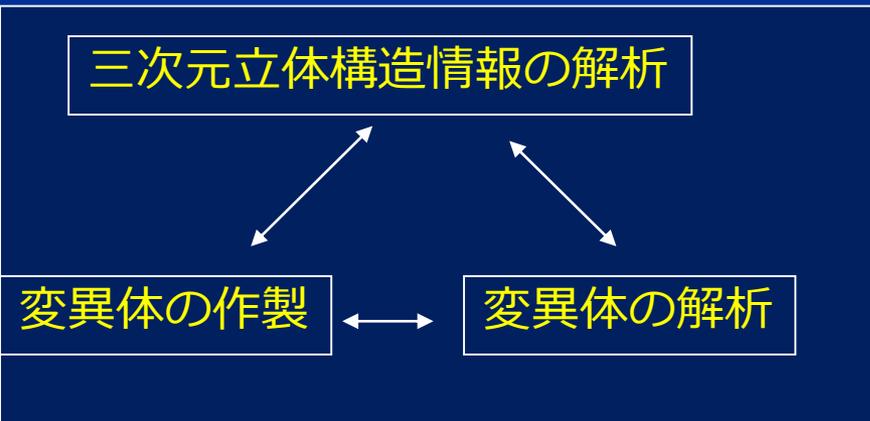
タンパク質工学や進化工学の手法を用いて、酵素の耐熱性を上昇させる因子を分子に導入したり、分子を設計することにより、酵素の人工耐熱化を行っています。

タンパク質の立体構造を基に設計
(タンパク質工学)

スクリーニングによる設計
(進化工学)

部位特異的変異法

遺伝子改変の方法
Random chimeragenesis
Error-prone PCR
DNA shuffling など



目的機能を持つ遺伝子をスクリーニング

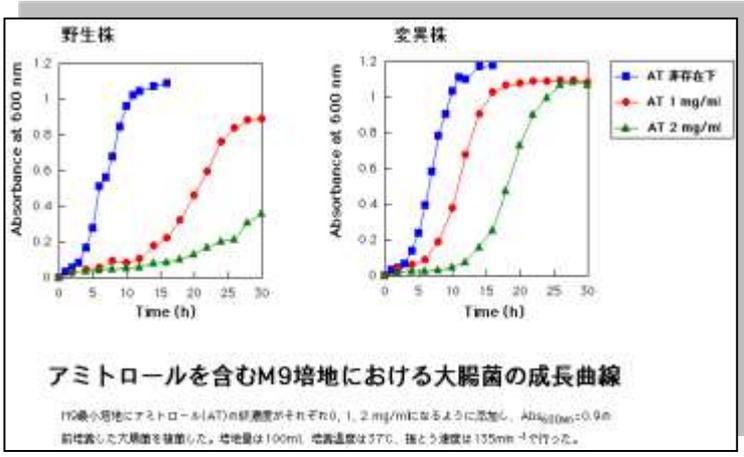
- Helixの安定化
- イオン結合形成
- SS形成
- サブユニット相互作用
- 疎水性相互作用
- 水素結合

新規機能の創出
機能の改変
安定性の向上
結合能力の上昇など

変異箇所の同定

3.細菌改変と細菌の環境適応関連タンパク質の探索

アミノロール(AT)抵抗性大腸菌の作製と発現タンパク質



内分泌かく乱物質のアミノロールに抵抗性を示す大腸菌を、微生物工学的的手法により作製し、その発現タンパク質を検討した。

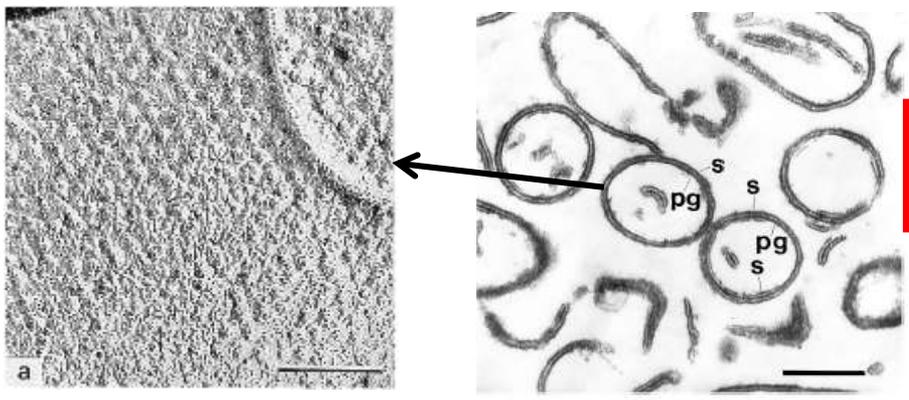
AT抵抗性変異株で、**発現量の増加したタンパク質** → ***E.coli yodA***

AT抵抗性変異株で、**発現量の減少したタンパク質** → ***E.coli AhpC***

Miyano, M, Satoh, T. et al. 日本生化学会 (2003)
Yamaguchi, Y., Satoh, T. et al. 徳島生物学会 (2004)

好熱性細菌の生育温度変異株の作製と発現タンパク質の相違

S(Surface)-layer protein (sbs)



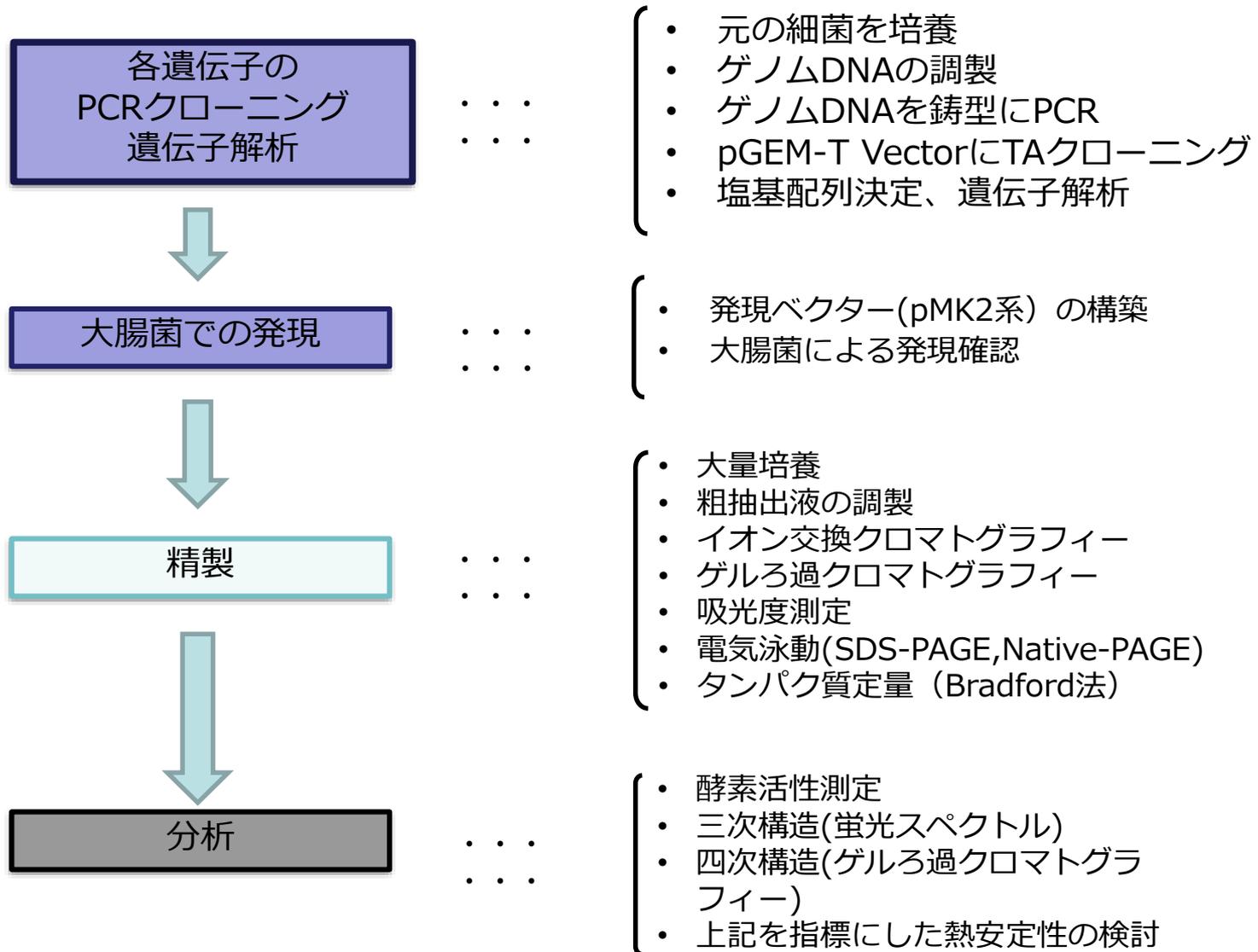
微生物工学的的手法により、中等度好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus*の生育温度変異株を作製し、その発現タンパク質を検討した。

↓

sbsAの発現量の差が、*Bst*の生育可能温度に影響を与えている

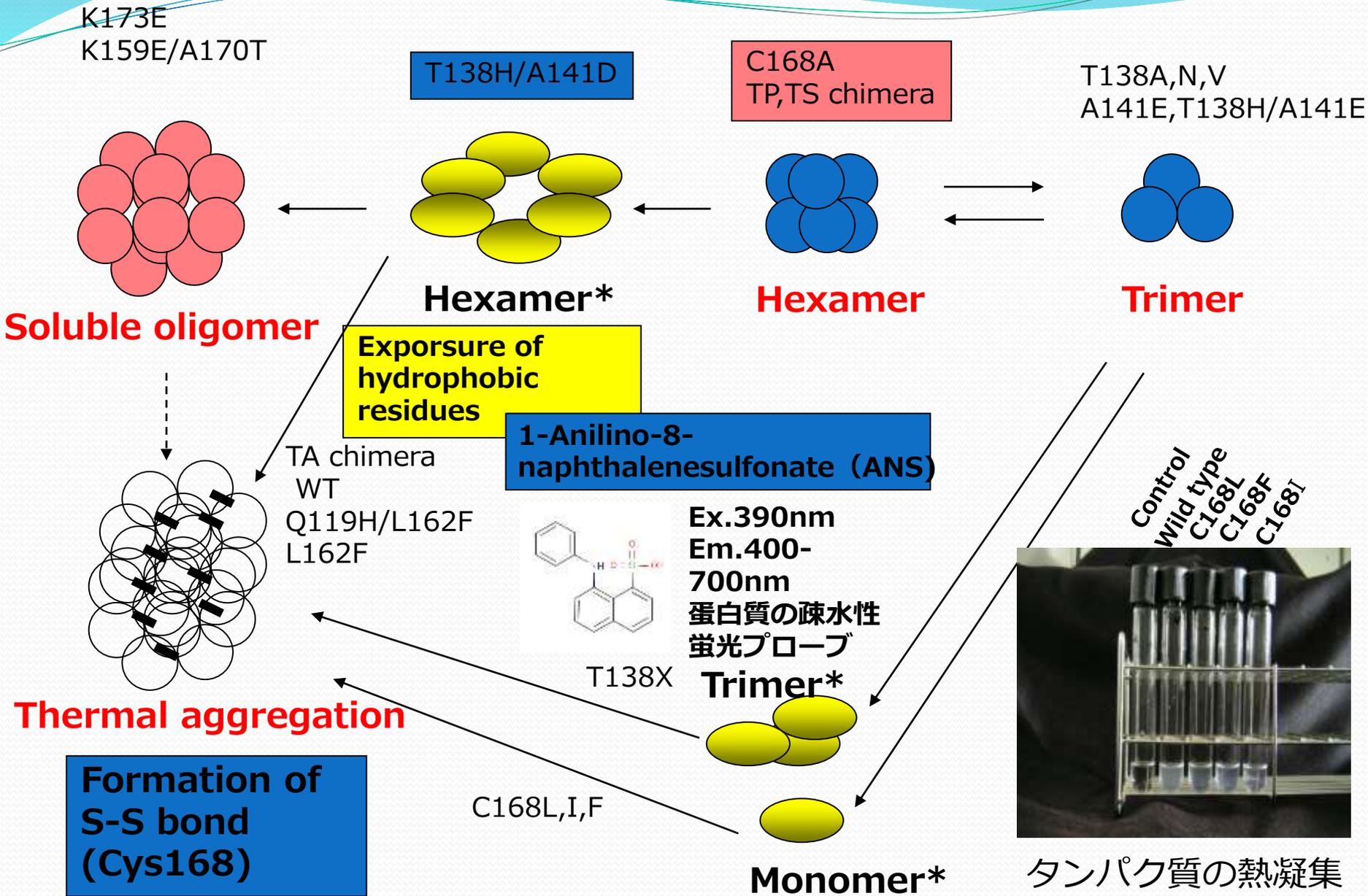
Kyogoku, H., Satoh, T. et al. *Natl.Sci.Res* ,3, 87-95 (2009)

研究の流れ



5. 蛍光スペクトルを用いたタンパク質の構造変化や凝集状態の解析法

タンパク質の高温での立体構造変化や熱凝集生成を、分光学的手法を用いて解析する方法を検討しています。



*partially denaturated

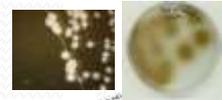
タンパク質の熱凝集

6. 鉱山跡採掘滓からの重金属耐性微生物の探索

四国の鉱山跡周辺の環境と知見



酸化酵素の機能解析



鉄を酸化する細菌の単離・同定



試料採取地点



黄銅鉱(CuFeS₂)



黄鉄鉱 (FeS₂)

四国には三波川帯の結晶片岩層の中には含銅硫化鉄鉱の鉱床があって、別子銅山をはじめとして、いくつかは昭和40年代まで採掘されていた。吉野川流域（支流を含む）にも廃銅鉱山が多数あり、廃坑となった今でも金属漏出などが続いていると推定される。しかし、大規模な廃水処理は行われていない。火山帯にあり、硫黄等による酸性化が著しい岩手県松尾鉱山跡周辺などでは大規模な対策が講じられているが、四国ではそのような環境にはないため、早急な対策がなされていないのが現状である。台風などにより大量の土砂が流出した場合、含有金属化合物の漏出も懸念される。

これらの金属漏出等には、鉱山跡採掘滓に生育する重金属に耐性を有した特殊な微生物群の関与が考えられるが、四国における鉱山跡での研究例はほとんどない。

本研究では、高知県白滝鉱山跡、徳島県高越、東山鉱山跡採掘滓に生育する重金属耐性微生物の耐性獲得機構と金属漏出作用に関する知見を得ることを最終目的とし、その一環として、鉱山跡採掘滓における重金属耐性微生物の調査・解析を行っている。

現在は、さらに範囲を広げ、和歌山県妙法鉱山跡採掘滓試料についても解析を行なった。

6. 鉱山跡採掘滓からの重金属耐性微生物の探索

和歌山県那智勝浦町妙法鉱山跡土壌における重金属耐性微生物の探索と適応機構
(地学・西山先生との共同研究)

和歌山県那智勝浦町にはかつて妙法鉱山など銅鉱山が存在し、谷沿いには採掘滓の堆積した地層が存在する。2011年9月の台風12号による土石流災害により、土砂の崩落と河川水の赤色化が見られた。そこで、この銅鉱山跡に生育する重金属耐性微生物の探索・解析を行い、重金属の漏出に関与する微生物の特性を明らかにする。



Yui Hamaji, Takanori Satoh et al.: Isolation and Identification of Cu, Fe-tolerant Bacteria from Myoho Copper Mine Spoils, Wakayama, *Proceedings of 11th International Congress on Extremophiles*, 155, 2016

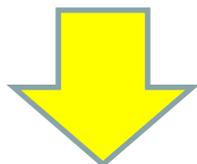
7.Compostからの好熱性細菌の探索

土の中や堆肥には、1gあたり10億匹という細菌がいる。その中には、熱に強い細菌やいろいろな特徴を持った細菌がいる。しかし、同定されている細菌は、実際の10%以下といわれており、まだ人類に未知の細菌が存在している。

牛ふんまたは馬ふん、おがくず、稲わらなどにより作製された完熟堆肥中の好熱性細菌の単離同定を行っている(福島県南相馬市の佐藤畜産より供与)。これらは、バイオリソースや工業的利用、土壌改良などに応用できる可能性がある。

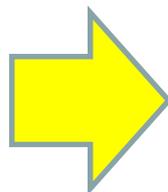


Cattle

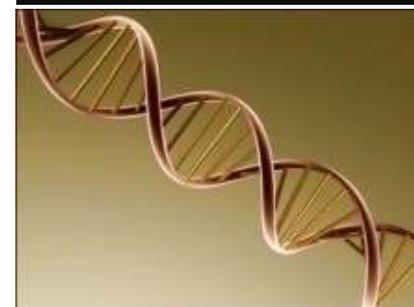
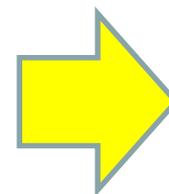


堆肥

微生物の
単離・同定



堆肥中の好熱性細菌
(70℃でも生育できる)



耐熱性酵素の
機能解析

8. Mongol国乳製品中の有用ペプチドの探索と微生物の同定 (モンゴル国立医科学大学化学・生化学学科のMunkhtsetseg 主任との共同研究)

- モンゴル国では農作物栽培に適さないため、主に家畜肉(ヒツジ、牛、馬など) と家畜乳製品が主食である。ビタミン、ミネラルを効率よく摂取するため、家畜乳から様々な乳製品を製造し、日常的に飲食している。これらAIRAG(馬乳酒) やcamel yogurtなどの発酵飲料に存在する微生物相を分析した。
- さらに、モンゴルの家畜乳および家畜乳製品から、有用な乳清低分子ペプチドを探索した。また、乳清タンパク質の脂質結合特性(lipocalin機能) の解析を行った。



Horse milk



Camel milk



AIRAG



Cow milk



Goat milk



Camel milkのヨーグルト

9.阿南市阿瀬比石灰鉱山における炭酸塩形成に関与する細菌の探索

(地学 石田先生、西山先生との共同研究)



四国山地には四国カルストをはじめ大小さまざまな石灰岩地が存在します。阿南市阿瀬比にも大規模な石灰鉱山が存在し、その大理石(石灰岩)は国会議事堂にも使われています。こうした石灰岩の主成分である炭酸カルシウム(CaCO_3)は、その起源として化学反応起源と生物起源のものがあると考えられています。しかし、四国の石灰岩での炭酸カルシウム生成に関与する微生物についての知見はほとんどありません。そこで、阿南市阿瀬比の石灰鉱山土壌に存在する微生物の遺伝子を解析し、また炭酸カルシウムに耐性を示す微生物を探索しています。

佐藤 高則, 原 将希, 濱地 由衣, 井上 翔太, 高橋 昇汰, 中山 美咲, 瀬部 直之, 牧野 祐未子, 坂口 雅俊, 大岩 由利恵, 石田 啓祐: 阿南市石灰鉱山由来の炭酸カルシウム耐性微生物の探索, 阿波学会紀要, No.60, 201-210, 2015年

試料採取地点



阿瀬比石灰鉱山土壌の細菌
(0.5% CaCO_3 培地)



阿瀬比石灰鉱山土壌の
炭酸カルシウム耐性細菌
(10% CaCO_3 培地)

10.地域の発酵製品中の微生物相の解析

- 日本各地には発酵食品が存在し、それぞれの地域でその文化が伝統的に引き継がれている。また、地域の材料を用いた発酵堆肥(竹パウダー;阿南市)なども活用されている。しかし、科学的な知見の乏しいものも多く存在する。
- 和歌山県東部の家庭で製造されるなれずし(サンマ、あゆ、サバなど)では、塩漬けした魚と飯をハナミョウガの葉で包む。それらをウラジロをはさみながら桶に充填し、食塩水などを加えて重しをして、2週間以上発酵させる。この過程は主に乳酸発酵が関与していると考えられるが、その乳酸菌の起源は不明である。そこで、さんまなれずし中の微生物の解析と、その起源の可能性のあるハナミョウガの葉洗浄液に、発酵を担う細菌が存在するか否かを検討した。さらに県西部のサバナれずしでも検討した。

Takanori Satoh, Yui Hamaji et al. Exploration for bacteria from Japanese fermented foods, Narezushi and Awa Banacha tea by 16S rRNA gene analysis, The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology(ASME2016), Program and Abstracts, S7-17, Taipei, Oct. 2016



和歌山県新宮市の30年もの
サンマなれずし



なれずしに使用される桶(左上)とハナミョウガ(右上)、ウラジロ(左下)、古座川町の家庭で作られたさんまなれずし(右下)



和歌山県
古座川町

和歌山県
新宮市

10.地域の発酵製品中の微生物相の解析

クローンライブラリー法による徳島県産茶葉の微生物解析

自然環境や発酵食品などの微生物とその成分



生物資源としての有効利用が期待されている



高知県白滝銅
鉱山跡
(JSE2010)



徳島県高越
銅鉱山跡
(JSE2010)



徳島県東山
銅鉱山跡
(JSE2010)



徳島県
石灰鉱山
(JSME2014)



和歌山県妙法銅
鉱山跡
(JSME2015)



モンゴル国動物乳・発酵乳(ISME2014)



和歌山県産なれずし(ASME2016)

日本三大発酵茶

天狗黒茶
(愛媛)



阿波番茶
(徳島)

碁石茶
(高知)

徳島県阿波番（晩）茶

徳島県でのみ生産される発酵茶



阿波番茶中の微生物の解析

・微生物相に関する知見

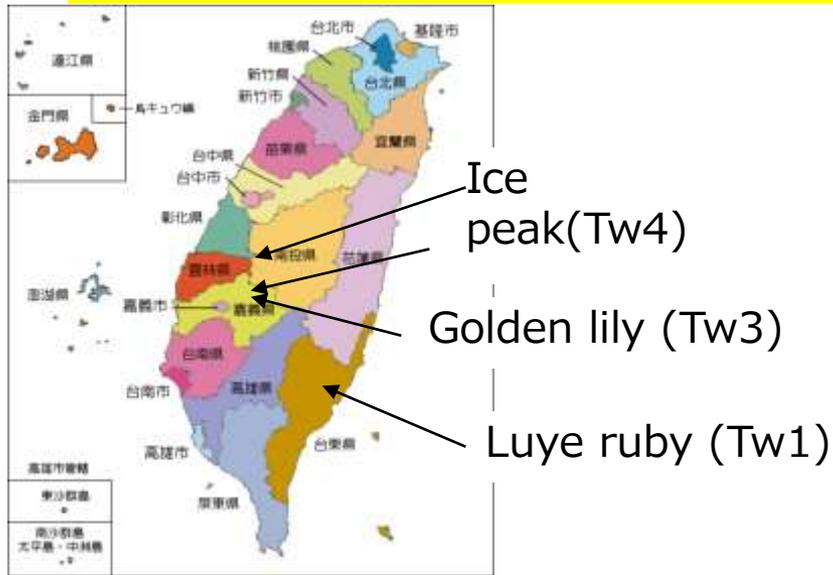


- ・阿波番茶の品質管理
- ・微生物資源としての利用
- ・微生物と含有成分の関係
- ・発酵茶のルーツは？

お茶の産地は日本各地にあるが、**発酵茶を生産・飲用する地域は四国の中山間部に多い**

10. 地域の発酵製品中の微生物相の解析

Exploration for bacteria on the leaves of Taiwan oolong teas



- Tw1: 鹿野紅烏龍 (Luye ruby oolong tea)
- Tw2: 阿里山烏龍 (Ali Mountain oolong tea)
- Tw3: 沁新金萱 (Golden lily oolong tea)
- Tw4: 凍頂烏龍 (Ice peak oolong tea)

There are various teas in East Asia, but potential microbial diversity has not been elucidated in many Taiwan teas. Then, we explored bacteria on the leaves of four Taiwan oolong teas (semi-fermented teas) by the clone library method of 16S rRNA gene.

We explored bacteria in four kinds of Taiwan oolong tea (Tw1-4), and analyzed totally 64 clones (each 16 clones) of 16S rRNA gene as mentioned above. As results, various clones were detected in Taiwan teas, which corresponding to *Weissella*, *Paenibacillus*, *Propionibacterium* in Tw1, *Devosia* and *Chryseobacterium* in Tw2, *Aurantimonas* and *Pedobacter* in Tw3, *Brevundimonas*, *Edaphobacter*, *Propionibacterium* and *Streptomyces* in Tw4, respectively. Therefore, microbial diversity was different among various Japanese and Taiwan teas, and these results might be useful information for utilizing them as bioresource.

Takanori Satoh, Haruka Iwata, Hajime Nonoichi, Ai Hasegawa, Mitsuki Fujii, Kouta Nagai, Shota Inoue and Kenji Akiyoshi : Microbial diversity on the leaves of Japanese and Taiwan teas, *The 9th Asian Symposium on Microbial Ecology(ASME2017), Program and Abstracts*, 204, 2017

10.地域の発酵製品中の微生物相の解析

Exploration for bacteria on the leaves of Korean and Malaysian teas

Korean tea

Kr1	Samdayon, Jeju		Post-fermented tea
Kr2	Black tea, Jeju		fermented tea
Kr3	Black tea, Sejack		fermented tea
Kr4	Green tea, Jeju		non-fermented tea
Kr5	Ssanggye tea		non-fermented tea
Kr6	Ssanggye tea		non-fermented tea

Sample	Obtained clones
Kr2	17
Kr3	18
Kr4	23
Kr5	18
Kr6	24
ST	8



Kr1
(1.6g)



Kr2
(1.1g)



Kr3
(1.3g)



Kr4
(1.4g)



Kr5
(1.3g)



Kr6
(0.7g)

Malaysian tea



Sabah Black tea(ST)
(1.46g)



10.地域の発酵製品中の微生物相の解析

Exploration for bacteria in Soma Cucumber pickles, Fukushima



1A/B: Cucumber pickles (Kashima, 4.86g)



2A/B: Cucumber pickles (Haramachi, 5.44g)



3A/B: Cucumber pickles (Kashima, 6.10g)



4 Cucumber pickles (Fukushima, 2.60g)

In order to maintain sustainable culture and traditional foods, we studies on bacteria and features of Soma cucumber pickles, Fukushima, where is damaged by huge earthquake, Tsunami, and atomic power plant accident.



Soma area